

# Die strukturelle Grundlage der Signaltransduktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Nobel-Aufsatz)\*\*

Brian Kobilka\*

$\beta_2$ -Adrenozeptor · G-Protein-gekoppelte Rezeptoren · Nobel-Vortrag · Proteinstrukturen · Signaltransduktion

## Einführung

Komplexe Organismen benötigen ein ausgefeiltes Kommunikationsnetzwerk zur Aufrechterhaltung ihrer Homöostase. Zellen aus verschiedenen Teilen unseres Körpers kommunizieren miteinander über chemische Botenstoffe in Form von Hormonen und Neurotransmittern. Zellen verarbeiten die in diesen chemischen Botschaften enthaltene Information mithilfe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die sich in der Plasmamembran befinden. GPCRs vermitteln außerdem die Kommunikation mit der Außenwelt. Sehsinn, Geruchssinn und Geschmacksinn werden durch GPCRs vermittelt. GPCRs sind die vielseitigsten chemischen Sensoren der Natur. Es gibt über 800 GPCRs im menschlichen Genom, und sie sprechen auf ein breites Spektrum von chemischen Spezies an, von Photonen, Protonen und Calciumionen über kleine organische Moleküle (einschließlich Geruchstoffe und Neurotransmitter) bis hin zu Peptiden und Glykoproteinen.

Die klassische Funktion eines GPCR besteht darin, die Gegenwart eines extrazellulären Agonisten aufzuspüren, die Information durch die Plasmamembran zu leiten und ein zyttoplasmatisches heterotrimeres G-Protein zu aktivieren, das daraufhin stromabwärts gelegene Effektorproteine moduliert. Betrachten wir als ein Beispiel den humanen  $\beta_2$ -Adrenozeptor ( $\beta_2$ AR); hier bewirkt die Bindung von Adrenalin die Aktivierung der  $G_{\alpha s}$ -Untereinheit, die Stimulation der Adenylylcyclase, die Akkumulation von cAMP, die Aktivierung von PKA und die Phosphorylierung von am Zellmetabolismus beteiligten Proteinen (Abbildung 1). In einer Vielzahl von Forschungen wurde indes gezeigt, dass viele GPCRs über ein noch weit komplexeres Repertoire an Signaltransduktionsprozessen verfügen. Zum Beispiel koppelt der  $\beta_2$ AR sowohl an  $G_{\alpha s}$  als auch an  $G_{\alpha i}$  in kardialen Myozyten,<sup>[1]</sup> und er kann auch in einem G-Protein-unabhängigen Mechanismus (über Arrestin) über die Signalpfade der MAP-Kinase agieren.<sup>[2,3]</sup> In ähnlicher Weise umfasst auch der Prozess der GPCR-Desensibilisierung mehrere Signalpfade, darunter Rezeptorphosphorylierungsereignisse, die arrestinvermittelte Internalisierung in Endosomen, Rezeptor-Rezyklierung und lysosomalen Abbau. Diese Aktivitäten werden durch eine mögliche GPCR-Oligomerisierung<sup>[4]</sup> und die Lokalisierung in spezifischen Membrankompartimenten mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der Lipiddoppelschicht weiter verkompliziert. Solches vielschichtige funktionelle Verhalten wurde für viele GPCRs beobachtet.

Wie hängt dieses komplexe funktionelle Verhalten mit den biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von GPCRs zusammen? Der Effekt eines Liganden auf die Struktur und biophysikalischen Eigenschaften eines Rezeptors ist als Ligandeneffektivität bekannt. Natürliche und synthetische Liganden können in verschiedene Effektivitätsklassen gruppiert werden (Abbildung 1, Einschub): 1) Vollagonisten, die eine maximale Stimulation des Rezeptors bewirken; 2) Partialagonisten, die auch bei Sättigungskonzentration keine volle Aktivierung bewirken können; 3) neutrale Antagonisten, die keinen Effekt auf die Signalgebung haben, aber die Bindung anderer Liganden an den Rezeptor verhindern; 4) inverse Agonisten, die die basale oder konstitutive Aktivität unter die Aktivität des unligierten Rezeptors drücken. Bei GPCRs, die mit mehreren Signalwegen koppeln, können spezifische Liganden unterschiedliche relative Effektivität in den jeweiligen Signalwegen haben. Im Extremfall werden gegensätzliche Aktivitäten in verschiedenen Signalwegen beobachtet: Im Fall des  $\beta_2$ AR sind Agonisten des Arrestin/MAP-Kinase-Signalwegs inverse Agonisten des klassischen  $G_{\alpha s}$ /cAMP/PKA-Signalwegs.<sup>[2,5]</sup>

In Anbetracht der zentralen Rolle der GPCRs in fast allen physiologischen Prozessen überrascht es nicht, dass GPCRs die größte Gruppe von Zielstrukturen für die Suche nach Wirkstoffen für ein breites Spektrum von Krankheiten sind. Ein besseres Verständnis der strukturellen Basis des komplexen Signaltransduktionsverhaltens der GPCRs sollte zu effizienteren und ökonomischeren Ansätzen in der Wirkstoffsuche führen.

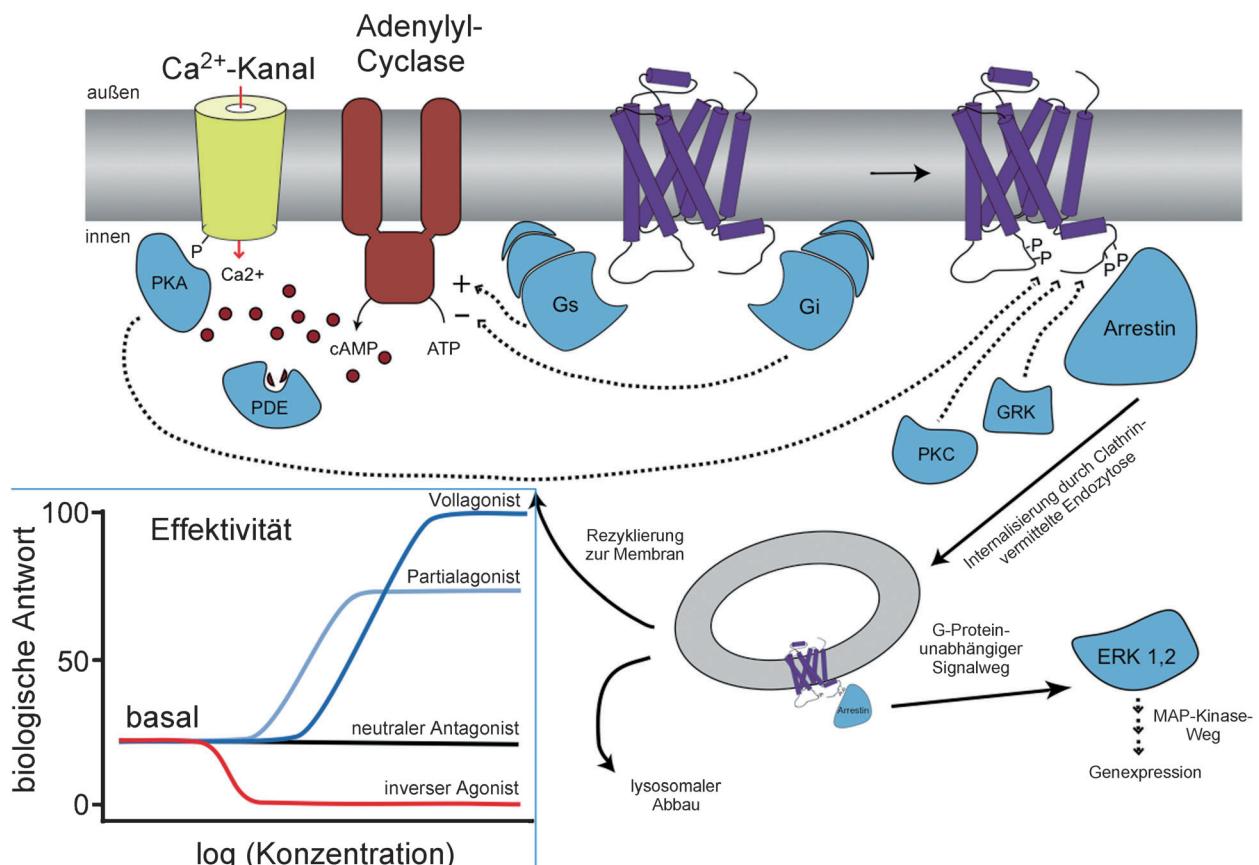
## Erste Einblicke in die GPCR-Struktur

Erste Einblicke in die GPCR-Struktur stammten aus der Sequenzierung von Rhodopsin und der Klonierung des  $\beta_2$ AR und anderer GPCRs in den 1980er Jahren. Meine Forschungen auf diesem Gebiet begannen 1984, als ich mich der Arbeitsgruppe von Dr. Robert Lefkowitz anschloss. Als Post-

[\*] Prof. B. Kobilka

Stanford University School of Medicine  
Department of Molecular and Cellular Physiology  
279 Campus Drive, Stanford, CA 94305 (USA)

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

Der  $\beta_2$ AR moduliert die Aktivität multipler Signalwege

**Abbildung 1.** Das komplexe Signaltransduktions- und regulatorische Verhalten des  $\beta_2$ -Adrenozeptors ( $\beta_2$ AR). Der Einschub illustriert das Konzept der Ligandeneffektivität. PKA = Proteinkinase A, PKC = Proteinkinase C, PDE = Phosphodiesterase, cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat,  $G_s$  = stimulatives regulatives G-Protein,  $G_i$  = inhibitorisches regulatives G-Protein, GRK = G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase, ERK = extrazelluläre signalregulierte Kinase.

doktorand im Lefkowitz-Laboratorium war ich an der Klonierung des  $\beta_2$ AR beteiligt.<sup>[6]</sup> Es war der erste Blick auf die primäre Aminosäuresequenz eines durch einen diffusiblen Liganden (ein Hormon oder ein Neurotransmitter) aktivierten GPCR. Wir waren damals überrascht von der Sequenzhomologie mit Rhodopsin. Indes bestätigten dieser Vergleich mit Rhodopsin sowie Einsichten aus der Klonierung anderer GPCRs, dass die heptahelikale Transmembran topologie ein charakteristisches Kennzeichen der GPCRs ist.

In unseren anfänglichen Studien zur Aufklärung der strukturelle Basis der  $\beta_2$ AR-Funktion profitierten wir davon, dass uns andere Adrenozeptoren zur Verfügung standen, die wir ebenfalls kloniert hatten. Wir erzeugten chimäre Rezeptoren bestehend aus unterschiedlichen Kombinationen von  $\beta_2$ AR- und  $\alpha_2$ AR-Sequenzen und konnten darin Domänen identifizieren, die an der Ligandenbindung und der Spezifität der G-Protein-Kopplung beteiligt waren.<sup>[7]</sup> Nachdem ich Ende 1989 meine eigene Arbeitsgruppe an der Stanford University gegründet hatte, fuhren wir fort, mittels Studien an chimären Rezeptoren und ortsgerichteter Mutationen die Kartierung der funktionellen Domänen zu vervollständigen.<sup>[8–10]</sup> In diesen Studien identifizierten wir außerdem intramolekulare Kontakte, auf deren Grundlage wir die An-

ordnung der transmembranären Segmente in der Lipiddoppelschicht ermitteln konnten.<sup>[11]</sup>

Mutagenesestudien stoßen bei der Aufklärung von Proteinstrukturen rasch an ihre Grenzen, und ich begann deshalb, Methoden für die Produktion und Aufreinigung größerer Mengen von  $\beta_2$ AR zu erforschen. Damit sollte die Voraussetzung geschaffen werden, um biophysikalische Verfahren zur Untersuchung der Rezeptorstruktur und der an der Rezeptoraktivierung beteiligten Konformationsänderungen anwenden zu können. Der  $\beta_2$ AR war ein ideales Modellsystem für diese Studien, da aus Mutagenesestudien bereits ein vernünftiges Ausmaß an struktureller Information zur Verfügung stand und weil verschiedene Liganden für diesen Rezeptor kommerziell erhältlich waren (Agonisten, Partialagonisten, neutrale Antagonisten und inverse Agonisten). Nichtsdestotrotz war dieses Projekt eine besondere Herausforderung, denn die Exprimierung und Aufreinigung dieser relativ instabilen Membranproteine brachte inhärente Probleme mit sich.

Erste Arbeiten konzentrierten sich auf die Aufklärung der Biosynthese von  $\beta_2$ AR, um Faktoren identifizieren zu können, die die Synthese größerer Mengen des Rezeptors ermöglichen würden.<sup>[12]</sup>  $\beta_2$ AR ist ein Membranprotein vom

Typ IIIb; dem Protein fehlt eine spaltbare Signalsequenz. Wir fanden, dass das Einfügen einer spaltbaren Signalsequenz aus Influenza-Hämagglytinin die Insertion des Aminoterminus und des Transmembransegments 1 (TM1) erleichterte und die funktionelle Exprimierung in Insektenzellen um das Zweifache verstärkte.<sup>[13]</sup> Durch Verwendung dieser Modifikation in Verbindung mit Affinitätsmarkierungen am Amino- und Carboxyl-Terminus erarbeiteten wir ein Protokoll zur Exprimierung und Aufreinigung ausreichender Mengen von  $\beta_2$ AR für biophysikalische Studien.<sup>[14]</sup>

1993 schlossen sich Ulrik Gether und Sansan Lin der Arbeitsgruppe an und begannen mit der Anwendung von Fluoreszenzspektroskopie und anderen biochemischen und biophysikalischen Methoden zur Charakterisierung der  $\beta_2$ AR-Struktur und der Konformationsänderungen in Reaktion auf die Bindung verschiedener Liganden. Mithilfe relativ einfacher Techniken wie Zirkulardichroismus und Messung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz erhielten wir Einblicke in das biochemische Verhalten von  $\beta_2$ AR, die sich als wichtig für kristallographische Studien erweisen sollten. Insbesondere analysierten wir den stabilisierenden Effekt von Antagonisten und inversen Agonisten.<sup>[15]</sup> Durch Markierung des  $\beta_2$ AR mit kleinen, umgebungsempfindlichen Fluoreszenzsonden waren wir in der Lage, Strukturänderungen in Reaktion auf die Bindung von Agonisten zu untersuchen.<sup>[16-18]</sup>

Wir führten eine Serie von fluoreszenzspektroskopischen Experimenten aus, in denen der Aktivierungsmechanismus bei der Bindung eines Agonisten untersucht wurde. Die Experimente konzentrierten sich auf das Transmembransegment 6 (TM6), das früheren Experimenten zufolge die größten Strukturänderungen bei der Bindung von Agonisten eingehen sollte. Aufgereinigtes  $\beta_2$ AR wurde am zytoplasmatischen Ende von TM6 mit einer kleinen umgebungsempfindlichen Fluoreszenzsonde markiert. Die Fluoreszenzänderung wurde zeitabhängig aufgezeichnet, und wir beobachteten, dass die Bindung des Agonisten und die Aktivierung über mindestens ein konformatives Intermediat verliefen und dass Agonisten und Partialagonisten spezifische Zustände stabilisierten.<sup>[19-21]</sup> Wir beobachteten auch, dass Agonisten allein nicht in der Lage waren, eine einzelne aktive Konformation zu stabilisieren.<sup>[19]</sup> Diese Befunde führten zu der Erkenntnis, dass GPCRs nicht länger als einfache Zwei-zustandsschalter aufgefasst werden konnten. Eine viel passendere Beschreibung war vielmehr die eines molekularen „Rheostaten“, der ein Kontinuum von Konformationen mit relativ kleinen Energieabständen einnimmt.<sup>[22,23]</sup> Diese biophysikalischen und funktionellen Experimente legten den Schluss nahe, dass chemische Wechselwirkungen zwischen einem Liganden und dem Rezeptor zur Stabilisierung einer ligandenspezifischen Konformation oder eines Ensembles von Konformationen führen, die mit spezifischen zytoplasmatischen Signalproteinen und regulatorischen Proteinen wechselwirken.

## Kristallographie

Die ersten Studien zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der GPCRs wurden an Rhodopsin durchgeführt, das sich von den meisten anderen GPCRs durch seine relativ hohe biochemische Stabilität und sein häufiges Vorkommen in einem nativen Gewebe (boviner Retina) abhebt. Gebhard Schertler und Mitarbeiter bestimmten die erste Struktur von Rhodopsin an zweidimensionalen Kristallen, die in Lipiden aus Sehstäbchenaußensegmenten produziert wurden.<sup>[24]</sup> Die Struktur offenbarte die allgemeine Architektur der heptahelikalen Transmembranhelizes und war die Grundlage für die meisten Homologiemodelle der GPCRs, bevor dann Okada und Palczewski<sup>[25]</sup> im Jahr 2000 die erste hochaufgelöste dreidimensionale Struktur des Rhodopsins erhielten. Okada entwickelte einen elegant einfachen Ansatz zur Aufreinigung des Rhodopsins aus Sehstäbchenaußensegmenten, der lediglich eine Tensidextraktion erforderte.<sup>[26]</sup> In einer neueren Studie erzeugten Ernst und Hofmann die ersten aktiven Strukturen von Opsin aus nativem Rhodopsin.<sup>[27,28]</sup>

Anders als Rhodopsin werden GPCRs für Hormone und Neurotransmitter nicht in ausreichenden Mengen für biophysikalische Studien exprimiert und sind weniger stabil, wenn sie mittels Tensiden aus Membranen extrahiert wurden. Dennoch gelang es uns, die Exprimierung in Insektenzellen und die Aufreinigungsprozedur inkrementell zu verbessern, sodass wir genügende Mengen an  $\beta_2$ AR (1–10 mg) produzieren konnten, um 1998 erste kristallographische Versuche durchführen zu können. Jedoch dauerte es bis 2004, bevor wir die ersten  $\beta_2$ AR-Kristalle erhielten, die groß genug waren, um durch Röntgenbeugung untersucht werden zu können. Diese Kristalle waren noch immer sehr klein (< 50  $\mu\text{m}$ ), und in konventionellen Synchrotron-Strahlrohren ließ sich keine Beugung beobachten. Ich zeigte Gebhard Schertler, der mit Christian Riekel und Manfred Burghammer an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble an der Entwicklung eines Mikrofokus-Strahlrohrs arbeitete, ein Bild dieser Kristalle. Gebhard lud mich ein, einige meiner  $\beta_2$ AR-Kristalle zum ESRF zu bringen. Mithilfe eines Hochintensitätstrahls von 5  $\mu\text{m}$  Durchmesser gelang uns die Aufnahme eines Beugungsmusters, das eine Proteinstruktur in ungefähr 20  $\text{\AA}$  Auflösung lieferte. Obgleich wir von der schlechten Qualität der Beugung enttäuscht waren, zogen wir Hoffnung aus der Tatsache, dass wir  $\beta_2$ AR-Kristalle produzieren und vermessen konnten. Es war ein wichtiger Meilenstein, denn es war nun klar, dass eine Kristallstruktur des  $\beta_2$ AR kein unerreichbares Ziel war.

2005 schlossen sich die Postdocs Dan Rosenbaum und Søren Rasmussen unserer Kristallographiegruppe an. Aus unseren damaligen Erfahrungen konnten wir zwei Haupthindernisse ausmachen, die die Proteinkristallisation erschwerten: der dynamische Charakter des Proteins und die sehr kleine polare Oberfläche, die für Kontakte mit dem Kristallgitter zur Verfügung stand. Unsere biophysikalischen und biochemischen Studien hatten ergeben, dass der  $\beta_2$ AR ein flexibles, dynamisches Protein mit den zytoplasmatischen Enden TM5 und TM6 ist und dass die dritte intrazelluläre Schleife die größte Flexibilität aufweist. Wir nahmen an, dass der dynamische Charakter dieser Rezeptorregion eine kon-

formative Heterogenität bedingt, die die Bildung eines wohlgeordneten Kristalls verhindert. Gleichzeitig hatten biochemische Studien gezeigt, dass die größten polaren Aminosäureabschnitte weitgehend unstrukturiert und damit nicht geeignet waren, Kristallgitterkontakte zu bilden. Søren und Dan verfolgten zwei verschiedene Ansätze, um eine mögliche Lösung dieser Probleme zu finden und qualitativ bessere  $\beta_2$ AR-Kristalle zu gewinnen. Søren identifizierte ein monoklonales Antikörperfragment (Fab), das an die zytoplasmatischen Enden von TM5 und TM6 band. Dieser Antikörper war das Resultat einer Zusammenarbeit, die ich 2003 mit Dan Rohr bei Medarex, einer auf therapeutische Antikörper spezialisierten Firma, initiiert hatte. Ziel dieser Zusammenarbeit war die Erzeugung von Antikörpern, die ein dreidimensionales Epitop des nativen  $\beta_2$ AR erkennen würden. Ich stellte aufgereinigtes  $\beta_2$ AR her und rekonstituierte es in Phospholipidvesikeln, um seine native Konformation beizubehalten. Medarex lieferten uns 13 verschiedene monoklonale Antikörper, von denen Søren einen identifizierte, der nur an natives  $\beta_2$ AR band. Die Bindungsstelle lokalisierten wir in einer Region zwischen TM5 und TM6.<sup>[29]</sup>

Die zweite Strategie, die Dan verfolgte, bestand darin, die flexible dynamische Region zwischen TM5 und TM6 mittels Protein-Engineering mit dem T4-Lysozym (T4L) zu ersetzen.<sup>[30]</sup> T4L wurde gewählt, weil es ein sehr stabiles und gut kristallisierbares Protein ist, dessen Amino- und Carboxyl-Termini geeignet positioniert sind, um zwischen TM5 und TM6 zu passen.

Beide Ansätze wurden mit der Absicht entworfen, die konformativale Flexibilität zu minimieren oder aber zumindest die dynamischste Oberfläche des Rezeptors zu maskieren und gleichzeitig den Anteil an verfügbarer polarer Oberfläche für die Bildung von Kristallgitterkontakten zu erhöhen. Während des Jahres 2006 gelang es uns mithilfe beider Ansätze, Kristalle zu züchten. Als Medium setzten wir in beiden Fällen Bicellen ein (ein Lipid-Tensid-Gemisch), für die gezeigt wurde, dass sie für die Kristallisation von Membranproteinen geeignet sind.<sup>[31]</sup> Die ersten Kristalle des  $\beta_2$ AR-Fab- und des  $\beta_2$ AR-T4L-Fusionsproteinkomplexes ließen sich mit einer Auflösung von 4 Å analysieren. Wir erreichten anschließend auch eine Auflösung von 3.4 Å des in Bicellen kristallisierten  $\beta_2$ AR-Fab-Komplexes.<sup>[32]</sup> Diese Studie lieferte den ersten Einblick in die dreidimensionale  $\beta_2$ AR-Struktur, und eine noch höher aufgelöste Struktur sollte bald folgen (Abbildung 2A).

Im Herbst 2006 schickten wir Vadim Cherezov aus dem Arbeitskreis von Raymond Stevens am Scripps eine Probe unseres aufgereinigten  $\beta_2$ AR-T4L-Komplexes. Vadim war ein Schüler von Martin Caffrey an der Ohio State University, dessen Gruppe ein miniaturisiertes, robotergestütztes Hochdurchsatzverfahren für die Lipidic-Cubic-Phase(LCP)-Kris tallographie entwickelt hatte.<sup>[33,34]</sup> Wir hatten bereits 1999 in Zusammenarbeit mit Peter Nollert die Anwendung von LCP-Methoden zur Kristallisation des  $\beta_2$ AR erprobt; allerdings waren die Methoden zu dieser Zeit noch sehr arbeitsintensiv und verbrauchten große Mengen des Proteins. Mit der in Martins Gruppe entwickelten Methode waren wir in der Lage, Tausende von Bedingungen mit nur wenigen Milligramm Protein durchzutesten.<sup>[35]</sup> Martin Caffrey hatte Vadim

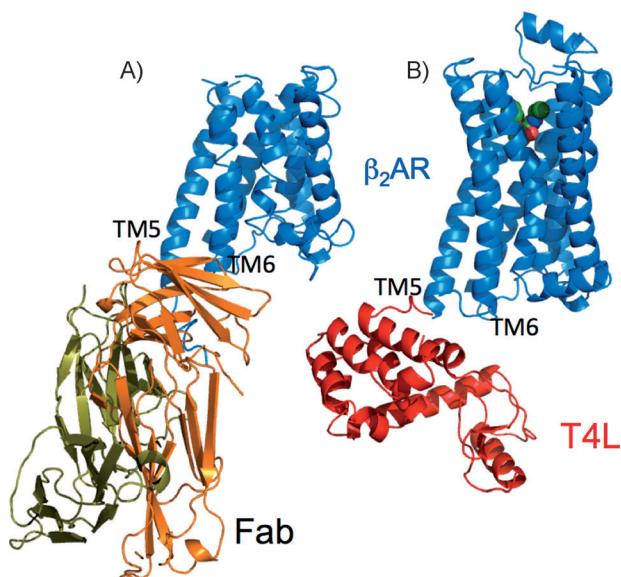


Abbildung 2. Erste Kristallstrukturen von  $\beta_2$ AR in den inaktiven Zuständen. A) Der  $\beta_2$ AR-Fab-Komplex. B) Das  $\beta_2$ AR-T4L-Fusionsprotein. T4L = T4-Lysozym.

bei dessen Weggang an das Scripps einen LCP-Roboter überlassen. Dieses gemeinsame Projekt mit Vadim resultierte in einer Strukturlösung des  $\beta_2$ AR-T4L-Komplexes in 2.4 Å Auflösung (Abbildung 2B).<sup>[30,36]</sup> Die Strategie des Einbaus eines Fusionsproteins in den  $\beta_2$ AR wurde seither für eine Reihe weitere GPCRs erfolgreich angewendet. In mehreren Zusammenarbeiten mit anderen Gruppen bestimmten wir auf diese Weise die Strukturen der muskarinischen Rezeptoren M2 und M3,<sup>[37,38]</sup> der opioiden  $\mu$ - und  $\delta$ -Rezeptoren<sup>[39,40]</sup> und des proteaseaktivierten Rezeptors PAR1.<sup>[41]</sup> Zuletzt fanden wir, dass die Fusion von T4L an den Aminoterminus des  $\beta_2$ AR und einfaches Deletieren eines Großteils der dritten intrazellulären Schleife ebenfalls die Kristallisation erleichtern kann.<sup>[42]</sup>

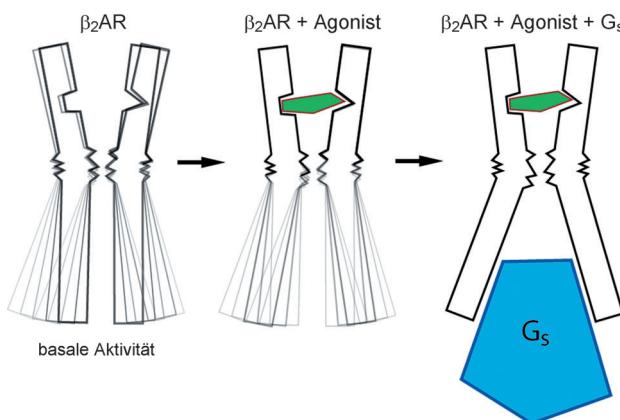
Ein anderer Ansatz, der kürzlich zur erfolgreichen Kristallisation von GPCRs führte, beruhte auf der Anwendung systematischer Mutagenesen zur Identifizierung thermostabilisierender Mutationen. Chris Tate, Gebhard Schertler und Mitarbeiter entwickelten diesen Ansatz zur Strukturlösung von Vogel- $\beta_1$ AR.<sup>[43]</sup> Die stabilisierenden Mutationen können die strukturelle Flexibilität vermindern und die Verwendung von Tensiden mit kleineren Micellgrößen erlauben. Der Ansatz wurde außerdem verwendet, um die Struktur des Adenosin-A2A-Rezeptors<sup>[44]</sup> und, in Kombination mit der T4L-Strategie, des Neurotensinrezeptors<sup>[45]</sup> zu ermitteln.

### Kristallisation aktiver Zustände

Schon bald nachdem wir diese  $\beta_2$ AR-Strukturen im inaktiven Zustand ermittelt hatten, begannen wir mit Experimenten zur Kristallisation aktiver Zustände. Wir probierten zunächst die Methoden, die sich bei der Kristallisation inaktiver Strukturen bewährt hatten, waren damit aber nicht in der Lage, Kristalle von  $\beta_2$ AR im Komplex mit einem Ago-

nisten zu erhalten. Unsere Sorge war, dass aufgrund der relativ niedrigen Affinität typischer Agonisten (verglichen mit der sehr hohen Affinität des inversen Agonisten Carazolol, den wir zur Kristallisation inaktiver Strukturen verwendeten) eine unvollständige Besetzung des Rezeptors unter kristallographischen Bedingungen resultieren würde. Das Ergebnis wäre eine starke konformative Heterogenität. Um das Problem zu lösen, entwickelte Dan Rosenbaum in Zusammenarbeit mit Ralph Holl und Peter Gmeiner (Universität Erlangen) einen kovalenten Agonisten für  $\beta_2$ AR. Damit gelang es,  $\beta_2$ AR-Kristalle mit einem kovalent gebundenen Agonisten zu erhalten; allerdings war die zytoplasmatische Seite des Rezeptors nicht von der Struktur des inaktiven Zustands unterscheidbar.<sup>[46]</sup>

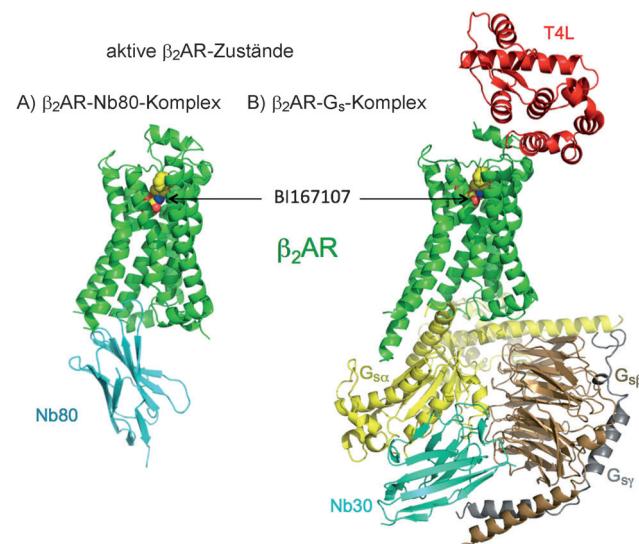
Dieses enttäuschende Ergebnis war im Einklang mit den Erfahrungen aus früheren biophysikalischen Studien, nämlich dass Agonisten alleine nicht den aktiven Zustand des  $\beta_2$ AR zu stabilisieren vermögen. Dieses wurde erstmals mittels Fluoreszenzspektroskopie beobachtet<sup>[19,47]</sup> und in späteren NMR-spektroskopischen Studien bestätigt.<sup>[48]</sup> Abbildung 3



**Abbildung 3.** Darstellung des dynamischen Charakters des  $\beta_2$ AR. In Abwesenheit eines Liganden liegt die mit dem G-Protein koppelnde Oberfläche als ein Ensemble überwiegend niedrigerenergetischer Konformationen vor. Seltene aktive Konformationszustände sorgen für eine basale Aktivität. Die Bindung eines Agonisten verstärkt die dynamischen Eigenschaften des  $\beta_2$ AR, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit aktiver Konformationen erhöht. Nur die Bindung des G-Proteins kann den aktiven Zustand voll stabilisieren.

illustriert den dynamischen Charakter des Rezeptors; man erkennt, dass der Rezeptor als ein Ensemble von Konformationen vorliegt. Aufgrund der Flexibilität des unligierten  $\beta_2$ AR kann sich eine kleine Population von Zuständen in einer aktiven Konformation befinden, was zum Phänomen der basalen Aktivität führt. Bei der Bindung eines Agonisten wird die zytoplasmatische Oberfläche sogar noch dynamischer, resultierend in einem noch breiteren Spektrum von Konformationen. Dies erschwert die Kristallisation Agonist gebundener Rezeptoren. Fluoreszenz- und NMR-Experimente wiesen darauf hin, dass der aktive Zustand nur dann stabilisiert werden kann, wenn der Rezeptor im Komplex mit seinem G-Protein oder einem anderen an die aktive Konformation bindenden Protein vorliegt.<sup>[47,48]</sup>

Unsere Bemühungen zur Kristallisation des  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplexes schritten voran, blieben aber insgesamt erfolglos. Als eine alternative Strategie untersuchten wir den Einsatz von Antikörpern und anderen Proteinen. Im Mai 2009 hatte ich das Glück, Jan Steyaert (Universität Brüssel) auf einer Gordon Conference in Italien zu treffen. Jan erforschte die Anwendung einsträngiger Camelid-Antikörperfragmente (bezeichnet als Nanokörper) als Kristallisationsvermittler in der Proteinkristallographie. Kurz nach der Konferenz schickte ich Jan aufgereinigten, Agonist gebundenen  $\beta_2$ AR in Phospholipidvesikeln zur Immunisierung in Lamas. Im November 2009 hatten wir unsere ersten Nanokörper, und Søren Rasmussen identifizierte einen, der G-Protein-artige Eigenschaften aufwies. Dieser Nanokörper (Nb80) band an aufgereinigten  $\beta_2$ AR und bewirkte eine allosterische Erhöhung der Agonistbindungsaffinität um den Faktor 100 – eine ähnliche Größenordnung wie beim  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplex. Der  $\beta_2$ AR-Nb80-Komplex verschaffte uns einen ersten Eindruck von der Konformation des aktiven Zustands des  $\beta_2$ AR (Abbildung 4 A).<sup>[49]</sup>



**Abbildung 4.** Strukturen von humanem  $\beta_2$ AR im aktiven Zustand.

### Der $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplex

2005 traf ich Roger Sunahara (University of Michigan) bei einer Gordon Conference, und wir begannen eine Zusammenarbeit, um die strukturelle Grundlage der kooperativen Wechselwirkungen zwischen dem  $\beta_2$ AR und seinem G-Protein G<sub>s</sub> zu verstehen. Unser Fernziel war, den  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplex zu kristallisieren. Es war absehbar, dass ein erfolgreicher Verlauf dieser Bemühungen ein ausgedehntes Netzwerk an Kollaborationen mit Forschern verschiedener Disziplinen erfordern würde.

Einer der wichtigsten Faktoren war die Anwendung der Einzelpartikel-Elektronenmikroskopie (EM). Die Einblicke aus diesen Messungen gaben uns die notwendigen Rahmenbedingungen für unsere Kristallisationsstrategie vor. Im Verlauf des Jahres 2009 machten Søren Rasmussen aus meiner Gruppe und Brian Devree aus Rogers Arbeitskreis

beträchtliche Fortschritte mit der Biochemie des Komplexes. Es gelang ihnen, einen relativ stabilen  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplex zu erzeugen, der im Größenaußenschlusschromatogramm als ein einzelner Peak zu sehen war; wir waren aber nicht in der Lage, Kristalle zu produzieren. Wir schickten eine Probe des Proteins an Georgios Skiniotis (University of Michigan), einem Spezialisten für die Einzelpartikel-EM. Unsere erste Ansicht des  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplexes war eine niedrig aufgelöste Struktur, die wir aus negativ gefärbten EM-Bildern zusammensetzten. Die Struktur offenbarte eine unerwartete Eigenschaft des Komplexes, die erklärte, warum sich das Kristallwachstum so schwierig gestaltete. Die G<sub>αs</sub>-Untereinheit besteht aus einer  $\alpha$ -helikalen Domäne und einer Ras-artigen Domäne mit der GDP-Bindetasche an der Oberfläche. Die EM-Struktur zeigte nun, dass die  $\alpha$ -helikale Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit des G<sub>s</sub> konformativ heterogen ist. Zur Lösung dieses Problems identifizierten wir in anschließenden EM-Studien chemische Additive, die die konformative Heterogenität minimierten, sowie einen Nanokörper (Nb35), der den Komplex stabilisierte.

Ein anderes Resultat, das zum Erfolg der  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Kristallographie beitrug, war die Identifizierung eines ultraaffinen Agonisten (BI-167107; Boehringer Ingelheim). Die Dissoziationshalbwertszeit dieses Agonisten betrug über 30 h, was sicherstellte, dass der  $\beta_2$ AR zu jedem Zeitpunkt komplexiert war. Ein anderes wichtiges Reagens war das neuartige Tensid MNG-3, das uns Pil Seok Chae und Sam Gellman (University of Wisconsin, Madison) zur Verfügung stellten.<sup>[50]</sup> Dieses Tensid stabilisierte den  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplex während des Einbaus in das mesphasige Lipid, das für die Kristallographie verwendet wurde. Martin Caffrey stellte ein spezielles mesphasiges Lipid bereit (7.7 MAG), das die Anwendung von LCP-Methoden auf einen großen Proteinkomplex ermöglichte.<sup>[34]</sup> Zur weiteren Stabilisierung des  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplexes entwickelten wir in Zusammenarbeit mit Jan Steyaert einen Nanokörper (Nb35), der an die Schnittstelle zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von G<sub>s</sub> bindet. Ein letztes Projekt war schließlich der Ersatz des Aminoterminus des  $\beta_2$ AR gegen T4L, was zu einer Verstärkung der Packungswchselwirkungen mit der extrazellulären Oberfläche führte.

Die ersten Kristalle des  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplexes wurden im April 2011 erhalten, und es gelang uns schließlich, die Struktur mit einer Auflösung von 3.2 Å zu lösen (Abbildung 4B).<sup>[51]</sup> Die Struktur zeigte auf, wie die Bindung eines kleinen Agonisten an die extrazelluläre Seite des Rezeptors eine Strukturänderung durch die Lipid-Doppelschicht hindurch bewirkt und ein zytosolisches G-Protein aktiviert. In diesem Prozess werden kleine Strukturänderungen in der Umgebung der Bindetasche zu sehr großen Strukturänderungen im G-Protein verstärkt.

Die Abbildungen 5–8 zeigen den Prozess der Aktivierung, beginnend mit der Stabilisierung des  $\beta_2$ AR durch einen Agonisten bis hin zu den rezeptorvermittelten Strukturänderungen in G<sub>s</sub>. Wie in Abbildung 5 gezeigt, sind die Strukturunterschiede zwischen den inaktiven und aktiven  $\beta_2$ AR-Zuständen relativ gering, insbesondere in der Umgebung der Ligandenbindetasche. Die größten Änderungen werden an der zytoplasmatischen Oberfläche beobachtet,

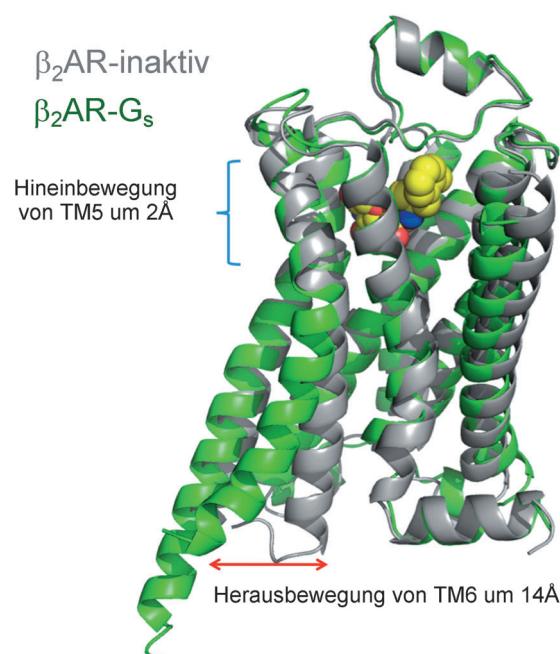


Abbildung 5. Vergleich zwischen dem Carazolol-gebundenen, inaktiven Zustand von  $\beta_2$ AR (grau) und dem aktiven Zustand von  $\beta_2$ AR (grün) im  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplex.

einschließlich einer nach außen gerichteten Bewegung der TM6 um 14 Å.

Abbildung 6 vergleicht die Bindungstaschen der aktiven und inaktiven Strukturen. Aminosäuren innerhalb von 4 Å des Agonisten BI167107 sind gezeigt. Die Unterschiede innerhalb der Bindungstaschen sind relativ gering; mit dem Agonisten ist die Tasche kleiner als mit dem inversen Agonisten. Die größte Strukturänderung ist eine nach innen gerichtete Bewegung des TM5 um 2 Å im Bereich von Ser 207. Für Ser 203, 204 und 207 war vorher gezeigt worden, dass sie für die Bindung und Aktivierung von Agonisten wichtig sind.

Um verstehen zu können, wie diese kleinen Änderungen in der Bindungstasche zu einer Bewegung von über 14 Å am

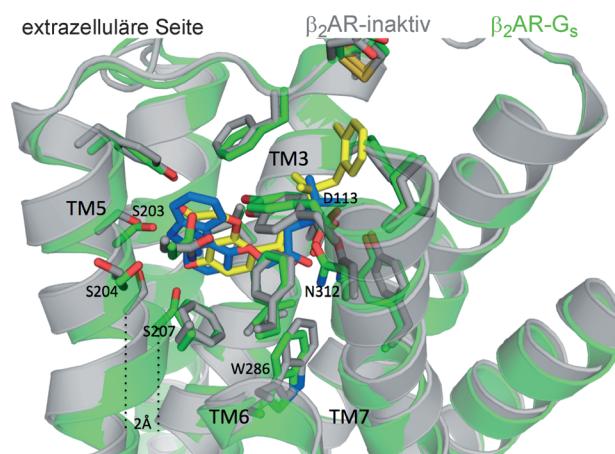
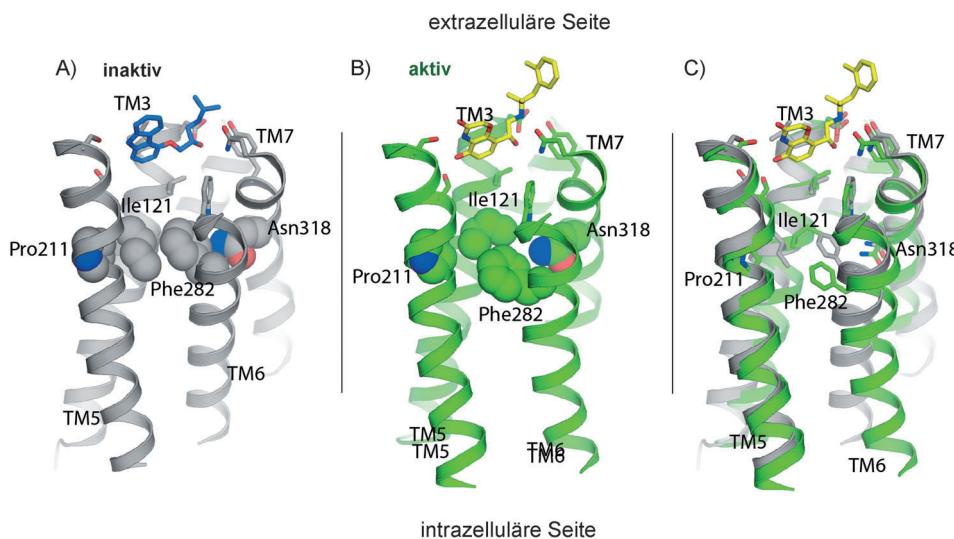


Abbildung 6. Vergleich der Bindungstasche mit dem inversen Agonisten Carazolol im inaktiven Zustand von  $\beta_2$ AR (grau) und mit dem Agonisten BI167107 im aktiven Zustand von  $\beta_2$ AR (grün).



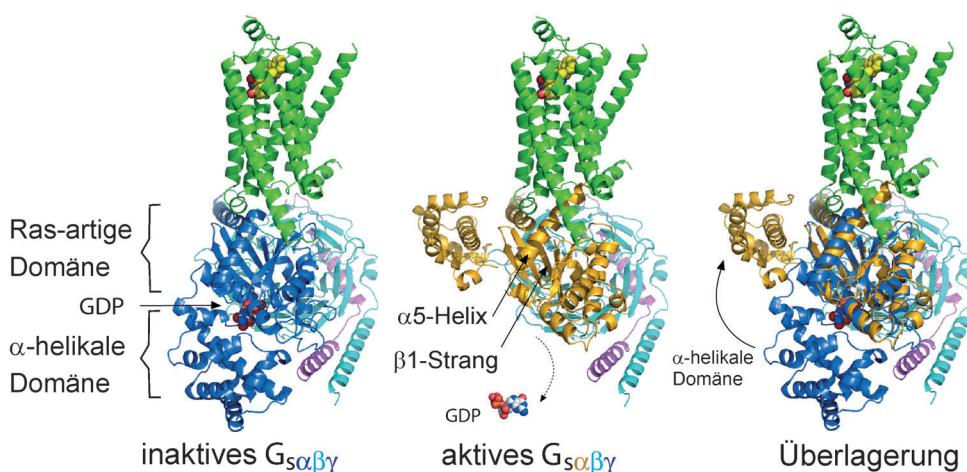
**Abbildung 7.** Packungswechselwirkungen konservierter Aminosäuren in inaktiven und aktiven Zuständen von  $\beta_2$ AR. Nur TM3, TM5, TM6 und TM7 sind gezeigt. A) Ein Satz von konservierten Aminosäuren (dargestellt als Kugeln) bildet eine Packungsanordnung zur Stabilisierung der inaktiven Konformation. Beteiligte Aminosäuren sind die hoch konservierten Pro211 in TM5 und Phe282 in TM6 sowie Ile121 in TM3 und Asn318 in TM7. B) Aktiver Zustand. Die im inaktiven Zustand beobachtete Packungsanordnung ist mit der kleinen inwärts gerichteten Bewegung von TM5 nicht kompatibel, und die Realisierung des aktiven Zustands mit gebundenem Agonisten erfordert eine beträchtliche Strukturumlagerung. C) Überlagerung der aktiven und inaktiven Zustände. Pro211, Phe282, Ile121 und Asn318 sind zur besseren Erkennung der unterschiedlichen Positionen in Stabdarstellung gezeichnet.

zytoplasmatischen Ende des Rezeptors führen, untersuchten wir die Änderungen der Packungswechselwirkungen in TM-Segmenten unterhalb der Ligandenbindungstasche. Wie in Abbildung 7 gezeigt ist, existiert ein Satz konservierter Aminosäuren, die zur Stabilisierung der inaktiven Konformation miteinander packen (Abbildung 7 A). Hierzu gehören die hoch konservierten Pro211 in TM5 und Phe282 in TM6 sowie Ile121 in TM3 und Asn318 in TM7. Diese Packungsanordnung ist mit der kleinen inwärts gerichteten Bewegung von TM5 nicht kompatibel, und die Realisierung des Agonist-

gebundenen aktiven Zustands erfordert eine beträchtliche Umlagerung (Abbildung 7B). Diese umfasst die Rotation von TM6 um Phe282, die für die große, nach außen gerichtete Bewegung am zytoplasmatischen Ende hauptsächlich verantwortlich ist (Abbildung 7C).

Abbildung 8 zeigt die Strukturänderungen von  $G_s$  bei der Bildung eines Komplexes mit Agonist-gebundenem  $\beta_2$ AR. Der inaktive Zustand des  $G_s$ -Heterotrimers wurde aus der Kristallstruktur des  $G_i$ -Heterotrimers modelliert. Die  $G_{\alpha s}$ -Untereinheit besteht aus einer Ras-artigen GTPase-Domäne und einer  $\alpha$ -helikalen Domäne. Die GDP-Bindestelle (GDP = Guanosindiphosphat) sitzt an der Grenzfläche zwischen diesen beiden Domänen. Bei der Kopplung an den  $\beta_2$ AR geht die  $G_{\alpha s}$ -Untereinheit große Strukturänderungen ein. Die  $\alpha$ -helikale Domäne wird um un-

gefähr 130° ausgelenkt. Die Carboxyl-terminale  $\alpha 5$ -Helix der Ras-artigen Domäne wird um 5 Å in den Kern des aktiven Rezeptors versetzt und stabilisiert damit den aktiven Zustand des Rezeptors. Diese Versetzung der  $\alpha 5$ -Helix sowie weitere kleinere Änderungen, die über den  $\beta 1$ -Strang der Ras-Domäne vom Rezeptor auf die GDP-Bindetasche übertragen werden, verursachen die Dissoziation von GDP. Der freie  $\beta_2$ AR- $G_s$ -Komplex ist einsatzbereit für die Aktivierung durch GTP (Guanosintriphosphat). Die sehr große Auslenkung der  $\alpha$ -helikalen Domäne war aus früheren Studien nicht zu erwarten; erst die hochauflösten Einzelpartikel-EM-Studien, die Georgios Skiniotis durchführte, zeigten, dass die  $\alpha$ -helikale Domäne hoch dynamisch ist.



**Abbildung 8.** Vergleich zwischen inaktivem GDP-gebundenem  $G_s$  (links) und dem  $\beta_2$ AR- $G_s$ -Komplex (Mitte). Rechts: Überlagerung der beiden Strukturen. Das GDP-gebundene  $G_s$ -Heterotrimer wurde aus der Kristallstruktur des  $G_i$ -Heterotrimers modelliert.

### Abschließende Bemerkungen

Die komplexe Kristallstruktur des  $\beta_2$ AR- $G_s$ -Komplexes gewährt Einblicke in die transmembranäre Signaltransduktion eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors in hoher Auflösung. Uns stehen damit die Rahmenbedingungen für den Entwurf von Experimenten zur Verfügung,

um die Mechanismen der Komplexbildung, der GTP-Bindung und der Komplexdissoziation zu untersuchen. Von besonderem Interesse werden Studien sein, die die funktionelle Bedeutung der im  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Komplex beobachteten großen Bewegung der  $\alpha$ -helikalen Domäne im G<sub>as</sub> relativ zur Rassartigen Domäne aufklären. Trotz allem lässt die  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Struktur eine wichtige Frage unbeantwortet: Sie erklärt nicht, warum der  $\beta_2$ AR bevorzugt an G<sub>s</sub> koppelt. Obgleich für einige der  $\beta_2$ AR-Sequenzen an der  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Schnittstelle eine Rolle bei der Kopplung des G-Proteins nachgewiesen wurde, lieferten vergleichende Betrachtungen anderer G<sub>s</sub>-gekoppelter GPCRs keine eindeutige Konsensussequenz für die Spezifität der G<sub>s</sub>-Kopplung. Die Spezifität der Kopplung könnte durch Wechselwirkungen zwischen dem  $\beta_2$ AR und G<sub>s</sub> bestimmt sein, die der Bildung des Nukleotid-freien Komplexes vorgelagert sind. Die in diesem Vortrag erläuterten Studien haben das Gebiet zweifelsohne vorangebracht; dennoch müssen noch viele Fragen geklärt werden, bevor wir die Signalprozesse dieser faszinierenden Membranproteine vollständig verstehen und pharmakologisch regulieren können.

## Danksagung

Dieser Vortrag fasst Arbeiten ab dem Jahr 1984 zusammen, die von den Beiträgen vieler Kollegen, Doktoranden und Postdocs inspiriert worden sind. Einigen wenigen möchte ich besonders danken: meiner Frau Tong Sun Kobilka, die mir seit über 30 Jahren Kollege, Ratgeber und Fürsprecher ist, Bob Lefkowitz für seine Betreuung während meines Stipendiats und darüber hinaus, Bill Weis für Hilfe bei der Interpretation von Beugungsdaten und der Lösung schwieriger Kristallstrukturen und Roger Sunahara für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit über die  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Struktur. Schließlich danke ich allen anderen Mitgliedern des Teams von Wissenschaftlern, die an der Aufklärung der  $\beta_2$ AR-G<sub>s</sub>-Struktur mitgewirkt haben. In Stanford: Søren Rasmussen, Foon Sun Thian, Yaozhong Zou, Andrew Kruse, Ka Young Chung und Jesper Mathiesen. An der University of Michigan: Brian DeVree, Diane Calinski, Gerwin Westfield und Georgios Skiniotis. An der University of Wisconsin, Madison: Pil Seok Chae und Sam Gellman. An der Free University of Brussels: Els Pardon und Jan Steyaert. Am Trinity College Dublin: Joseph Lyons, Syed Shah und Martin Caffrey. Diese Arbeit wurde durch Mittel der National Institutes of Health (NINDS und NIGMS) sowie Schenkungen der Mathers Foundation und Lundbeck gefördert.

Eingegangen am 11. März 2013

Online veröffentlicht am 6. Mai 2013

Übersetzt von Dr. Frank Maaß, Weinheim

- [1] „Coupling of  $\beta_2$ -adrenoceptor to G<sub>i</sub> proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes“: R. P. Xiao, P. Avdonin, Y. Y. Zhou, H. Cheng, S. A. Akhter, T. Eschenhagen, R. J. Lefkowitz, W. J. Koch, E. G. Lakatta, *Circ. Res.* **1999**, *84*, 43–52.
- [2] „ $\beta$ -Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors“: M. Azzi, P. G. Charest, S. Angers, G. Rousseau, T.

Kohout, M. Bouvier, G. Pineyro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11406–11411.

- [3] „ $\beta$ -Arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the  $\beta_2$  adrenergic receptor“: S. K. Shenoy, M. T. Drake, C. D. Nelson, D. A. Houtz, K. Xiao, S. Madabushi, E. Reiter, R. T. Premont, O. Lichtarge, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1261–1273.
- [4] „Roles of G-protein-coupled receptor dimerization“: S. Terrillon, M. Bouvier, *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 30–34.
- [5] „A unique mechanism of  $\beta$ -blocker action: Carvedilol stimulates  $\beta$ -arrestin signaling“: J. W. Wisler, S. M. DeWire, E. J. Whalen, J. D. Violin, M. T. Drake, S. Ahn, S. K. Shenoy, R. J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16657–16662.
- [6] „Cloning of the gene and cDNA for mammalian  $\beta$ -adrenergic receptor and homology with rhodopsin“: 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*, 75–79.
- [7] „Chimeric  $\alpha_2$ - $\beta_2$ -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.
- [8] „A point mutation in the seventh hydrophobic domain of the  $\alpha_2$  adrenergic receptor increases its affinity for a family of  $\beta$  receptor antagonists“: S. Suryanarayana, D. A. Daunt, M. Von Zastrow, B. K. Kobilka, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15488–15492.
- [9] „Enhancement of membrane insertion and function in a type IIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide“: X. M. Guan, T. S. Kobilka, B. K. Kobilka, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21995–21998.
- [10] „Amino acid substitutions at position 312 in the seventh hydrophobic segment of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor modify ligand-binding specificity“: S. Suryanarayana, B. K. Kobilka, *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 111–114.
- [11] „Arrangement of transmembrane domains in adrenergic receptors. Similarity to bacteriorhodopsin“: T. Mizobe, M. Maze, V. Lam, S. Suryanarayana, B. K. Kobilka, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2387–2389.
- [12] „The role of cytosolic and membrane factors in processing of the human  $\beta_2$  adrenergic receptor following translocation and glycosylation in a cell-free system“: B. K. Kobilka, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7610–7618.
- [13] „Identification of a single amino acid residue responsible for the binding of a class of  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists to 5-hydroxytryptamine 1A receptors“: X. M. Guan, S. J. Peroutka, B. K. Kobilka, *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 695–698.
- [14] „Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G protein-coupled receptor“: B. K. Kobilka, *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 269–271.
- [15] „Ligand stabilization of the  $\beta_2$  adrenergic receptor: effect of DTT on receptor conformation monitored by circular dichroism and fluorescence spectroscopy“: S. Lin, U. Gether, B. K. Kobilka, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14445–14451.
- [16] „Fluorescent labeling of purified  $\beta_2$  adrenergic receptor. Evidence for ligand-specific conformational changes“: U. Gether, S. Lin, B. K. Kobilka, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 28268–28275.
- [17] „Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility“: U. Gether, J. A. Ballesteros, R. Seifert, E. Sanders-Bush, H. Weinstein, B. K. Kobilka, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2587–2590.
- [18] „Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the  $\beta_2$  adrenoceptor“: U. Gether, S. Lin, P. Ghanouni, J. A. Ballesteros, H. Weinstein, B. K. Kobilka, *EMBO J.* **1997**, *16*, 6737–6747.

- [19] „Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the  $\beta_2$  adrenergic receptor“: P. Ghanouni, Z. Gryczynski, J. J. Steenhuis, T. W. Lee, D. L. Farrens, J. R. Lakowicz, B. K. Kobilka, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 24433–24436.
- [20] „Sequential binding of agonists to the  $\beta_2$  adrenoceptor: Kinetic evidence for intermediate conformational states“: G. Swaminath, Y. Xiang, T. W. Lee, J. Steenhuis, C. Parnot, B. K. Kobilka, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 686–691.
- [21] „Probing the  $\beta_2$  adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists“: G. Swaminath, X. Deupi, T. W. Lee, W. Zhu, F. S. Thian, T. S. Kobilka, B. Kobilka, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22165–22171.
- [22] „Activation of G protein-coupled receptors“: X. Deupi, B. Kobilka, *Adv. Protein Chem.* **2007**, *74*, 137–166.
- [23] „Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function“: X. Deupi, B. K. Kobilka, *Physiology* **2010**, *25*, 293–303.
- [24] „Arrangement of rhodopsin transmembrane  $\alpha$ -helices“: V. M. Unger, P. A. Hargrave, J. M. Baldwin, G. F. Schertler, *Nature* **1997**, *389*, 203–206.
- [25] „Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor“: K. Palczewski, T. Kumashiro, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, *289*, 739–745.
- [26] „X-Ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles“: T. Okada, I. Le Trong, B. A. Fox, C. A. Behnke, R. E. Stenkamp, K. Palczewski, *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 73–80.
- [27] „Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin“: J. H. Park, P. Scheerer, K. P. Hofmann, H. W. Choe, O. P. Ernst, *Nature* **2008**, *454*, 183–187.
- [28] „Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation“: P. Scheerer, J. H. Park, P. W. Hildebrand, Y. J. Kim, N. Krauss, H. W. Choe, K. P. Hofmann, O. P. Ernst, *Nature* **2008**, *455*, 497–502.
- [29] „A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography“: P. W. Day, S. G. Rasmussen, C. Parnot, J. J. Fung, A. Masood, T. S. Kobilka, X. J. Yao, H. J. Choi, W. I. Weis, D. K. Rohrer, B. K. Kobilka, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 927–929.
- [30] „GPCR engineering yields high-resolution structural insights into  $\beta_2$ -adrenergic receptor function“: 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*, 1266–1273.
- [31] „Bicelle crystallization: a new method for crystallizing membrane proteins yields a monomeric bacteriorhodopsin structure“: S. Faham, J. U. Bowie, *J. Mol. Biol.* **2002**, *316*, 1–6.
- [32] „Crystal structure of the human  $\beta_2$  adrenergic G-protein-coupled receptor“: 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*, 383–387.
- [33] „A simple mechanical mixer for small viscous lipid-containing samples“: A. Cheng, B. Hummel, H. Qiu, M. Caffrey, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *95*, 11–21.
- [34] „Membrane protein crystallization in lipidic mesophases with tailored bilayers“: L. V. Misquitta, Y. Misquitta, V. Cherezov, O. Slattery, J. M. Mohan, D. Hart, M. Zhalnina, W. A. Cramer, M. Caffrey, *Structure* **2004**, *12*, 2113–2124.
- [35] „A robotic system for crystallizing membrane and soluble proteins in lipidic mesophases“: V. Cherezov, A. Peddi, L. Muthusubramaniam, Y. F. Zheng, M. Caffrey, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2004**, *60*, 1795–1807.
- [36] „High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta_2$ -adrenergic G protein-coupled receptor“: 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*, 1258–1265.
- [37] „Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist“: K. Haga, A. C. Kruse, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhang, W. I. Weis, T. Okada, B. K. Kobilka, T. Haga, T. Kobayashi, *Nature* **2012**, *482*, 547–551.
- [38] „Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor“: A. C. Kruse, J. Hu, A. C. Pan, D. H. Arlow, D. M. Rosenbaum, E. Rosemond, H. F. Green, T. Liu, P. S. Chae, R. O. Dror, D. E. Shaw, W. I. Weis, J. Wess, B. K. Kobilka, *Nature* **2012**, *482*, 552–556.
- [39] „Structure of the  $\delta$ -opioid receptor bound to naltrindole“: S. Granier, A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, W. I. Weis, B. K. Kobilka, *Nature* **2012**, *485*, 400–404.
- [40] „Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist“: A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, J. M. Mathiesen, R. K. Sunahara, L. Pardo, W. I. Weis, B. K. Kobilka, S. Granier, *Nature* **2012**, *485*, 321–326.
- [41] „Identification of GPCR-interacting cytosolic proteins using HDL particles and mass spectrometry-based proteomic approach“: K. Y. Chung, P. W. Day, G. Velez-Ruiz, R. K. Sunahara, B. K. Kobilka, *PLoS One* **2013**, *8*, e54942.
- [42] „N-terminal T4 lysozyme fusion facilitates crystallization of a G protein coupled receptor“: Y. Zou, W. I. Weis, B. K. Kobilka, *PLoS One* **2012**, *7*, e46039.
- [43] „Structure of a  $\beta_1$ -adrenergic G-protein-coupled receptor“: 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.
- [44] „Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation“: G. Lebon, T. Warne, P. C. Edwards, K. Bennett, C. J. Langmead, A. G. Leslie, C. G. Tate, *Nature* **2011**, *474*, 521–525.
- [45] „Structure of the agonist-bound neurotensin receptor“: 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*, 508–513.
- [46] „Structure and function of an irreversible agonist- $\beta_2$  adrenoceptor complex“: D. M. Rosenbaum, C. Zhang, J. A. Lyons, R. Holl, D. Aragao, D. H. Arlow, S. G. Rasmussen, H. J. Choi, B. T. Devree, R. K. Sunahara, P. S. Chae, S. H. Gellman, R. O. Dror, D. E. Shaw, W. I. Weis, M. Caffrey, P. Gmeiner, B. K. Kobilka, *Nature* **2011**, *469*, 236–240.
- [47] „The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR–G protein complex“: X. J. Yao, G. Velez Ruiz, M. R. Whorton, S. G. Rasmussen, B. T. DeVree, X. Deupi, R. K. Sunahara, B. Kobilka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9501–9506.
- [48] „The dynamic process of  $\beta_2$ -adrenergic receptor activation“: R. Nygaard, Y. Zou, R. O. Dror, T. J. Mildorf, D. H. Arlow, A. Manglik, A. C. Pan, C. W. Liu, J. J. Fung, M. P. Bokoch, F. S. Thian, T. S. Kobilka, D. E. Shaw, L. Mueller, R. S. Prosser, B. K. Kobilka, *Cell* **2013**, *152*, 532–542.
- [49] „Structure of a nanobody-stabilized active state of the  $\beta_2$  adrenoceptor“: S. G. 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*, 175–180.
- [50] „Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins“: P. S. Chae, S. G. Rasmussen, R. R. Rana, K. Gotfryd, R. Chandra, M. A. Goren, A. C. Kruse, S. Nurva, C. J. Loland, Y. Pierre,

D. Drew, J. L. Popot, D. Picot, B. G. Fox, L. Guan, U. Gether, B. Byrne, B. Kobilka, S. H. Gellman, *Nat. Methods* **2010**, 7, 1003–1008.

[51] „Crystal structure of the  $\beta_2$  adrenergic receptor–G<sub>s</sub> protein complex“: 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, 549–555.

# Anzeigenschluss für Stellenanzeigen

Eine Zeitschrift der Gesellschaft Deutscher Chemiker

30/13 25. Juni	Erscheinungstermin: 22. Juli
31/13 2. Juli	Erscheinungstermin: 29. Juli

**Angewandte Chemie**  
Anzeigenabteilung:  
Marion Schulz  
Tel.: 0 62 01 – 60 65 65  
Fax: 0 62 01 – 60 65 50  
E-Mail: [MSchulz@wiley-vch.de](mailto:MSchulz@wiley-vch.de)

Stellenangebote werden  
zusätzlich 4 Wochen kostenlos  
ins Internet gestellt!

**Angewandte  
Chemie**  
Eine Zeitschrift der Gesellschaft Deutscher Chemiker

Endlich!  
www.expressioncms.com  
[info@advion.com](mailto:info@advion.com)

Ein Massenspektrometer für Chemiker.  
Das **expression™ CMS** (Compact Mass Spec)

**Advion**  
Über 20 Jahre Erfahrung in der  
Massenspektrometrie

*Hohe Flexibilität*

- ✓ Monitoring von chemischen Reaktionen
- ✓ Direkte Identifizierung von TLC-Banden in 30 Sekunden
- ✓ Identifizierung chemischer Komponenten
- ✓ Schnelle Identifizierung mittels FIA/CMS in weniger als 30 Sekunden
- ✓ Reinigung von Zielsubstanzen
- ✓ Nachweis von Verunreinigungen



Preiswert

Kompakt.  
Schnell.  
Unkompliziert  
‐ Erschwinglich!