

Strukturen der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Klasse B: Perspektiven für die Arzneimittelforschung

Felix Hausch*

Professor Florian Holsboer gewidmet

Glucagon · GPCRs · Rezeptoren · Strukturaufklärung · Wirkstoff-Design

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind die wichtigsten Wirkstoffziele für Arzneimittel. Die Strukturbioologie der GPCRs hat in den letzten fünf Jahren eine Revolution erlebt, die 2012 im Nobelpreis für Chemie gipfelte.^[1] Während sich für die Mehrheit der GPCRs (GPCRs der Klasse A) inzwischen ein strukturelles Grundmuster abzeichnet,^[2] sind die entfernten Verwandten der Klasse B GPCRs strukturell noch kaum verstanden. In zwei wegweisenden Veröffentlichungen präsentieren Hollenstein et al. und Siu et al. nun die ersten Klasse-B-GPCR-Strukturen und liefern damit die ersten hochauflösten Momentaufnahmen für diese molekularen Signaltransduktionsmaschinen.^[3,4]

GPCRs der Klasse B sind eine kleine, aber klinisch höchst relevante Untergruppe der GPCR-Familie. Der Mensch hat 15 Rezeptoren der Klasse B, die alle auf lange Peptidhormone ansprechen. Diese endokrinen Faktoren sind Schlüsselregulatoren für das Glucosegleichgewicht, die Knochenerhaltung oder die Bewältigung von Stress. Das Parathyroid-Hormon, das Glucagon-ähnliche Peptid oder Analoga davon werden klinisch zur Behandlung von Osteoporose oder Diabetes eingesetzt, während Antagonisten der Rezeptoren für Glucagon, für das Calcitonin-Gene-Related Peptide oder für den Corticotropin-freisetzenenden Faktor eingesetzt werden, um Diabetes, Migräne oder Depression zu behandeln. Trotz erheblicher Forschungsbemühungen vonseiten der Pharmaindustrie war es bisher schwierig, medikamentenähnliche nicht-peptidische Liganden für die GPCRs der Klasse B zu entwickeln. Dies wurde auf eine Klasse-B-typische Bindungstasche zurückgeführt, von der man annahm, dass sie flacher als die von monoaminergen GPCRs der Klasse A sei.

Ein großes Problem bei der GPCR-Kristallographie besteht darin, die üblicherweise sehr dynamischen Proteine in einem funktionellen, stabilen Zustand zu fixieren, und dies gilt auch für GPCRs der Klasse B. Hollenstein et al. und Siu et al. erreichten diese Fixierung für den Rezeptor des Corticotropin-freisetzenenden Faktors (CRF₁R) bzw. den Glucagon-Rezeptor (GCGR), indem sie die Transmembrandomäne

dieser Rezeptoren verkürzten (z.B. indem sie die für Klasse-B-GPCRs typische extrazelluläre Domäne entfernen) und sie an gut kristallisierbare Helperproteine kuppelten. Beide Gruppen stabilisierten die Rezeptoren auch mit hochaffinen Antagonisten, die für diese beiden GPCRs der Klasse B verfügbar waren. Hollenstein et al. führten ferner zwölf thermostabilisierende Punktmutationen ein, die die inaktive Konformation des CRF₁R stabilisierten.

Die wichtigsten Erkenntnisse aus den beiden neuen Kristallstrukturen sind Klasse-B-spezifische Strukturdetails, die sowohl CRF₁R als auch GCGR aufweisen und in denen sich beide von den typischen GPCR-Motiven der Klasse A unterscheiden. Die beiden Strukturen offenbaren auch eine Reihe von Wechselwirkungen zwischen den transmembranären Helices in der Nähe des Zytosplasmas, die in beiden Klasse-B-GPCR-Strukturen ähnlich sind und wahrscheinlich ein Klasse-B-spezifisches Motiv repräsentieren. Der auffälligste Unterschied zu den GPCRs der Klasse A ist eine mehr V-förmige Topologie der transmembranären Helices, die eine breite Spalte erzeugt, die zum extrazellulären Raum hin offen ist und vermutlich eine Bindungstasche der Peptidhormone darstellt. Diese Anordnung der extrazellulären Hälften der transmembranären Helices war überraschend und konnte nicht durch Homologiemodelle, die auf kristallisierten GPCRs der Klasse A basierten, vorausgesagt werden. Die größere Bindungstasche der beiden Klasse-B-GPCRs liefert zu einem gewissen Grad eine Erklärung, warum es bisher so schwierig war, Liganden für diese Proteine zu finden. Die mutmaßliche Peptidbindungstasche ist jedoch auch tiefer als erwartet und zeigt zusätzliche Untertaschen, die als neue Ausgangspunkte für ein rationales Design oder ein verfeinertes Computer-gestütztes Screening von Klasse-B-GPCR-Liganden fungieren könnten.

Besonders aufschlussreich bei der CRF₁R-Struktur ist der detaillierte Einblick in den Bindungsmodus des nicht-peptidischen Antagonisten CP-376395 (Abbildung 1a). Dieser Antagonist bindet in einer Tasche nahe der zytoplasmatischen Seite, weit entfernt von den typischen Ligandenbindungsstellen in Klasse-A-GPCRs und weit von der mutmaßlichen Bindungsstelle des nativen Liganden CRF. Dies belegt, dass die vorherrschende Klasse von CRF₁R-Antagonisten, wie CP-376395, in der Tat allosterische Modulatoren sind. Die rundum abgeschirmte Bindungsstelle erklärt auch die langsame Dissoziation vieler CRF₁R-Liganden.^[5] Der gefundene Bindungsmodus von CP-376395 mahnt ferner zur Vorsicht

[*] Dr. F. Hausch
AG Chemical Genomics
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
Kraepelinstraße 2, München (Deutschland)
E-Mail: hausch@mpipsykl.mpg.de
Homepage: <http://www.mpipsykl.mpg.de/en/research/groups/hausch/index.html>

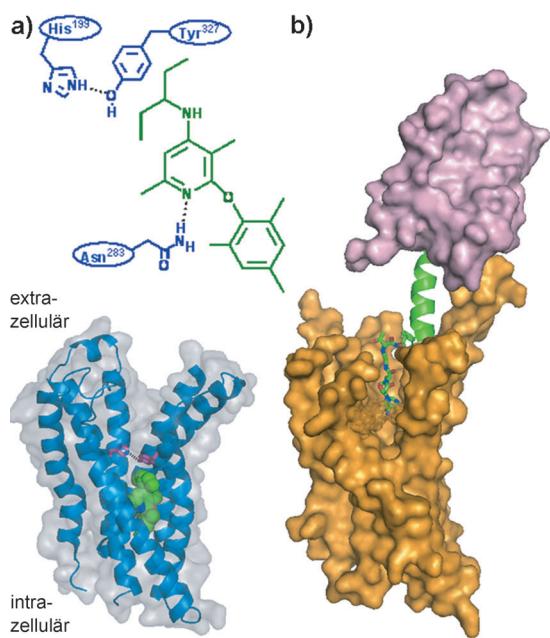


Abbildung 1. Strukturen der Transmembran-Domänen von Klasse-B-GPCRs im Kristall. a) Die Helices des Rezeptors für den Corticotropin-freisetzen Faktor (CRF₁R) sind in Blau gezeigt, die Oberfläche ist transparent in Grau angedeutet. Der allosterisch gebundene nicht-peptidische Antagonist CP-376395 ist als grünes Kalottenmodell hervorgehoben. Die Aminosäurereste His199 und Tyr327, die die Bindungsstelle des Antagonisten von der mutmaßlichen Peptidbindungsstelle trennen, sind als pinkfarbene Stäbe dargestellt. Die chemische Struktur von CP-376395 und die wichtigsten Interaktionen mit CRF₁R sind oberhalb schematisch gezeigt. b) Die Oberfläche der kristallisierten transmembranären Domäne des Glucagon-Rezeptors (GCGR) ist in Hellorange abgebildet. Die Aminosäurereste W304, R308, F365 und A366 sind transparent dargestellt, um einen Blick auf den mutmaßlichen Peptidbindungsmodus im Inneren des GCGR zu ermöglichen. Die modellierte extrazelluläre Domäne ist in Rosa abgebildet. Der C-Terminus des modellierten gebundenen Liganden Glucagon ist als grüne α -Helix dargestellt, der modellierte N-Terminus, der die transmembranäre Domäne aktiviert, in Form grüner Stäbe. Das in Lit. [4] beschriebene GCGR-Glucagon-Modell wurde freundlicherweise von Stevens und Mitarbeitern zur Verfügung gestellt.

beim Heranziehen von Mutagenesedaten für Homologiemodellierungsstudien. Für CRF₁R gibt es ein bemerkenswert klares Pharmakophor-Motiv und eine definierte Punktmutation (His199Val), von der man dachte, sie würde eine essentielle Wasserstoffbrücke zu einem unveränderlichen Wasserstoffakzeptor der Antagonisten aufheben.^[6] Es zeigte sich, dass His199 weit vom Antagonisten entfernt ist und stattdessen die Konformation von Tyr327 stabilisiert, das seinerseits mit dem Isopentyl-Rest von CP-376395 wechselwirkt. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass Substituenten in dieser „Top-Gruppen“-Position bei CRF₁R-Antagonisten relativ variabel sind,^[6] sodass mit anderen Liganden andere Konformationen rund um His199 und Tyr327 möglich sein können.

Während sich die Konformationen der transmembranären Helices nahe dem Zytosol bei CRF₁R und GCGR sehr ähneln (im Einklang mit ihrer gemeinsamen Funktion, dieselben G-Proteine zu aktivieren), zeigen sich substantielle

Abweichungen in den extrazellulären Schleifen und den anschließenden α -helicalen Segmenten. Kristallstrukturen weiterer Klasse-B-GPCRs sind nötig, um zu klären, ob dies in einer höheren Flexibilität der extrazellulären Hälften der Klasse-B-GPCRs begründet ist oder ob dies dauerhafte Unterschiede zwischen CRF₁R und GCGR widerspiegeln.

Die vorliegenden Strukturen repräsentieren CRF₁R und GCGR vermutlich in ihrer inaktiven Konformation. Die wichtigste offene Frage ist nun, wie diese Rezeptoren aktiviert werden. Als ersten Schritt in diese Richtung erstellten Siu et al. ein Modell des aktivierte GCGR, das auf ihrer GCGR-Struktur, (Co-)Kristallstrukturen der extrazellulären Domänen mit und ohne gebundenen Peptidliganden, Vernetzungsstudien und einer beeindruckenden Serie von Mutagenesedaten beruhte. Ihr Modell lässt darauf schließen, dass der für die GCGR-Aktivierung verantwortliche Teil des Glucagons eine ausgestreckte Konformation annimmt (Abbildung 1 b). Dies ähnelt der Art und Weise, wie das Peptid Neurotensin an seinen Rezeptor NTS1 bindet.^[7] Für das N-terminale Histidin wird dabei vorhergesagt, dass es ähnlich tief in den Rezeptor vordringt, wie bei kleinen Liganden von Klasse-A-GPCRs beobachtet wurde.^[2] Während dieses Modells für GCGR plausibel ist, könnte der Aktivierungsmodus von CRF₁R leicht variieren. Gegenüber dem GCGR-Agonisten Glucagon hat CRF eine N-terminale Erweiterung,^[8] die nicht zur CRF₁R-Aktivierung beiträgt.^[9a] Statt tief im Inneren des Rezeptors zu binden, könnte der extreme N-Terminus von CRF daher eher zurück- und aus der Bindungstasche herausfallen. Diese Hypothese ist in Einklang mit der von Hollenstein et al. beobachteten mutmaßlichen Bindungsstelle von CRF₁R, die weiter ist als bei GCGR und eine derartige Haarnadel-ähnliche Konformation ermöglichen würde.

Nicht-peptidische Agonisten für GPCRs der Klasse B, z. B. den Rezeptor des Glucagon-ähnlichen Peptids 1, wären klinisch wertvoll. Für ihr präzises rationales Design wird die Struktur eines Klasse-B-GPCR im Agonisten-gebundenen Zustand benötigt. Diese Aufgabe wird durch den speziellen Mechanismus der Klasse-B-GPCRs erschwert, die in zwei Stufen aktiviert werden.^[9] Zuerst bindet der C-terminale Teil der Peptidliganden hochaffin an die extrazelluläre Domäne (das Markenzeichen von Klasse-B-GPCRs). Der zweite N-terminale Teil der Peptidliganden bindet dann an die transmembranäre Domäne und leitet die Strukturumlagerungen ein, die zur Aktivierung von G-Proteinen innerhalb der Zelle führen. Diese zweite Wechselwirkung ist schwächer, und in der Regel liegt jeweils nur ein Bruchteil der GPCRs in der vollständig aktivierte Form vor. Um einen gleichförmig aktivierte GPCR der Klasse B zu erhalten, wird es daher nötig sein, diesen aktivierte Status zu stabilisieren, z. B. durch Mutationen oder gegebenenfalls durch Komplexbildung mit G-Proteinen. Um den spezifischen Anforderungen bei Klasse-B-GPCRs zu begegnen, könnten zusätzlich eine Stabilisierung der korrekten Ausrichtung der extrazellulären und der transmembranären Domäne, die Präorganisation des Peptidliganden und/oder die Verbesserung seiner Affinität für die transmembranäre Domäne nötig sein.

Eingegangen am 27. August 2013
Online veröffentlicht am 11. Oktober 2013

- [1] a) F. Hausch, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3360–3362; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3314–3316; b) F. Hausch, F. Holsboer, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12338–12341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12172–12175; c) R. J. Lefkowitz, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6494–6507; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6366–6378; d) B. Kobilka, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6508–6517; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6380–6388.
- [2] a) A. J. Venkatakrishnan, X. Deupi, G. Lebon, C. G. Tate, G. F. Schertler, M. M. Babu, *Nature* **2013**, *494*, 185–194; b) V. Katritch, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 531–556.
- [3] K. Hollenstein, J. Kean, A. Bortolato, R. K. Y. Cheng, A. S. Dore, A. Jazayeri, R. M. Cooke, M. Weir, F. H. Marshall, *Nature* **2013**, *499*, 438–443.
- [4] F. Y. Siu, M. He, C. de Graaf, G. W. Han, D. Yang, Z. Zhang, C. Zhou, Q. Xu, D. Wacker, J. S. Joseph, W. Liu, J. Lau, V. Cherezov, V. Katritch, M.-W. Wang, R. C. Stevens, *Nature* **2013**, *499*, 444–449.
- [5] a) S. J. Ramsey, N. J. Atkins, R. Fish, P. H. van der Graaf, *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 992–1007; b) B. A. Fleck, S. R. Hoare, R. R. Pick, M. J. Bradbury, D. E. Grigoriadis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *341*, 518–531.
- [6] a) E. P. Zorrilla, G. F. Koob, *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 371–383; b) M. Paez-Pereda, F. Hausch, F. Holsboer, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2011**, *20*, 519–535; c) J. Williams, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 1057–1068.
- [7] a) 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; b) F. Hausch, F. Holsboer, *Nature* **2012**, *490*, 492–493.
- [8] C. Parthier, S. Reedtz-Runge, R. Rudolph, M. T. Stubbs, *Trends Biochem. Sci.* **2009**, *34*, 303–310.
- [9] a) C. Devigny, F. Perez-Balderas, B. Hoogeland, S. Cuboni, R. Wachtel, C. P. Mauch, K. J. Webb, J. M. Deussing, F. Hausch, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8927–8933; b) S. R. J. Hoare, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 417–427.