

Ein photochromer Agonist für μ -Opioidrezeptoren**

Matthias Schönberger und Dirk Trauner*

Abstract: Opioidrezeptoren (ORs) sind im Gehirn, im Rückenmark und im Verdauungstrakt weit verbreitet und spielen eine wichtige Rolle in der Nozizeption. Alle bekannten ORs sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) der Familie A. Ein weiteres wichtiges Mitglied dieser großen Proteinfamilie, Rhodopsin, wird durch Licht über eine cis/trans-Isomerisierung eines kovalent gebundenen Chromophors, nämlich Retinal, aktiviert. Wir zeigen nun, wie ein OR mit einem synthetischen Azobenzol-Photoschalter kombiniert werden kann und somit lichtempfindlich wird. Unsere Arbeit erweitert den Anwendungsbereich der Photopharmakologie und umreißt eine generelle Strategie, mit der GPCRs der Familie A, die einen Großteil wichtiger Wirkstofftargets ausmachen, in Photorezeptoren umgewandelt werden können.

Opioide gehören zu den nützlichsten Wirkstoffen, die der Menschheit zur Verfügung steht. Ihr bekanntester Vertreter, Morphin (Abbildung 1 A), wird seit der Antike genutzt, um Schmerzen zu lindern und Euphorie zu erzeugen.^[1,2] Mit der Entwicklung der modernen organischen Chemie wurden zahlreiche synthetische und semisynthetische Opiode hergestellt, von denen einige die pharmakologische Charakterisierung verschiedener Rezeptorsubtypen ermöglicht haben.^[3,4] Später wurden diese Transmembranproteine durch Klonierung systematisch charakterisiert. Heute sind vier verschiedene Klassen von Opioidrezeptoren (OR) bekannt, nämlich δ , μ , κ und NOP, deren Strukturen allesamt mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden sind.^[5–10] Die Kristallstruktur des μ -Opioidrezeptors (MOR) mit seinem kovalent gebundenen Antagonisten β -Funaltrexamin lieferte wertvolle Einblicke in den Bindungsmodus von Morphin und seiner Derivate und ermöglichte es, einige der Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erklären, die in den letzten Jahrzehnten beobachtet wurden (Abbildung 1).

Opiatrezeptoren gehören zu der Familie A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), zu der viele wichtige Wirkstofftargets zählen.^[11–13] Diese GPCRs sind eng mit den Opsin-Photorezeptoren verwandt, die das Sehen ermöglichen und unseren circadianen Rhythmus steuern.^[14] Der MOR ist das primäre Target des Morphins und wird endogen von

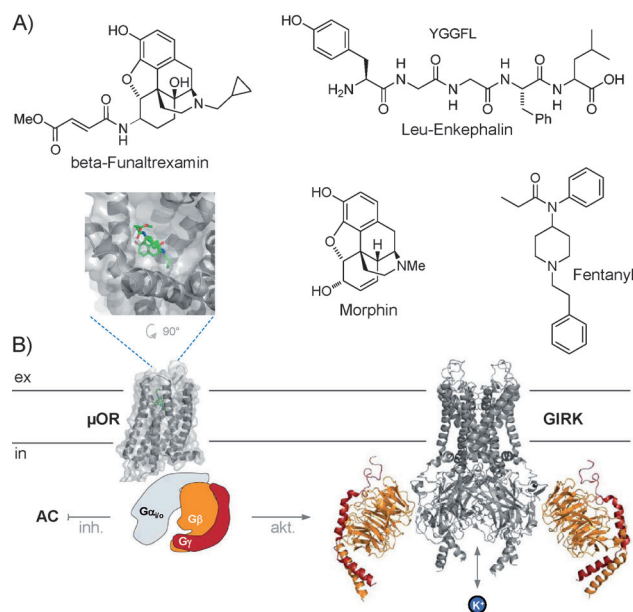


Abbildung 1. Pharmakologie, Struktur und Funktion des μ -Opioidrezeptors (MOR). A) MOR-Liganden: Beta-Funaltrexamin ist ein kovalent gebundener Agonist. Sein Bindungsmodus ist in der Vergrößerung gezeigt. Leu-Enkephalin (LE) ist ein endogener Ligand, Morphin und Fentanyl sind natürliche bzw. synthetische Agonisten. B) MOR-Funktion: Nach Bindung des Agonisten wirkt MOR als Nukleotidaustauschfaktor an heterotrimeren $G_{i/o}$ -G-Proteinen, was die Dissoziation der G_α - und $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten zur Folge hat. Während G_α einen inhibitorischen Effekt auf die Adenylcyclase (AC) hat, aktiviert der $G_{\beta\gamma}$ -Komplex G-Protein-gekoppelte einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (GIRK-Kanäle). Beide Modi führen zu verringerter neuronaler Aktivität.

Oligopeptiden wie Leu-Enkephalin (LE), β -Endorphin und den Dynorphinen aktiviert.^[15,16] Nach Bindung solch eines Agonisten katalysiert der Rezeptor intrazellulär den Zerfall von heterotrimeren $G_{i/o}$ -Proteinen in ihre G_α - und $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten (Abbildung 1 B). Erstere inhibieren die Adenylcyclase, was in einer Verringerung des cAMP-Spiegels resultiert, während letztere G-Protein-gekoppelte einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (GIRK-Kanäle) aktiviert.^[17] Beide Vorgänge resultieren direkt oder indirekt in Hyperpolarisation und damit in verminderter neuronaler Erregbarkeit.^[15,18]

In Anbetracht der medizinischen Relevanz der Opiode und ihres Missbrauchspotenzials ist die Entwicklung neuer Agonisten und Antagonisten für ORs nach wie vor ein sehr aktives Forschungsgebiet. Eines der wichtigsten Ziele dabei ist es zum Beispiel, die gewünschte analgetische Wirkung von der unerwünschten euphorisierenden und abhängigmachenden zu trennen. Ein weiterer interessanter Ansatz ist es, die hohe Präzision von Licht zu nutzen, um die biologische Funktion endogener Opiode und deren Rezeptoren aufzu-

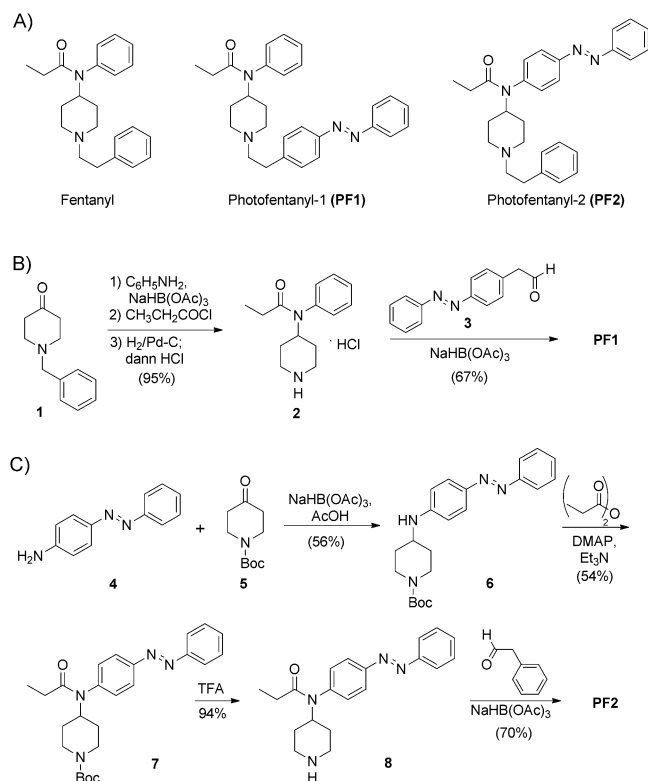
[*] M. Schönberger, Prof. D. Trauner
Department Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)
München und Center of Integrated Protein Science
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: dirk.trauner@lmu.de

[**] Wir danken Dr. Matthew Banghart (Harvard University) für erste pharmakologische Tests von PF2 und Diskussionen. M.S. dankt der Studienstiftung des Deutschen Volkes für ein Promotionsstipendium. Diese Arbeit wurde von der European Science Foundation unterstützt (ERC-Fördernummer 268795 für D.T.).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309633> zu finden.

klären. Erst kürzlich wurden photoaktivierbare Versionen der Enkephaline beschrieben, mit denen sich die zeitliche und räumliche Wirkung von Neuropeptiden im Gehirn untersuchen ließ.^[19] Des weiteren wurde ein photoaktivierbares Naloxonderivat genutzt, um die Desaktivierungskinetik von Opioiden zu bestimmen.^[20] Allerdings wurden bis dato keine photoschaltbaren Opiode beschrieben, d.h. Verbindungen, die reversibel mit Licht sowohl an- als auch ausgeschaltet werden können. Wir stellen nun ein Azobenzolderivat des potenten OR-Agonisten Fentanyl vor, das dazu verwendet werden kann, den MOR reversibel mit Licht zu kontrollieren.^[21]

Nachdem wir ursprünglich Morphin in Betracht gezogen hatten,^[22,23] wurde letztendlich Fentanyl als Ausgangsmolekül für das Design unserer photochromen Liganden (PCLs) gewählt. Ausschlaggebend dafür waren vor allem dessen Potenz, seine vergleichsweise simple chemische Struktur und die beiden endständigen Phenylringe, die sich zu Azobenzol-Photoschaltern erweitern lassen. Wie im Fall anderer PCLs musste der Photoschalter derart installiert werden, dass die biologische Aktivität des Liganden nicht vollständig verloren geht, sich seine Wirksamkeit aber durch Photoisomerisierung maximal ändert.^[21] Schema 1 zeigt die Struktur zweier Kandidaten, Photofentanyl-1 (**PF1**) und Photofentanyl-2 (**PF2**), die von uns entworfen, synthetisiert und hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht wurden.



Schema 1. PCL-Design und -Synthese. A) Das synthetische Opioid Fentanyl diente als Ausgangsstruktur für die photochromen MOR Agonisten **PF1** und **PF2**. B) Die **PF1**-Synthese startete mit *N*-Benzylpiperidon (**1**), welches reductiv aminiert, acyliert, entschützt und in einer weiteren reductiven Aminierung mit dem Aldehyd **3** gekuppelt wurde. C) Die **PF2**-Synthese beinhaltet eine reductive Aminierung, eine Acylierung, eine Entschätzung und eine weitere reductive Aminierung.

Die Synthese von **PF1** startete mit käuflich erwerblichem *N*-Benzylpiperidon (**1**), das zunächst einer reductiven Aminierung mit Anilin unterzogen wurde. Die darauffolgende Acylierung und Entschätzung ergab das Piperidin **2** (siehe Schema 1 und die Hintergrundinformationen). Eine weitere reductive Aminierung mit dem bekannten Azobenzolaldehyd **3**^[24] lieferte schließlich **PF1**. Die Synthese von **PF2** startete mit kommerziell erwerblichem *N*-Boc-Piperidon (**5**), das einer reductiven Amination mit 4-Aminoazobenzol (**4**) unterzogen wurde, woraus das 4-Aminopiperidin **6** hervorging. Eine Acylierung mit Propionsäureanhydrid ergab dann Propionamid **7**. Eine saure Entschätzung gefolgt von einer reductiven Aminierung des resultierenden Piperidins **8** mit Phenylacetaldehyd lieferte schließlich **PF2**.

Erste pharmakologische Tests zeigten, dass **PF2** ein exzellenter μ OR-Agonist ist. **PF1** hingegen hatte keinerlei agonistischen Effekt am MOR. Wir fokussierten daher unsere weitere physikalische und biologische Charakterisierung auf **PF2**.

Mithilfe von UV/Vis-Spektroskopie konnte festgestellt werden, dass **PF2** alle Kennzeichen eines „regulären“ Azobenzols aufweist. Wie in Abbildung 2 illustriert, überlagern sich die $\pi \rightarrow \pi^*$ - und $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge kaum, was ein sauberes Photoschalten durch Bestrahlung mit 420 nm bzw. 340 nm ermöglicht (Abbildung S1). Darüber hinaus zeigte sich, dass **PF2** in seiner *cis*-Form thermisch stabil in Ringer-Lösung ist (Abbildung 2B). Selbst nach einer Verweildauer

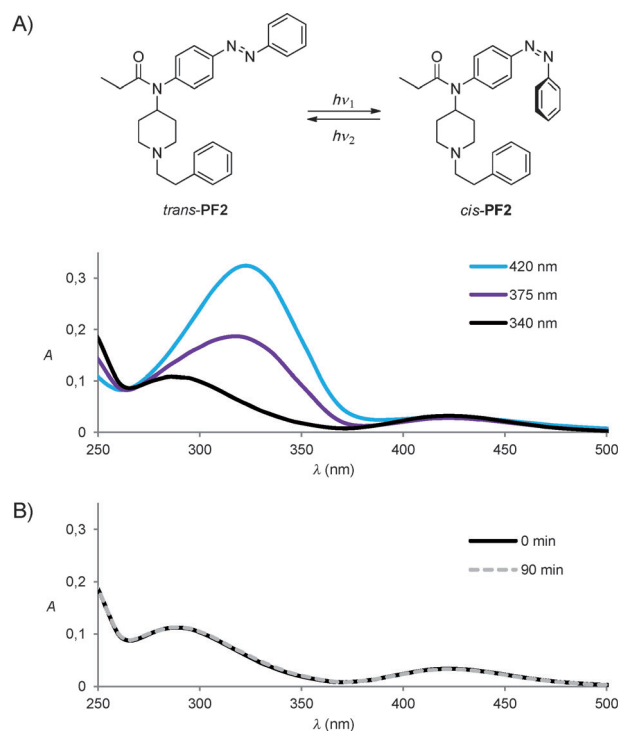


Abbildung 2. Photoschalten und thermische Stabilität von **PF2**. A) Die lichtinduzierte Isomerisierung kann mit UV/Vis-Spektroskopie verfolgt werden. Bestrahlung einer 50- μ M-Lösung von **PF2** in einem Ringer-Puffer mit verschiedenen Wellenlängen führt zu stark verschiedenen Absorptionsspektren. B) **PF2**, das zuvor nach *cis* geschaltet wurde, verharrt über Stunden in dieser Form.

von 90 min im Dunklen konnte praktisch keine Rückisomerisierung zu seiner *trans*-Form beobachtet werden. Diese Eigenschaft könnte vor allem für physiologische Experimente von Nutzen sein, wo lange Bestrahlungszeiten unerwünscht sein könnten. Als nächstes richteten wir unser Augenmerk auf die funktionelle Charakterisierung von **PF2**. GPCRs können mit mannigfaltigen Methoden untersucht werden; wir bedienten uns der Elektrophysiologie, unter anderem wegen ihrer Kompatibilität mit optischer Aktivierung (Abbildung 3).^[26] Zu diesem Zweck wurde der humane MOR zu-

Kombinationen aus GPCRs und Agonisten bekannt ist, wurde nicht beobachtet.^[17]

Die wiederholte Photoaktivierung von MOR mit **PF2** ist in Abbildung 3B–D illustriert. Ein Vergleich der Stromamplitude dreier aufeinanderfolgender Photoaktivierungen mit der darauffolgenden Aktivierung derselben Zelle mit einer sättigenden Konzentration an LE zeigte, dass die Photoströme etwa 80 % des LE-Stroms ausmachen (Abbildung 3C,D und Abbildung S2). Die Photoaktivierung konnte mehrfach wiederholt werden, was die Stabilität des Systems unter-

streicht (Abbildung 3D). Da **PF2** als *trans*-Agonist agiert, ist das pharmakologisch aktive Isomer gleichzeitig das thermodynamisch stabilere. Jedoch kann die Bestrahlung mit 360 nm zur Desaktivierung minimiert werden, da *cis*-**PF2** unter physiologischen Bedingungen stabil bleibt (Abbildung S3). Die Zeitskala für Aktivierung und Desaktivierung entsprach generell derjenigen, die für einen metabotropen Rezeptor erwartet werden kann.^[26] Da die Photoisomerisierung von Azobenzolen im Sub-ms-Bereich vonstatten geht^[21] und MOR-Liganden rasch dissoziieren,^[19] kann angenommen werden, dass die Geschwindigkeit der Aktivierung und Desaktivierung von der Kinetik der Signalkaskade bestimmt wird, die den GPCR mit dem Ionenkanal verbindet.

Wir haben kürzlich kovalent gebundene photochrome Liganden (PTLs) vorgestellt, die mit einem GPCR aus der Familie C, nämlich dem metabotropen Glutamaterezeptor, verknüpft sind.^[26] Dieses System mit dem Namen LimGluR wurde unter anderem dazu genutzt, um neuronale Aktivität effektiv mit Licht zu kontrollieren. Unsere hier vorgestellten Ergebnisse ermöglichen es nun, dieses Konzept auf einen GPCR der Familie A zu übertragen. Diese „LiGPCRs“ könnten eine wertvolle Alternative zu den genetisch kodierten lichtemp-

findlichen GPCRs (Opto-XRs) darstellen, die auf einer Chimäre aus Rhodopsin und anderen GPCRs der Familie A beruhen.^[25]

Zusammengefasst haben wir eine Methode entwickelt, um MORs durch die Wirkung eines photochromen Liganden, **PF2**, mit Licht zu kontrollieren. In gewisser Hinsicht überträgt unser PCL die Logik des Rhodopsins auf einen nicht lichtempfindlichen GPCR der Familie A. Rhodopsin ist ein Mitglied dieser Transmembranproteinklasse, das sich des Retinals als kovalent gebundenen photoschaltbaren inversen Agonisten bedient. Unsere Arbeit eröffnet damit einen generellen chemischen Weg, andere GPCRs der Familie A, z. B. Dopaminrezeptoren oder adrenerge Rezeptoren, in Photorezeptoren zu überführen. Damit legen wir das Fundament für eine generelle Photopharmakologie dieser wichtigen Proteine. **PF2** selbst könnte dazu genutzt werden, die Rolle von ORs in verschiedenen Hirnregionen und in der Peripherie mit hoher räumlicher und zeitlicher Präzision zu untersuchen. Sein Einsatz in den Neurowissenschaften und seine mögliche

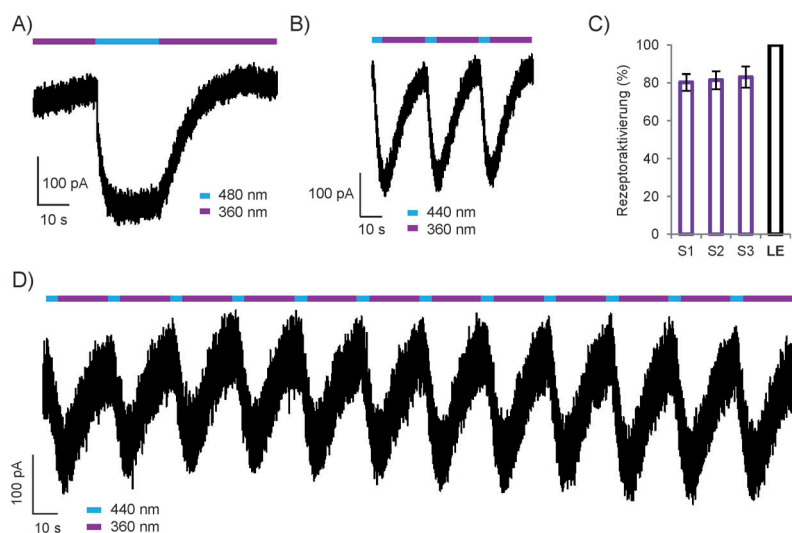


Abbildung 3. Lichtabhängige Aktivierung von MOR durch **PF2**. HEK293t-Zellen wurden transient mit dem humanen MOR und sowohl GIRK1 als auch GIRK2 transfiziert. A) Bestrahlung einer 25 µM Lösung von **PF2** mit 360 nm hält das System in einem inaktiven Zustand. Umschalten auf 480 nm aktiviert den Rezeptor umgehend. B) Schnelle, wiederholte Photoaktivierung von GIRK durch MOR und **PF2**. C) Vergleich von gemittelter Photostromamplitude mit darauffolgender Stimulation mit 10 µM LE ($n = 11$, Fehlerbalken: \pm SEM). D) Photoschalten über eine Vielzahl von Zyklen.

sammen mit GIRK1 und GIRK2 in HEK293t-Zellen exprimiert.^[17] Diese GIRKs sind typische Effektoren der $G_{i/o}$ -Signalkaskade und native Signalfunktionäre der MORs im locus coeruleus.^[18,27] Eine Konzentration von 25 µM **PF2** erwies sich als optimal zum Photoschalten. Abbildung 3A zeigt, dass *trans*-**PF2**, das im Dunkeln oder bei 420–480 nm Bestrahlung vorliegt, ein effektiver Agonist am MOR ist. Dagegen ist *cis*-**PF2**, das bei Bestrahlung mit 360 nm dominiert, wesentlich weniger aktiv. Infolgedessen führt ein Umschalten von 360 nm zu blauem Licht zu einem sofortigen Kaliumstrom durch GIRKs (bei Verwendung einer hohen externen Kaliumkonzentration). Dieser Prozess konnte durch Zurückschalten auf 360 nm beendet werden, was die MOR-Aktivierung unterbindet. Das Aktionsspektrum von **PF2** zwischen 400 und 500 nm ist in den Hintergrundinformationen abgebildet (Abbildung S1). GIRK-Ströme versiegen, wenn β -G-Proteine mit inaktiven, GDP-gebundenen $G_{i/o}$ -Untereinheiten reassoziieren. Interessanterweise bleiben GIRK-Ströme, die durch *trans*-**PF2** ausgelöst werden, auf hohem Niveau. Eine Desensibilisierung des Systems, wie sie für andere

Anwendung als „Photoanalgetikum“, vermutlich als rotverschobene Variante, werden derzeit untersucht.

Eingegangen am 5. November 2013,
veränderte Fassung am 4. Dezember 2013
Online veröffentlicht am 12. Februar 2014

Stichwörter: Azobenzole · Fentanyl · Opioidrezeptoren ·
Photopharmakologie · Photoschalter

-
- [1] H. Kalant, *Addiction* **1997**, 92, 267.
 [2] C. B. Pert, S. H. Snyder, *Science* **1973**, 179, 1011.
 [3] W. F. Simonds, *Endocr. Rev.* **1988**, 9, 200.
 [4] Y. S. Lee, J. Nyberg, S. Moye, R. S. Agnes, P. Davis, S. W. Ma, J. Lai, F. Porreca, R. Vardanyan, V. J. Hruby, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2161.
 [5] P. L. Wood, *Neuropharmacology* **1982**, 21, 487.
 [6] M. Filizola, L. A. Devi, *Nature* **2012**, 485, 314.
 [7] S. Granier, A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, W. I. Weis, B. K. Kobilka, *Nature* **2012**, 485, 400.
 [8] 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.
 [9] A. A. Thompson, W. Liu, E. Chun, V. Katritch, H. Wu, E. Vardy, X. P. Huang, C. Trapella, R. Guerrini, G. Calo, B. L. Roth, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Nature* **2012**, 485, 395.
 [10] H. Wu, D. Wacker, M. Mileni, V. Katritch, G. W. Han, E. Vardy, W. Liu, A. A. Thompson, X. P. Huang, F. I. Carroll, S. W. Mascarella, R. B. Westkaemper, P. D. Mosier, B. L. Roth, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Nature* **2012**, 485, 327.
 [11] R. Fredriksson, H. B. Schiöth, *Mol. Pharmacol.* **2005**, 67, 1414.
 [12] M. C. Lagerström, H. B. Schiöth, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, 7, 339.
 [13] K. L. Pierce, R. T. Premont, R. J. Lefkowitz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 639.
 [14] K. P. Hofmann, P. Scheerer, P. W. Hildebrand, H. W. Choe, J. H. Park, M. Heck, O. P. Ernst, *Trends Biochem. Sci.* **2009**, 34, 540.
 [15] M. Connor, M. J. Christie, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1999**, 26, 493.
 [16] H. H. Loh, A. P. Smith, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1990**, 30, 123.
 [17] E. A. Johnson, S. Oldfield, E. Braksator, A. Gonzalez-Cuello, D. Couch, K. J. Hall, S. J. Mundell, C. P. Bailey, E. Kelly, G. Henderson, *Mol. Pharmacol.* **2006**, 70, 676.
 [18] R. A. North, J. T. Williams, A. Surprenant, M. J. Christie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 5487.
 [19] M. R. Banghart, B. L. Sabatini, *Neuron* **2012**, 73, 249.
 [20] M. R. Banghart, J. T. Williams, R. C. Shah, L. D. Lavis, B. L. Sabatini, *Mol. Pharmacol.* **2013**, 84, 687.
 [21] T. Fehrentz, M. Schonberger, D. Trauner, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 12362; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 12156.
 [22] J. Mulzer, G. Dürner, D. Trauner, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 3046; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2830.
 [23] G. W. Kirby, *Science* **1967**, 155, 170.
 [24] H. Muxfeldt, W. Rogalski, G. Klauenberg, *Chem. Ber.* **1965**, 98, 3040.
 [25] R. D. Airan, K. R. Thompson, L. E. Fenno, H. Bernstein, K. Deisseroth, *Nature* **2009**, 458, 1025.
 [26] J. Levitz, C. Pantoja, B. Gaub, H. Janovjak, A. Reiner, A. Hoagland, D. Schoppik, B. Kane, P. Stawski, A. F. Schier, D. Trauner, E. Y. Isacoff, *Nat. Neurosci.* **2013**, 16, 507.
 [27] R. Sadja, N. Alagem, E. Reuveny, *Neuron* **2003**, 39, 9.
-