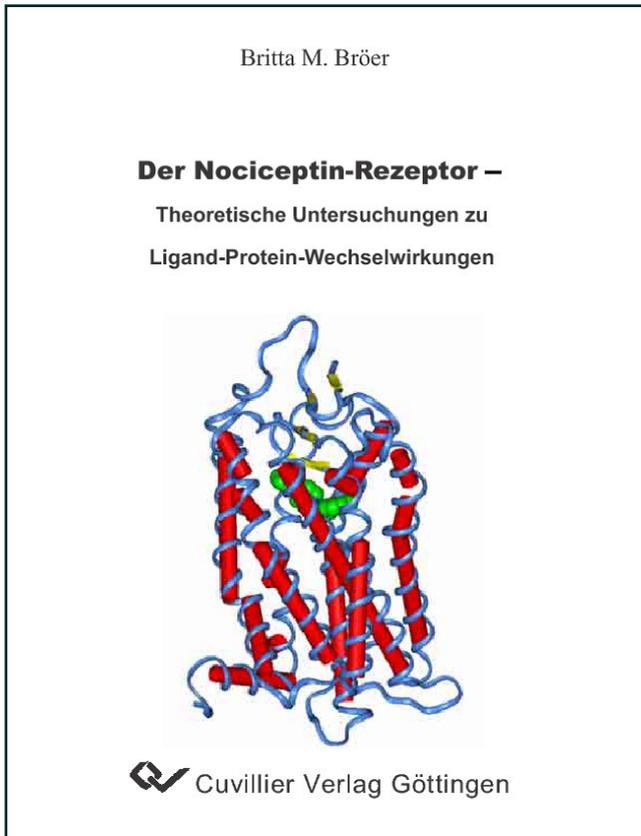




Britta M. Bröer (Autor)

Der Nociceptin-Rezeptor

Theoretische Untersuchungen zu Ligand-Protein-Wechselwirkungen



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2811>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1.1 Allgemein

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-protein-coupled receptors = GPCRs) regulieren eine Vielzahl physiologischer Prozesse durch Übertragung von Signalen an Zellen als Antwort auf verschiedene Stimuli. Mehr als 50% der sich auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe greifen an einem GPCR an [1]. Vor allem neue Rezeptoren oder, wie im Falle des Nociceptin-Rezeptors, Proteine mit noch nicht eindeutig geklärtem pharmakologischen Profil, deren Beteiligung an vielen physiologischen Prozessen jedoch gesichert scheint, stehen unter besonderem Augenmerk der (Arzneimittel-)Forschung.

Schnell stellt sich aber, sobald man sich mit GPCRs näher auseinandersetzt, folgendes Problem: Mit Ausnahme des Lichtrezeptors Rhodopsin [2] sind die Strukturen der GPCRs auf atomarer Basis unbekannt. Diese Situation erfordert eine Entwicklung/Anwendung alternativer Strategien, um Einblicke in die Rezeptorgehalt zu gewinnen und herauszufinden, welche strukturellen Voraussetzungen kleine Moleküle für eine Affinität zu einem bestimmten GPCR mitbringen müssen. Hier bietet das Molecular Modelling einen wichtigen Ansatzpunkt. Unter diesem Begriff versteht man die Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von realistischen dreidimensionalen (3D) Molekülstrukturen und ihren physikochemischen Eigenschaften [3]. Es lassen sich nicht nur auf niedermolekularer Ebene (z.B. mit nicht-peptidischen Liganden) Untersuchungen durchführen, sondern auch mit den Methoden des Homologie-Modellings dreidimensionale Modelle bislang nicht aufgeklärter Rezeptoren anhand vorhandener Koordinaten eines aus derselben Familie stammenden Proteins aufbauen. Im Falle des Nociceptin-Rezeptors bietet sich die Kristallstruktur des Rinderrhodopsins an, um auf die strukturellen Gegebenheiten im zu erforschenden Rezeptor schließen zu können.

Eines darf dabei nicht außer acht gelassen werden: Alle aus diesen Studien abgeleiteten Ergebnisse dürfen nicht mit der Wirklichkeit gleichgesetzt werden. Ihre Qualität richtet sich immer nach den zugrunde liegenden Fakten. Das Erstellen von Modellen, die Vorhersage von Protein-Ligand-Wechselwirkungen, sowohl qualitativ als auch quantitativ, nehmen aber mittlerweile trotzdem einen wichtigen Platz im Sektor des rationalen Drug Designs (rationale Arzneistoffentwicklung) ein. Mit Resultaten aus 3D-QSAR Analysen, virtuellem High-Throughput Screening und strukturbasiertem Design lassen sich Strukturvorhersagen für neue Liganden machen.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die GPCRs stellen eine Superfamilie membranständiger Proteine dar, deren Funktion darin besteht, ein extrazelluläres Signal von einem Botenstoff durch die Membran nach innen auf das hier befindliche G-(Guanin-Nukleotid bindende) Protein zu übertragen [4]. Die aus über 1000 Mitgliedern bestehende, und damit größte Rezeptor-Familie im menschlichen Organismus kann durch die spezifischen, chemisch sehr unterschiedlichen endogenen Liganden zur Signalübertragung stimuliert werden [5]. Da wären u.a. biogene Amine, Peptide, Glycoproteine, Lipide, Nucleotide, Ionen und Proteasen als physiologische Liganden zu nennen. Neben diesen inneren können auch von außen kommender Stimuli (wie Licht, Geruch und Geschmack) durch diese Klasse von Rezeptoren vermittelt werden. Das weit verbreitete Vorkommen und die Diversität ihrer Liganden verdeutlichen den immensen Einfluss der GPCRs.

1.2.1 Aufbau der GPCRs

Die Gemeinsamkeit im Aufbau aller GPCRs besteht in den sieben transmembranären α -Helices (transmembranäre Helices = TMs), die durch jeweils drei intra- (i1, i2 und i3) und extrazelluläre (e1, e2 und e3) Loops verbunden sind (s. Bild 1.1). Der N-Terminus befindet sich außerhalb, das C-terminale Ende innerhalb der Zelle. Die sieben, überwiegend hydrophoben Segmente der GPCRs liegen als Bündel in der Zellmembran verankert und sind, extrazellulär betrachtet, gegen den Uhrzeigersinn angeordnet. Auffällig ist, dass an den cytoplasmatischen Enden der TMs bis zu dreimal mehr basische Aminosäuren positioniert sind als saure [6]. Die positiv geladenen Seitenketten der basischen Aminosäuren beteiligen sich an ionischen Wechselwirkungen mit den hier überwiegend vorkommenden negativ geladenen Phosphatkopfgruppen der Lipidmembran. In der Zelle bindet das G-Protein im Bereich des i3-Loops und an das cytoplasmatische Ende von TM6 [7].

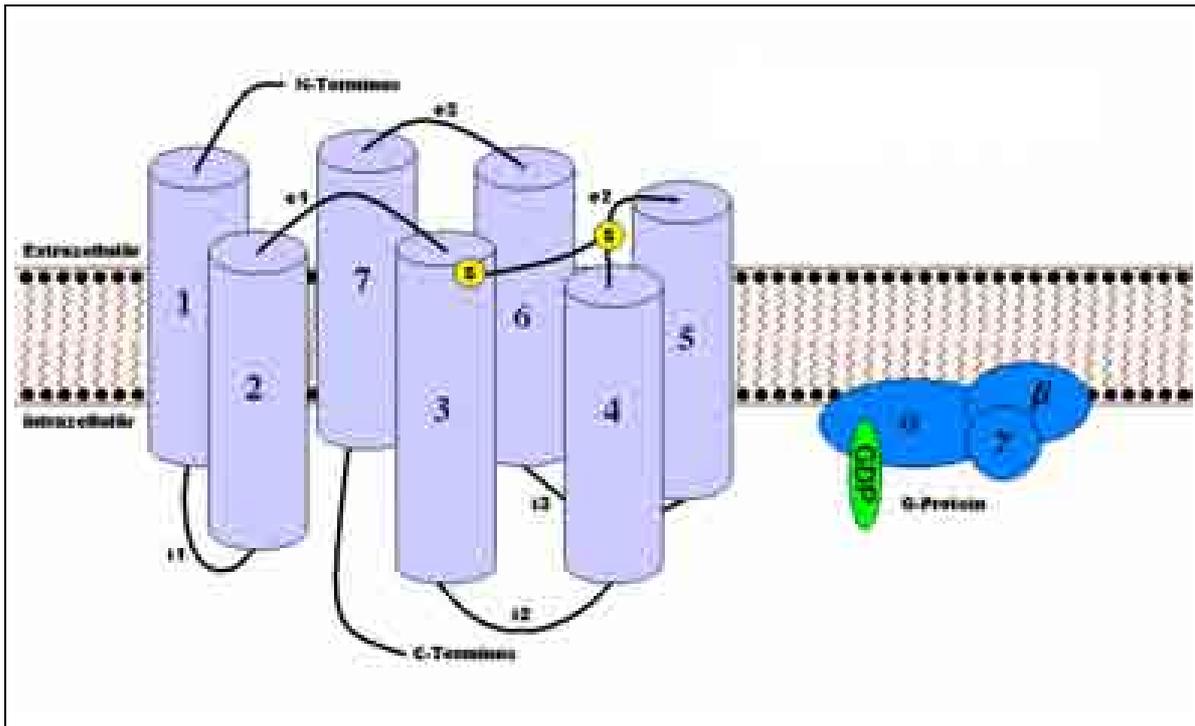


Bild 1.1 Schematische Darstellung eines rhodopsinähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptors in der Zellmembran einschließlich inaktivem G-Protein. Die hellblauen Zylinder symbolisieren die sieben transmembranären Helices, die von der extrazellulären Seite aus gesehen gegen den Uhrzeigersinn angeordnet sind. Der N-Terminus befindet sich außerhalb, das C-terminale Ende innerhalb der Zelle. Verbunden sind die helicalen Segmente durch jeweils drei intra- und extrazelluläre Loops (i1-i3, e1-e3). Eine zusätzliche Stabilisierung kommt durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen in Helix 3 und in e2 zustande.

Historie der Strukturaufklärung der GPCRs

In Folge der Schwierigkeiten, die das Kristallisieren eines Membranproteins mit sich bringt, diente zunächst seit 1990 die hoch aufgelöste (2.5 Å) Struktur der lichtgesteuerten Protonenpumpe des *Halobacterium halobium*, das Bacteriorhodopsin [8], als Vorlage für Homologie-Modelle von GPCRs. Es wurde, weil es sieben, die Membran durchziehende Helices und den gleichen natürlichen Liganden besitzt, als bakterielles Homolog zum Wirbeltier-Rhodopsin angesehen. Da es sich aber beim Bacteriorhodopsin um eine Protonenpumpe handelt und es auch nicht mit einem G-Protein verbunden ist, wurde es schnell als Struktur-schablone obsolet.

Tiefere Einblicke in den Aufbau der GPCRs gaben die aus der Kryoelektronenmikroskopie stammende Aufnahme des bovinen (Auflösung: 7 Å) und des Frosch-Rhodopsins (9 Å) von Schertler und Mitarbeitern [9, 10, 11, 12]. Die jeweiligen Projektionskarten zeigen, dass die Helices von einer idealen Linie durch den Einfluss helixbrechender Aminosäuren abweichen. In einem von Baldwin

aufgestellten C α -Atom-Modell des Rhodopsins fließen kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen des Frosch-Rhodopsins ein [13], die zu einer Aussage über die Lage und Neigung der Helices herangezogen wurden. Zur Festlegung von helicalen Abschnitten und deren Länge wurde in diesem Rahmen eine Analyse von ~500 GPCR-Aminosäure-Sequenzen durchgeführt. Dabei wurde zum einen das Vorhandensein einer Disulfidbrücke zwischen zwei hoch konservierten Cysteinen im zweiten extrazellulären Loop und TM3 festgestellt, zum anderen das Vorkommen von hoch konservierten Aminosäuren, die als so genannte "pin points" beim Alignment eine große Hilfe darstellen (s. Kapitel 3.3.1).

Erst mit der Veröffentlichung der Röntgenstruktur eines GPCRs im August 2000 konnten Erkenntnisse anhand einer hoch aufgelösten Struktur (2.8 Å) aus einem Säuretierorganismus [2] gesammelt werden. Die sieben helicalen „Röhren“ des Rhodopsins bestehen aus 194 Aminosäuren, die restlichen 348 Aminosäuren des Monomers bilden die Loops. Sehr schnell werden die Unterschiede zum Bacteriorhodopsin v.a. im Arrangement der TMs klar. Aber auch die außerhalb der Membran liegenden Regionen sind wesentlich umfassender und organisierter im Vergleich zum bakteriellen „Homolog“, was die funktionellen Unterschiede unterstreicht. Helixbrechende Aminosäuren wie z.B. Prolin und Glycin verhindern, dass die α -Helices ideal verlaufen, so dass die TMs ganz andere Positionen zueinander einnehmen und Wechselwirkungen eingehen können, die hinsichtlich der Rezeptoraktivierung eine entscheidende Rolle spielen könnten. Darüber hinaus sind die β -Faltblattstrukturen im N-Terminus und im e2 weitere interessante Sekundärstrukturmerkmale. Die in den meisten GPCRs konservierte Disulfidbrücke zwischen e2 und TM3 findet sich auch im Rinderrhodopsin (s. Bild 1.2).

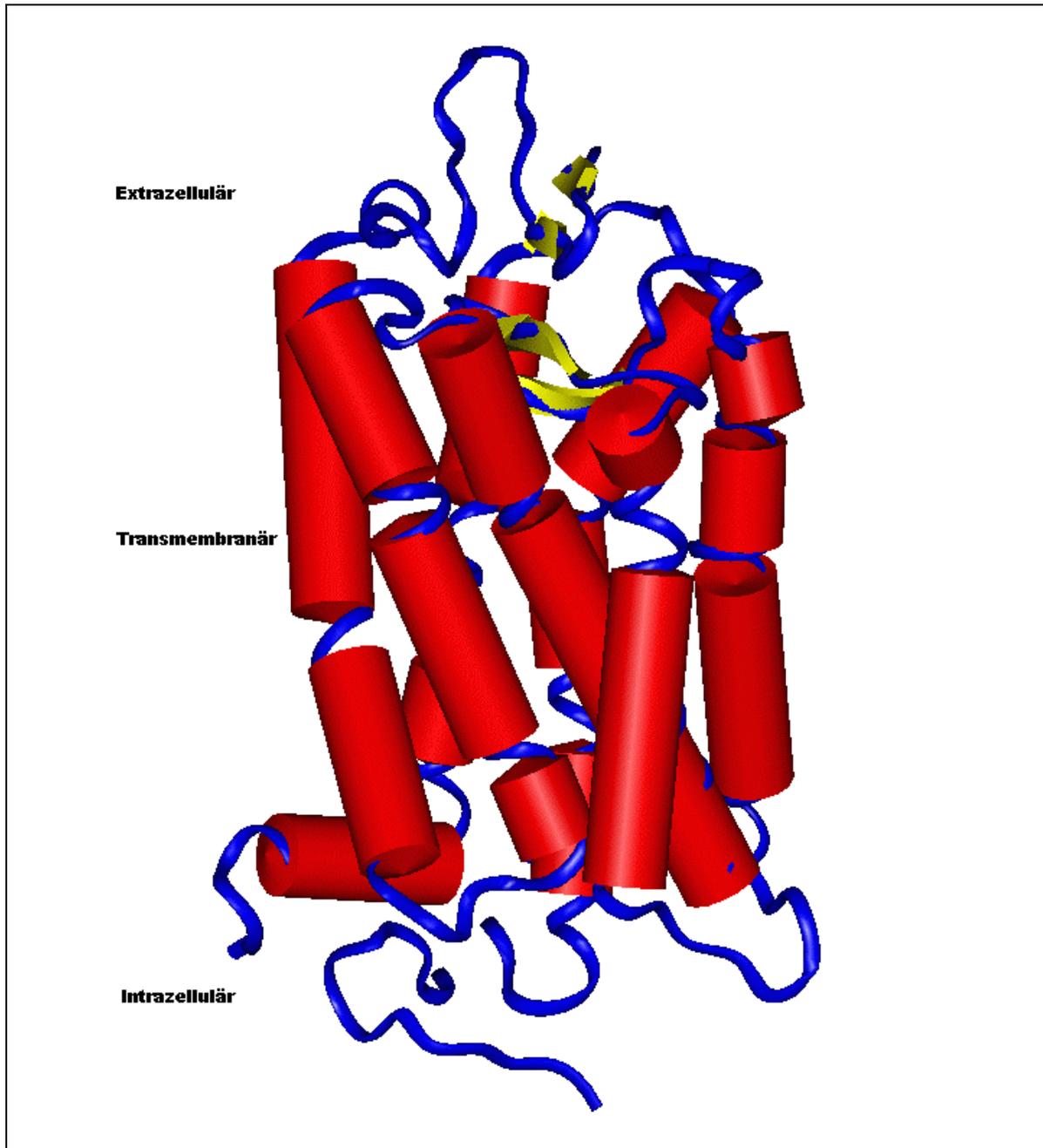


Bild 1.2 Kristallstruktur des Rinderrhodopsins [2]. In blau ist das Proteinrückgrat dargestellt. Die roten Zylinder, die die helicalen Regionen anzeigen, sind mehrfach unterbrochen durch so genannte helixbrechende Aminosäuren, die einen idealen Verlauf der Helices verhindern. Somit kommt es zu einer ganz anderen Anordnung der TMs zueinander, als es ideale Helices zulassen würden. Im N-Terminus und im zweiten extrazellulären Loop befinden sich jeweils eine β -Faltblattstruktur (gelb).

1.2.2 Einteilung der GPCRs

Basierend auf Nucleotid- und Aminosäuresequenz-Homologie wird die Superfamilie der GPCRs in drei Rezeptorfamilien unterteilt, deren Proteinsequenzen