

Nobelpris till detaljstudier av G-proteinkopplade receptorer

Årets Nobelpris i kemi ger viktig kunskap – men praktisk tillämpning kan dröja



BERTIL B FREDHOLM, professor, institutionen för fysiologi och farmakologi, Karolinska institutet, Stockholm; ledamot, Kungliga Vetenskapsakademien
bertil.fredholm@ki.se

Nobelpriset i kemi 2012 har tilldelats de båda amerikanska forskarna Robert J Lefkowitz (Duke University) och Brian K Kobilka (Stanford University) för studier av G-proteinkopplade receptorer.

Detta var det andra Nobelpriset till forskning om adrenerga betareceptorer; det första tilldelades Sir James Black 1988 för hans framgångsrika försök att utveckla terapeutiskt användbara receptorantagonister för såväl adrenerga betareceptorer som histamin-H₂-receptorer.

Årets pris har inte någon lika direkt klinisk betydelse, utan Robert Lefkowitz och Brian Kobilka belönas med Nobelpriset mer för sina grundläggande studier av receptorernas struktur och funktion.

Betareceptorers struktur klarnar

Under början av 1970-talet försökte Robert Lefkowitz och hans medarbetare, liksom många andra, använda radioaktivt märkta substanser för att studera receptorernas egenskaper. Efter inledande försök – där Lefkowitz använde radioaktiva katekolaminer och tyvärr kom att studera ett enzym (katekol-O-metyltransferas, COMT) i stället för receptorn – övergick han till att använda radioaktiva antagonist som var vidareutvecklingar av James Blacks upptäckter [1].

Lefkowitz laboratorium kom att inta en ledande roll i studiet av adrenerga receptorer, och de metoder som utvecklades kom snabbt att bli huvudredskap i utvecklingen av nya läkemedel. När man identifierat en substans med goda bindningsegenskaper kunde man sedan undersöka hur ett stort antal nysyntetiserade substanser förmår tävla om bindningen till receptorn.

Studierna ledde också till framgångsrik rening av betareceptorn. I samar-

te med forskare på Merck kunde betareceptorn så småningom klonas [2].

En viktig person i detta arbete var Brian Kobilka som just hade börjat en lång post doc-period hos Robert Lefkowitz. Det visade sig att betareceptorn hade en struktur som påminde mycket om den hos synpurpur (rodopsin). Det var inte alldeles oväntat, eftersom man tidigare visat att såväl rodopsin som betareceptorn signalerar via så kallade G-proteiner – en upptäckt som år 1994 gav Martin Rodbell och Alfred Gilman Nobelpriset i fysiologi eller medicin.

Men eftersom man visste en del om rodopsinets struktur, kunde man nu göra förutsägelser om hur betareceptorn ser ut: ett protein som veckar sig sju gånger upp och ner genom cellmembranet och där början och slut ligger nära varandra.

Betareceptorgen som »bete«

En praktiskt sett viktigare konsekvens var att det blev möjligt att använda sekvenser från betareceptorgen för att fiska efter andra, likartade gener. Flera hundra gener för likartade proteiner klonades inom några få år.

I dag har man identifierat drygt 350 gener för receptorer för aminer (tex noradrenalin, dopamin, serotonin, histamin, oktopamin), puriner (adenosin, adenosindifosfat [ADP], adenosin- och uridintrifosfat [ATP och UTP]), peptider (substans P, vasopressin, glukagon, neuropeptid Y m fl), fettsyror och andra lipider, kalcium m m.

Dessutom finns hos människa nästan lika många luktreceptorer (hos musen finns ca 1500), 7 opsinmolekyler för seendet och 39 smakreceptorer.

Nya läkemedel – en besvikelse

Kloning av de mänskliga formerna av alla dessa receptorer kombinerad med de ovan beskrivna bindningsmetoderna har möjliggjort en storskalig process, som lett fram till att det i dag finns ganska specifika antagonist mot nästan alla receptorer av denna typ.

I presentationen av årets Nobelpris i kemi lät man antyda att denna utveck-

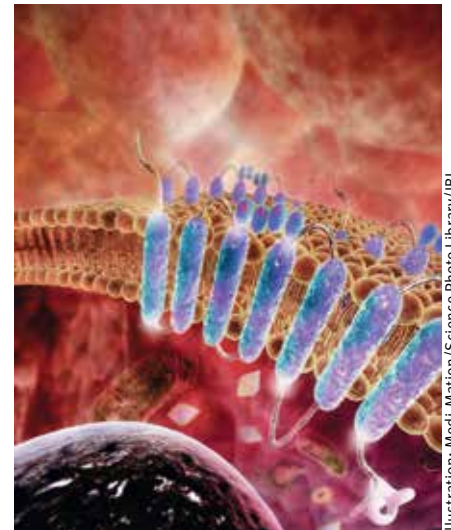


Illustration: Medi-Matton/Science Photo Library/IBL

Robert Lefkowitz och Brian Kobilkas forskning om G-proteinkopplade receptorer kan öka kunskapen om hur läkemedel verkar.

ling låg framför oss och att det skulle leda till en gyllene framtid för läkemedelsforskningen. Tyvärr ligger den alltså i stort sett bakom oss, och det har varit en stor besvikelse att så få seriösa läkemedelskandidater kommit fram ur denna enorma satsning från alla större läkemedelsföretag.

Selektiv terapeutisk effekt inte given

Rent intuitivt skulle man vänta sig att en substans som påverkar endast ett av kroppens alla proteiner skulle vara mer selektiv i sin terapeutiska effekt. Men för drygt 20 år sedan försökte många, inklusive jag själv, påpeka att detta inte alls nödvändigtvis är fallet.

Jag skrev då [2]: »De farmakologiska agens som verkligen är selektiva för en

SAMMANFATTAT

Årets Nobelpristagare i kemi har förfinat metoder att studera hur läkemedel kopplar till receptorer och klaggjort de G-proteinkopplade receptorernas molekylära struktur ned till atomär nivå.

Läkemedelsindustrin har därmed kunnat utveckla substanser som selektivt påverkar många av dessa receptorer.

Tyvärr har den molekylära specificiteten sällan visat sig motsvaras av terapeutisk selektivitet.

sjuk cell kommer troligen att vara föreningar som inte har endast en verkningmekanism utan råkar ha en korrekt blandning av olika farmakologiska effekter så att de kan påverka just de mekanismer som när de samverkar karakteriserar cellen [---] Det är troligen ett undantag snarare än en regel att en given diagnos motsvarar en specifik molekyllär patologi. Följaktligen är det osannolikt att ett läkemedel med en mycket specifik molekyllär angreppspunkt kommer att kunna selektivt bota alla patienter med en given diagnos.«

Annan signalering än via G-protein

Robert Lefkowitz laboratorium kom att intressera sig mycket för hur cellen förmår stänga av en alltför kraftig receptorsignal. Robert Lefkowitz fann att receptorn kunde fosforyleras av ett enzym som aktiverades när G-proteinet slogs på. Detta ledde till att ett nytt protein – arrestin – kunde bindas till receptorn och föra den från cellens yta till dess inre, vilket leder till en nedreglering av antalet receptorer. Men Lefkowitz fann också att receptorn då den band till arrestin kunde generera nya signaler; bla kunde den nu aktivera sk MAP-kinaser, som är av stor betydelse för reglering av cellens fenotyp.

Ännu mer överraskande: Lefkowitz laboratorium kunde visa att signalering via arrestin kunde vara oberoende av G-protein. Detta har inneburit att receptorer som betareceptorn och angiotensinreceptorn inte alltid kan kallas G-proteinkopplade. Man använder därför numera gärna termen 7-TM-receptorer för att beskriva dem (TM står för transmembran).

Det är därför en smula ironiskt att just den man som visat att receptorerna inte alltid är G-proteinkopplade belönas för sin forskning om G-proteinkopplade receptorer. Man har nu visat att vissa receptorstimulerare företrädesvis får receptorn att aktivera G-proteiner, medan andra stimulerare företrädesvis aktiverar arrestin-MAP-kinasvägen [3]. Det är möjligt att detta förhållande kan utnyttjas terapeutiskt.

Samband struktur–funktion

Kloningen av receptorerna – enkannerligen betareceptorerna – har drastiskt ökat vår kunskap om hur bindningen av ett läkemedel kan påverka dess aktivitet och därmed cellernas funktion.

En serie arbeten av bla Kobilka och Lefkowitz visade på vilka aminosyror i receptorerna som var viktiga för att åstadkomma bindningsselektivitet och vilka som spelade roll för kopplingen till intracellulär signalering. Studiet av hur ett stimulerande ämne förmår förändra receptorns struktur så att den övergår

från inaktivt till aktivt tillstånd har varit föremål för Brian Kobilkas intensiva intresse alltsedan han startade sitt eget laboratorium.

Genom att byta ut aminosyror i receptorerna och/eller sätta in fluorescerande prober kunde han undersöka hur olika delar av receptorn rör sig när receptoraktiva läkemedel binds. Han kunde visa var isoprenalin, den klassiska receptoragonisten, binds och hur den kan ändra receptorns struktur i och med bindning [4].

Därmed kan man se hur en agonist har förmågan att binda sig till, och stabilisera aktiva konformationer i, receptorn. Utan receptorligand kan receptorn fluktuera spontant mellan olika tillstånd. Agonister stabiliserar aktiva tillstånd, antagonisterna inaktiva. Men det är också så att en stimulerande substans kan inducera nya tillstånd hos receptorn, vilka antagligen inte uppträder spontant.

Det förefaller också vara så att det kan finnas flera olika aktiva tillstånd hos en och samma receptor. Exempelvis kan man tänka sig att en receptor kan aktivera olika typer av G-proteiner beroende på vilken typ av aktivt tillstånd den befinner sig i eller att en receptor binder till arrestin i stället för till G-protein. Man kan tänka sig att utveckla receptoragonister som stabiliserar dessa olika aktiva tillstånd – och kanske kan det medföra mycket selektiv receptoraktivering.

En bild av den aktiva receptorn

Även om dessa studier – som med fysikaliska metoder proverat betareceptorn – är oerhört eleganta, kan de inte ersätta en avbildning av receptorn. Därför var det ett uttalat mål för ett stort antal av världens ledande forskargrupper inom området att använda röntgenkristallografiska metoder för att studera receptorerna.

Trots intensiva försök av alla dessa laboratorier under en följd av år, var det Brian Kobilka som slutligen lyckades [5]. Den första rapporten visade strukturen av receptorn när den bundit en ligand som stabiliserade ett inaktivt tillstånd. Sedermera har Kobilkas laboratorium visat hur betareceptorn ser ut när den bundit en aktiverande ligand och hur den i detta tillstånd interagerar med G-proteinet [6]. Han har också studerat strukturen hos de olika opiatreceptorerna.

Dessa studier innebär en formidabel prestation. Viktigare är att vi nu verkligen kan börja förstå hur receptorerna påverkas när läkemedel binds och hur detta leder till att effekter utlöses eller slås ut. Betydelsen av detta kan inte överskattas.

Däremot är det faktiskt inte givet att det kommer att bli lättare att utveckla nya effektiva läkemedel bara för att man nu vet hur bindningsstället ser ut för vissa läkemedel. En anledning är att bindningsplatsen inte är densamma för alla aktiva föreningar. En annan är att ett läkemedel tar sig fram till sin slutliga bindningsplats via en ytterst krånglig väg där olika intermediära interaktioner spelar en avgörande roll för att avgöra om substansen över huvud taget hittar dit, vilket Kobilka och andra visat. Det är i stort sett omöjligt att i detalj förutse denna process.

Så betydelsen av det arbete som belönats med årets Nobelpris är – liksom för flertalet stora vetenskapliga upptäckter – att det ökat vår kunskap, inte att det leder till omedelbar praktisk tillämpning.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

REFERENSER

1. Lefkowitz RJ, Mukherjee C, Coverstone M, et al. Stereospecific (3H)(minus)-alprenolol binding sites, beta-adrenergic receptors and adenylylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974;60:703-9.
2. Fredholm BB. Diversity in receptor signalling: cellular individuality and the search for selective drugs. *J Intern Med.* 1991;229:391-406.
3. Violin JD, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28:416-22.
4. Gether U, Kobilka BK. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem.* 1998;273:17979-82.
6. Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, et al. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature.* 2011;477:549-55.

LÄS MER Fullständig referenslista Läkartidningen.se



Läs även Jonas Friséns kommentar om årets Nobelpris i fysiologi eller medicin i nr 41/2012 och Tommy Anderssons och Carl Hampus Lyttkens kommentar om årets Nobelpris i ekonomi på sidan 2276 i detta nummer.