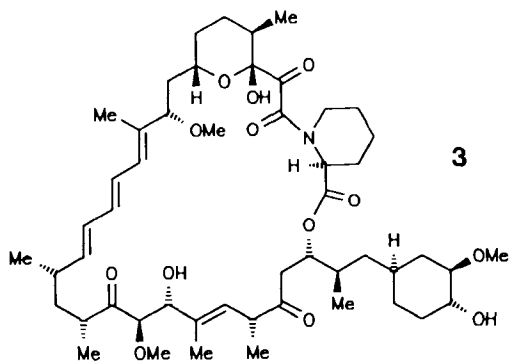
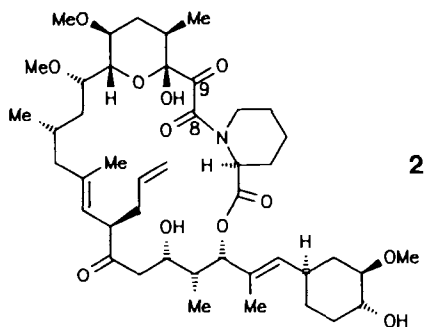
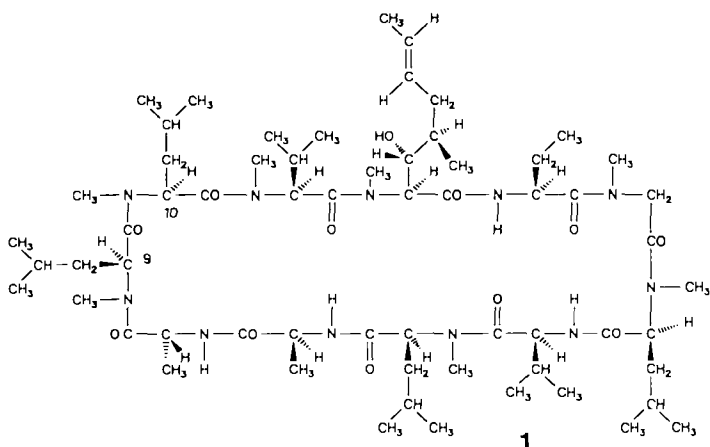


Auf dem Weg zum Verständnis der Immunsuppression

Von Horst Kessler*, Dale F. Mierke, David Donald und Mark Furber

Langsam beginnt sich der Nebel zu lichten: neue biochemische Befunde und die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Komplexe der Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) **1**^[1, 2], FK506 **2**^[3] und Rapamycin **3** mit dem ent-

Antigen auf der Oberfläche der T-Lymphocyten. Dadurch wird ein Signal induziert, das auf noch unbekannte Weise zum Zellkern weitergeleitet wird. Dieser wird zur Produktion von Interleukin-2 (IL-2) angeregt. CsA und FK506 inhibieren diesen Prozeß. Rapamycin dagegen reagiert später in der Kaskade, und zwar durch Inhibierung der Differenzierung und Proliferation der T-Lymphocyten, die durch IL-2 stimuliert wird.



Zelloberfläche	Cytoplasma	Zellkern	Inhibitor
Antigen-MHC-Addukt reagiert mit T-Zell-Rezeptor	Signal →	Produktion von Interleukin-2	FK506 Cyclosporin A
Interleukin-2 und Rezeptor	Signal →	T-Zell Proliferation und Differenzierung	Rapamycin

Abb. 1. Kaskade von Ereignissen, die zur Differenzierung und Proliferation der T-Lymphocyten führen.

Die medizinische Bedeutung der Immunsuppression ist groß. Viele Krankheiten werden durch unerwünschte Reaktionen des Immunsystems verursacht. Die großen Erfolge der Transplantationschirurgie beruhen nicht unwesentlich auf der „Wunderdroge“ Cyclosporin^[5]. Der schmale Grat zwischen Abstoßung des implantierten Organs und Infektion des Patienten bei der notwendig gewordenen Immunsuppression ist durch Cyclosporin zu einem breiten Pfad geworden.

Cyclosporin ist ein wasserunlösliches, sehr lipophiles cyclisches Undecapeptid, dessen Struktur im Kristall und in Lösung gut bekannt ist^[6]. Vor wenigen Jahren fand man mit FK506^[7], einem Peptidomakrolid, eine nahezu hundertfach aktivere Verbindung, die sich zur Zeit in klinischer Erprobung befindet. Auch dessen Struktur ist inzwischen bekannt^[7, 8].

Ein erster Durchbruch im Verständnis der Wirkung begann mit der Auffindung der cytosolischen Bindungsproteine Cyclophilin (für Cyclosporin) und FK506-Bindungsprotein (FKBP)^[9]. Diese sind ubiquitäre Rotamasen, Enzyme, die die an sich schon schnelle *cis,trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen katalysieren^[10]. Ob diese Eigenschaft direkt etwas mit dem Mechanismus der Immunsuppression zu tun hat, ist noch unklar. Auf jeden Fall werden die Immunsuppressiva auf diese Weise im gebundenen Zustand von der Zellwand des T-Lymphocyten durch das Cytosol zum Zellkern transportiert^[4]. Die Struktur des Cyclosporin-Cyclophilin-Komplexes in Lösung wurde unabhängig voneinander in den Arbeitsgruppen von K. Wüthrich an der ETH Zürich^[2] und S. Fesik, Abbott-Laboratories, USA^[1] bearbeitet. Ausführliche Manuskripte wurden unter großer Geheimhaltung zeitgleich zur Publikation eingereicht. Bisher ist nur durchgesiekt, daß die *cis*-Peptidbindung zwischen MeLeu⁹ und MeLeu¹⁰ des Cyclosporins im Komplex in eine *trans*-Bindung übergegangen ist^[1]. Ein Effekt der Rotamase?

sprechenden Rezeptorproteinen werfen erstes Licht auf den Mechanismus der Immunsuppression durch die Agentien^[4]. Sie greifen in eine Kaskade von Ereignissen ein (Abb. 1):

Der T-Zell-Rezeptor erkennt das mit dem MHC-Protein (MHC = Major Histocompatibility Complex) präsentierte

[*] Prof. Dr. H. Kessler, Dr. D. F. Mierke
Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, W-8046 Garching
Dr. D. Donald, Dr. M. Furber
Fisons Pharmaceutical
Bakewell Road, Loughborough LE 100H (Großbritannien)

Kürzlich erschien nun eine erste NMR-spektroskopische Arbeit über die Struktur des FK506-FKBP-Komplexes von M. Karplus, S. Schreiber et al. an der Harvard University^[3]. Charakteristisch für diesen Komplex ist die Hochfeldverschiebung sämtlicher Protonensignale des Piperidinrings von FK506, die von der Anisotropie des im Komplex benachbarten einzigen FKBP-Tryptophan-Indolringses herührt. Dieser Befund ist durch NOE-Effekte (NOE = Nuclear Overhauser Enhancement) zwischen Substrat und Rezeptor gesichert. Grundlage all dieser Untersuchungen ist die Verwendung von isotonenmarkierten Substraten und/oder Rezeptoren. Markierungen mit ^{13}C , ^{15}N und ^2H helfen, die wichtige Information herauszufiltern und ermöglichen eine eindeutige Identifizierung der Wechselwirkungs-orte.

Welches Amidbindungs-Rotamer des FK506 ist die biologisch aktive Form^[11]? Im Kristall liegt die *cis*-Form vor^[7], die auch in Lösung dominiert (2:1)^[8]. Das strukturell verwandte Rapamycin existiert aber im Kristall als *trans*-Rotamer^[12]. Für das Design von therapeutisch interessanten Analoga ist die Kenntnis der Konformation im gebundenen Zustand notwendig. Die oben erwähnte Arbeit^[3] liefert unseres Erachtens deutliche Anzeichen dafür, daß im FK506-FKBP-Komplex die *trans*-Form vorliegt: Vergleicht man die chemischen Verschiebungen der Protonen des Piperidinrestes im Komplex^[3] mit denen der beiden Rotamere in Lösung^[8], so fällt auf, daß das äquatoriale Proton und C-2 bei der Annahme einer *cis*-Peptidbindung im Komplex praktisch keine Hochfeldverschiebung bei der Komplexbildung erfährt, während bei der *trans*-Verbindung eine gleichmäßige Beeinflussung der Verschiebung resultiert (Abb. 2). Auch die im Komplex gemessene direkte Kopplung zwischen den Kohlenstoffatomen der Carbonylgruppen 8 und 9 (siehe Formel 2) von 61 Hz^[11] entspricht derjenigen von *trans*-FK506 in Lösung (61 Hz) und nicht der des *cis*-Isomers (64 Hz)^[13].

Man kann mit Spannung die Resultate der verfeinerten Strukturen der Immunsuppressiva und ihrer Rezeptoren er-

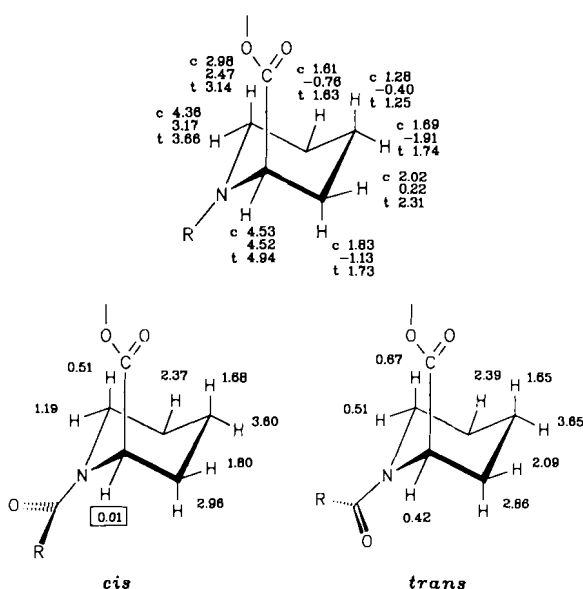


Abb. 2. Oben: Vergleich der ^1H -NMR-Verschiebungen des Piperidinrings von FK506 im Komplex (mittlere Zahl) mit den beiden freien Amidbindungs-Rotameren in CDCl_3 (c = *cis*, t = *trans*). Unten sind für beide Rotamere die durch die Komplexbildung induzierten negativen Verschiebungsänderungen gegenübergestellt (siehe Text).

warten^[15]. Auf jeden Fall ist inzwischen klar, daß FK506 und Rapamycin eine gleichartige Konformation in der Bindungsregion des Komplexes aufweisen, obwohl sich die Struktur der freien Verbindungen im Kristall unterscheiden. Daher muß mindestens bei einer Verbindung bei der Komplexbildung eine Konformationsänderung erfolgen. Auch Cyclosporin wird in einer Konformation gebunden, die nicht identisch mit der Struktur im Kristall und in Lösung ist.

Schreiber et al. nehmen an, daß FK506 als Übergangszustands-Analogon von Substraten der Rotamase fungiert^[11]. Die zur Amidbindung $\text{O}=\text{C}^8-\text{N}$ senkrecht angeordnete Carbonylgruppe $\text{C}^9=\text{O}$ entspricht der Carbonylgruppe einer um 90° verdrehten Amidbindung, wenn man die Amid-Carbonylgruppe $\text{C}^8=\text{O}$ als zusätzlich eingeschoben betrachtet; sie wirkt offenbar ebenso wenig störend, wie die nicht genau passende Kettenlänge beim Amidbindungs-Analogon Statin, einem als Inhibitor fungierenden Übergangszustands-Analogon der Substrate von Aspartyl-Proteasen^[14]. Ein Acylrest mit der Carbonylgruppe in der Ebene des Piperidinrings in FK506 ist für die axiale Stellung der Esterbindung an C-2 notwendig. Damit baut FK506 in einer delikaten Balance eine Raumstruktur auf, die dem pharmazeutischen Chemiker wohl noch einige Nüsse zu knacken gibt^[15].

- [1] S. W. Fesik, R. T. Gampe, H. L. Eaton, G. Gemmecker, E. T. Olejniczak, P. Neri, T. F. Holzman, D. A. Egan, R. Edalji, R. Simmer, R. Helfrich, J. Hochlowski, M. Jackson, *Biochemistry*, im Druck. Eine vorläufige Mitteilung ist erschienen: R. T. Gampe, T. F. Holzman, D. A. Egan, R. Edalji, J. R. Simmer, R. Helfrich, V. Kishore, D. H. Rich, *Science* 250 (1990) 1406.
- [2] C. Weber, G. Wider, B. von Freyberg, R. Traber, W. Braun, H. Widmer, K. Wüthrich, *Biochemistry*, im Druck.
- [3] T. J. Wandless, S. W. Mischnick, M. K. Rosen, M. Karplus, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 2339.
- [4] S. L. Schreiber, *Science* 251 (1991) 283.
- [5] R. M. Wenger, *Angew. Chem.* 97 (1985) 88; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 77.
- [6] a) H.-R. Loosli, H. Kessler, H. Oschkinat, H.-P. Weber, T. J. Petcher, A. Widmer, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 682; b) H. Kessler, M. Köck, T. Wein, M. Gehrke, *ibid.* 73 (1990) 1818.
- [7] H. Tanaka, A. Kuroda, H. Marusawa, H. Hatanaka, T. Kino, T. Gudo, M. Hashimoto, T. Taga, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 5031.
- [8] a) P. Karuso, H. Kessler, D. F. Mierke, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 9434; b) P. Karuso, P. Schmieder, H. Kessler, D. F. Mierke, *Helv. Chim. Acta*, im Druck.
- [9] a) G. Fischer, H. Bang, C. Mech, *Biomed. Biochim. Acta* 43 (1984) 1101; b) N. Takahashi, T. Hayano, M. Suzuki, *Nature* 337 (1989) 473; c) G. Fischer, B. Liebold-Wittmann, K. Lang, T. Kiefhaber, F. X. Schmid, *ibid.* 337 (1989) 476.
- [10] a) J. J. Siekierka, S. H. Y. Hung, M. Poe, C. S. Lin, N. H. Sigal, *Nature* 341 (1989) 755; b) M. W. Harding, A. Galat, D. E. Uehling, S. L. Schreiber, *ibid.* 341 (1989) 758; c) R. B. Freedman, *ibid.* 341 (1989) 692; d) R. F. Standaert, A. Galat, G. L. Verdine, S. L. Schreiber, *ibid.* 346 (1990) 671; e) M. Tropschug, E. Wachter, S. Mayer, E. R. Schönbrunner, F. X. Schmid, *ibid.* 346 (1990) 674.
- [11] M. K. Rosen, R. F. Standaert, A. Galat, M. Nakatsuka, S. L. Schreiber, *Science* 248 (1990) 863.
- [12] J. A. Findlay, L. Radics, *Can. J. Chem.* 58 (1980) 579.
- [13] Natürlich ist dieses Argument isoliert gesehen schwach, weil sich die Kopplung bei der Komplexbildung ändern kann, jedoch haben die Arbeiten der Gruppe von Schreiber eindeutig belegt, daß die Komplexbildung nicht kovalent erfolgt.
- [14] D. H. Rich in A. J. Barrett, G. Salvesen (Hrsg.): *Proteinase Inhibitors*, Elsevier, Amsterdam 1986, S. 179.
- [15] Anmerkung bei der Korrektur: Kürzlich sind drei Artikel erschienen, die die Struktur von FKBP [16, 17] und dem Komplex FK506-FKBP [18] beschreiben. Die Struktur von FK506 im Komplex zeigt tatsächlich eine *trans*-Amidbindung und unterscheidet sich auch von der Konformation von FK506 in Lösung.
- [16] J. M. Moore, D. A. Peattie, M. J. Fitzgibbon, J. A. Thomson, *Nature* 351 (1991) 248.
- [17] S. W. Mischnick, M. K. Rosen, T. J. Wandless, M. Karplus, S. L. Schreiber, *Science* 252 (1991) 836.
- [18] G. D. Van Duyne, R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber, *Science* 252 (1991) 839.