

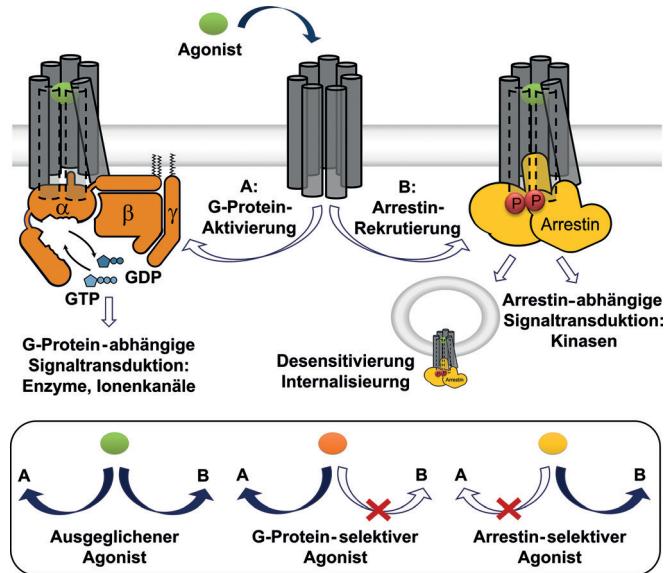
# Die Rhodopsin-Arrestin-Kristallstruktur und ihre Bedeutung für die Entwicklung funktionell selektiver GPCR-Wirkstoffe

Dorothee Möller und Peter Gmeiner\*

Arrestin · G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ·  
 Membranproteine · Proteinstrukturen · Rhodopsin

**G**-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bilden eine Gruppe von Membranproteinen mit sieben transmembranären Helices, die Signale aus dem extrazellulären Raum ins Zellinnere übertragen. GPCRs sind in der Lage, Photonen, kleine Moleküle oder komplexe Proteine als spezifische Stimuli zu erkennen.<sup>[1]</sup> Der hohe Anteil von mehr als 30 % der zugelassenen Medikamente, die GPCRs adressieren, unterstreicht ihre Schlüsselrolle für physiologische Prozesse. Während die Entwicklung neuer Wirkstoffe ursprünglich ausgehend von bereits bekannten Liganden erfolgte, können Medizinalchemiker inzwischen auf hochauflöste GPCR-Strukturen zurückgreifen.<sup>[2]</sup> Auf Grundlage von Kristallstrukturen Antagonist-gebundener GPCRs wurde so das strukturbasierte Design neuer, Rezeptor-blockierender Liganden ermöglicht. Darüber hinaus konnten Kristalle von GPCR-Agonist-Komplexen durch die Verwendung kovalenter Liganden erhalten werden.<sup>[3]</sup> Um Kristallstrukturen vollständig aktivierter Rezeptoren zu erhalten, war es notwendig, einen ternären Komplex aus Agonist, Rezeptor und G-Protein oder einem G-Protein-imitierenden Nanobody (kameliide Einzeldomänen-Antikörper) zu stabilisieren.<sup>[4]</sup>

Die GPCR-vermittelte Signalübertragung durch heterotrimere G-Proteine führt zur intrazellulären Modulation von Enzymen und Ionenkanälen. Diese Effektoren beeinflussen die Konzentration sekundärer Botenstoffe (z. B. cAMP, Ca<sup>2+</sup>), die schließlich den zellulären Effekt bestimmen. G-Proteine stellen jedoch nicht die einzigen intrazellulären Interaktionspartner dieser Rezeptoren dar (Abbildung 1) – vielmehr sind GPCRs auch in der Lage, Arrestine zu rekrutieren, was durch eine Phosphorylierung des Rezeptor-C-Terminus zusätzlich begünstigt wird. Während man ursprünglich davon ausging, dass Arrestine für die Desensitivierung und Internalisierung von Rezeptoren verantwortlich sind, hat sich inzwischen herausgestellt, dass sie auch als Signalüberträger fungieren. Somit sind Arrestine von erheblicher Bedeutung



**Abbildung 1.** Überblick über die GPCR-vermittelte Signalübertragung. Die Aktivierung des membranständigen Rezeptors kann zur Aktivierung von G-Proteinen oder/und zur Rezeptorphosphorylierung und Arrestinrekrutierung führen. Unten: mögliche Arten funktionell selektiver Signaltransduktion.

für verschiedene (patho)physiologische Prozesse.<sup>[5]</sup> Beispielsweise verursachen β-Arrestine die mit der Aktivierung von μ-Opioidrezeptoren verbundene Toleranzentwicklung.<sup>[6]</sup> Eine gezielte Beeinflussung der GPCR-Arrestin-Interaktion mithilfe maßgeschneiderter Liganden ist daher für Medizinalchemiker eine besonders interessante Aufgabe, die jedoch bisher durch das Fehlen einer Rezeptor-Arrestin-Kristallstruktur erschwert wurde.

Große Anstrengungen und wohlüberlegte Experimente verschiedener Forschergruppen waren notwendig, um die erste Kristallstruktur eines Arrestin-gebundenen GPCR zu erhalten. Erst kürzlich ist Xu und Kollegen der Durchbruch auf dem Weg zu hochauflösenden Kristallen des humanen Rhodopsins, eines GPCR zur Wahrnehmung von Licht, im Komplex mit visuellem Arrestin gelungen.<sup>[7]</sup> Um die Struktur zu lösen, mussten die Autoren eine Reihe von Hindernissen überwinden, die auf die kurzlebige Wechselwirkung zwischen

[\*] Dr. D. Möller, Prof. Dr. P. Gmeiner  
 Department Chemie und Pharmazie  
 Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg  
 Schuhstraße 19, 91052 Erlangen (Deutschland)  
 E-Mail: peter.gmeiner@fau.de

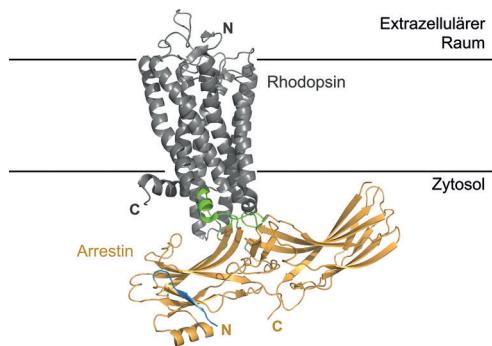
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201507724> zu finden.

GPCRs und Arrestinen zurückzuführen sind. Die Verwendung einer konstitutiv aktiven Rhodopsinmutante (E113Q, M257Y) garantierte selbst in Abwesenheit des kovalenten Agonisten *all-trans*-Retinal eine aktive Rezeptorkonformation während der Aufreinigung. Ebenso wurden drei Aminosäuren des Arrestins mutiert, um durch eine präaktivierte Arrestinkonformation die Notwendigkeit der Rezeptorphosphorylierung zu umgehen. Obwohl diese Maßnahmen die Wechselwirkung signifikant verbessern, war es zusätzlich notwendig, beide Proteine mithilfe einer Sequenz aus 15 Aminosäuren zu einem Fusionsprotein zu verknüpfen und durch eine weitere Fusion mit T4-Lysozym die Kristallbildung zu erleichtern. Da die erhaltenen Kristalle dennoch klein waren ( $5\text{--}15\ \mu\text{m}$ ), wurden die Beugungsdaten mithilfe serieller Femtosekunden-Kristallographie und eines Freie-Elektronen-Lasers (XFEL, Röntgenlaser) generiert. Diese neue Technik ermöglicht es, Beugungsmuster durch das Aufsummieren einzelner Laserimpulse einer Dauer von weniger als 50 Femtosekunden unter minimaler Kristallschädigung zu erhalten.<sup>[7]</sup>

Die Kristallstruktur offenbarte eine überraschende, asymmetrische Anordnung beider Proteine. Während die N-terminale Arrestindomäne und die zentrale „Kuppe“ direkt in die Rezeptorinteraktion involviert sind, weist der C-terminale „Flügel“ zur Zellmembran. Alaninmutationen in dieser Region demonstrieren zwar seine Bedeutung für die Arrestinerkennung,<sup>[8]</sup> der exakte Mechanismus ist allerdings noch ungeklärt. In hervorragender Übereinstimmung mit früheren präaktivierten Strukturen<sup>[9]</sup> weist die Arrestingeometrie eine  $20^\circ$ -Rotation der N- und C-Domänen gegenüber dem inaktiven Zustand auf.<sup>[7]</sup>

Die Wechselwirkung mit Arrestin führt auch zu Änderungen der Rhodopsinkonformation. Einige dieser Veränderungen, z.B. die  $10\ \text{\AA}$  große Auswärtsbewegung der Helix 6 (TM6) und die Verlängerung der TM5, gelten als typische Merkmale der Rezeptoraktivierung. Zudem stimmen diese Befunde mit den Beobachtungen an Metarhodopsin II im Komplex mit einem C-terminalen Peptid des G-Proteins Transducin ( $\text{G}\alpha\text{CT}$ ) überein.<sup>[10]</sup> Dennoch ist die TM6-Bewegung weniger ausgeprägt als im  $\beta 2$ -Adrenorezeptor- $\text{G}\alpha\text{S}$ -Komplex.<sup>[4a]</sup> Weitere Änderungen umfassen die Bildung einer kurzen Helix innerhalb der intrazellulären Schleife 2 (IL2) und Bewegungen der intrazellulären Helix 8 (H8) in der Nähe des Rezeptor-C-Terminus.

Die Kristallstruktur lieferte auch Einblicke in das Netzwerk der molekularen Interaktionen zwischen Rhodopsin und Arrestin. Die beobachteten Kontaktregionen wurden zusätzlich mittels DEER-Spektroskopie, H/D-Austausch-Experimenten und durch Disulfid-Vernetzung validiert. In Übereinstimmung mit früheren Befunden<sup>[9]</sup> wurden die Schleifen zwischen den einzelnen  $\beta$ -Faltblattstrukturen des Arrestins (Finger Loop, Middle Loop, Back Loop und C-Loop) und ein angrenzendes  $\beta$ -Faltblatt als entscheidende Interaktionspartner identifiziert (Abbildung 2). Die Kontaktstellen im Rhodopsin umfassen verschiedene Bereiche der inneren Rezeptoroberfläche. Vor allem der IL2, der C-terminale Teil der TM7, der N-terminale Teil von H8 und die unteren Abschnitte der Helices 5 und 6 sowie deren Verbindung über IL3 tragen zur Arrestinbindung bei. Da für den



**Abbildung 2.** Die Kristallstruktur des Rhodopsin-Arrestin-Komplexes: Schlüsselregionen der Interaktion im Arrestin sind grün dargestellt. Die wahrscheinliche Interaktionsstelle mit dem Rezeptor-C-Terminus (nicht aufgelöst) ist blau eingefärbt. PDB-Code: 4ZWJ, Molekül A, Lit. [7].

(phosphorylierten) Rezeptor-C-Terminus keine ausreichende Elektronendichte erhalten wurde (Positionen 327–348 nicht aufgelöst), konnte keine Wechselwirkung mit dem N-terminalen  $\beta$ -Faltblatt des Arrestins beobachtet werden. Dennoch deuten die Ergebnisse der biochemischen und computerchemischen Experimente stark auf das Vorliegen dieser Wechselwirkung hin. Die Studie liefert zudem weitere Beweise für die elektrostatische Interaktion zwischen Arrestin und Rhodopsin. Die postulierte Arrestinbindung durch den Rezeptor-C-Terminus, verbunden mit einer Präsentierung und der anschließenden vollständigen Interaktion mit dem Rezeptor, konnte somit bestätigt werden.<sup>[7, 9b]</sup>

Die Studie von Kang et al. bildet den vorläufigen Höhepunkt auf dem Gebiet der GPCR-Arrestin-Strukturbioologie. Allerdings ist Rhodopsin durch seine vergleichsweise hohe Stabilität und den kovalent verknüpften Agonisten ein Sonderfall innerhalb der GPCR-Familie. Es bleibt daher eine interessante Frage, wie ein ternärer Komplex aus einem therapeutisch relevanten GPCR, seinem Liganden und  $\beta$ -Arrestin aussehen wird. In diesem Zusammenhang bietet die von Shukla et al. publizierte Struktur des  $\beta 2$ -Adrenorezeptors mit  $\beta$ -Arrestin-1 und einem stabilisierenden Antikörperfragment einen vielversprechenden Ansatz, auch wenn ihre Qualität nicht zur röntgenographischen Untersuchung ausreichte.<sup>[9c]</sup>

Zu verstehen, wie GPCRs ihre Interaktion mit Effektoren (z.B. Arrestin) kontrollieren und die nachfolgende Signalweiterleitung steuern, ist von besonderem Interesse, wenn man das Phänomen der funktionellen Selektivität für die Wirkstoffentwicklung nutzen will. Funktionell selektive Agonisten (oder „biased ligands“) sind in der Lage, nach Bindung an einen Rezeptor bevorzugt bestimmte Signalkaskaden zu aktivieren, während andere Effektoren verhindert oder gar nicht aktiviert werden (Abbildung 1).<sup>[5a]</sup> Teilweise resultiert diese funktionelle Selektivität aus Ligandgesteueter Phosphorylierung durch Rezeptorkinasen, die als eine Art „Signal-Barcode“ fungieren.<sup>[5b]</sup> Kristallstrukturen unterschiedlich phosphorylierter GPCRs im Komplex mit Arrestin und ausgeglichenen oder funktionell selektiven Agonisten werden daher mit Spannung erwartet. Trotz dieser Einschränkungen ist die Rhodopsin-Arrestin-Kristallstruktur ein entscheidender Schritt für das Verständnis funktionell

selektiver Signalübertragung durch GPCRs. Zudem kann sie als Vorlage für Homologiemodelle sowie Langzeit-Molekül-dynamiksimulationen therapierelevanter GPCRs genutzt werden und somit zum strukturbasierten Design funktionell selektiver Wirkstoffe beitragen.

## Danksagung

Wir danken der DFG für finanzielle Unterstützung (GRK1910).

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13166–13168  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 13362–13364

- [1] M. C. Lagerström, H. B. Schiöth, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 339–357.
- [2] B. K. Shoichet, B. K. Kobilka, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 268–272.
- [3] a) D. M. Rosenbaum et al., *Science* **2007**, *318*, 1266–1273;  
b) D. M. Rosenbaum et al., *Nature* **2011**, *469*, 236–240.
- [4] a) S. G. F. Rasmussen et al., *Nature* **2011**, *477*, 549–555;  
b) S. G. F. Rasmussen et al., *Nature* **2011**, *469*, 175–180; c) B. Kobilka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6380–6388; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6508–6517.
- [5] a) R. J. Lefkowitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6366–6378;  
*Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6494–6507; b) K. N. Nobles et al., *Sci. Signaling* **2011**, *4*, ra51.
- [6] L. M. Bohn, R. R. Gainetdinov, F.-T. Lin, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, *Nature* **2000**, *408*, 720–723.
- [7] Y. Kang et al., *Nature* **2015**, *523*, 561–567.
- [8] M. K. Ostermaier, C. Peterhans, R. Jaussi, X. Deupi, J. Standfuss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1825–1830.
- [9] a) Y. J. Kim, K. P. Hofmann, O. P. Ernst, P. Scheerer, H.-W. Choe, M. E. Sommer, *Nature* **2013**, *497*, 142–146; b) A. K. Shukla et al., *Nature* **2013**, *497*, 137–141; c) A. K. Shukla et al., *Nature* **2014**, *512*, 218–222.
- [10] a) K. Palczewski et al., *Science* **2000**, *289*, 739–745; b) X. Deupi, P. Edwards, A. Singhal, B. Nickle, D. Oprian, G. Schertler, J. Standfuss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 119–124.

Eingegangen am 18. August 2015  
Online veröffentlicht am 11. September 2015