

Naturstoffe als Sonden zum Studium zellulärer Funktionen – Untersuchungen von Immunophilinen

Von Michael K. Rosen und Stuart L. Schreiber*

Eines der großen Geheimnisse der Zellbiologie ist noch immer der Mechanismus der Informations-, oder besser Signalübertragung durch das Cytoplasma der Zelle. Naturstoffe, die diesen Prozeß inhibieren, ermöglichen einen Einblick in fundamentale Aspekte der cytoplasmatischen Signalübertragung, durch die extrazelluläre Moleküle intrazelluläre Vorgänge beeinflussen. Deshalb ist die Naturstoffchemie – einschließlich organischer Synthese, Konformationsanalyse und Methoden der Strukturanalyse – so wichtig für das Studium der Zelfunktionen. Dieser Beitrag skizziert unser Verständnis der Funktionen einer Gruppe von Naturstoffen – von der Entdeckung, daß diese Verbindungen die cytoplasmatische Signalübertragung inhibieren, bis zu neuesten Erkenntnissen ihrer Rolle als Mediatoren der Wechselwirkung zwischen weitverbreiteten Proteinen. Der Schwerpunkt der Diskussion liegt auf strukturellen Aspekten. Die Wechselwirkungen zwischen den Naturstoffliganden und ihren Proteinrezeptoren werden auf der molekularen Ebene diskutiert, um Licht in die molekularen Mechanismen der biologischen Funktionen dieser Verbindungen zu bringen. Dabei hoffen wir, den Nutzen eines chemischen Herangehens an biologische Systeme zu demonstrieren. *Durch Chemie können wir die molekulare Basis biologischer Phänomene verstehen.*

1. Einleitung

Der Begriff Signalübertragung bezieht sich auf den Prozeß, bei dem extrazelluläre Moleküle intrazelluläre Ereignisse beeinflussen. Zum Beispiel werden die Wirkungen des Hormons Insulin an der Zelloberfläche initiiert, wenn extrazelluläres Insulin an den membrangebundenen Insulinrezeptor gebunden wird. Dieses Ereignis löst eine Serie von Reaktionen in der Membran aus, auf die eine Kaskade kaum definierter intrazellulärer Ereignisse folgt, woraufhin schließlich Gene transkribiert werden, die Stoffwechselenzyme codieren. So wird ein von außerhalb der Zelle stammendes Signal durch die Zellmembran hindurch an die Boten im Cytoplasma übermittelt und in den Zellkern übertragen, was eine Veränderung im Zustand der Zelle bewirkt. In den letzten Jahren wurden viele neue Erkenntnisse über den Mechanismus der Signalübertragung an der Membran und im Zellkern gewonnen. Im Gegensatz dazu ist nur sehr wenig über den Verlauf der Signalübertragung durch das Cytoplasma der Zelle bekannt. Ungeachtet der Bedeutung dieser Prozesse gehören die detaillierten Mechanismen der cytoplasmatischen Signalübertragung zu den großen Geheimnissen der Zellbiologie, weshalb das Cytoplasma heute als „black Box“ der Signalübertragung betrachtet wird.

Die Naturstoffchemie spielt seit langem eine wichtige Rolle in der Erforschung biologischer Mechanismen. Pionierleistungen bei präparativen und mechanistischen Studien an Steroiden, Prostaglandinen und Porphyrinen, um nur einige Naturstoffklassen zu erwähnen, brachten fundamentale Einblicke in die biologischen Funktionen dieser wichtigen Verbindungsklassen. Bestimmte Naturstoffe sind hervorragend zum Studium der geheimnisvollen Prozesse in der Zelle geeignet, einschließlich der cytoplasmatischen Signalübertragung, da sie solche Prozesse beeinflussen können. Das Studium inhibierender Naturstoffe, die an ihre biologischen Rezeptoren gebunden sind, ermöglicht es, ein eingehendes Verständnis der Funktion dieser Rezeptoren zu gewinnen.

Forschung auf diesem Gebiet setzt eine Kombination von leistungsfähigen, einander ergänzenden Methoden der präparativen Chemie, der Molekularbiologie, der Zellbiologie und Methoden der Strukturuntersuchung, wie NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse, voraus. Dieser Übersichtsartikel faßt neue Erkenntnisse zum Mechanismus der cytoplasmatischen Signalübertragung zusammen, die durch die Anwendung der genannten Methoden zur Untersuchung der Immunophiline, einer Familie cytosolischer naturstoffbindender Proteine, gewonnen wurden. Diese Erkenntnisse kulminierten in der Identifizierung und Charakterisierung pentamerer Komplexe, die aus zwei normalerweise nicht miteinander wechselwirkenden Proteinen und einem Naturstoff „Kleber“ bestehen, der die Proteine in einer biologisch signifikanten Weise aneinander bindet. Dabei wurde entdeckt, daß eine Proteinphosphatase ein wichtiges Element einer Art der cytoplasmatischen Signalübertragung ist.

2. Grundlagen

FK506^[1, 2] und Cyclosporin A^[3] (CsA) sind von Pilzen stammende Naturstoffe (Abb. 1), die Ca^{2+} -abhängige^[4] Signalübertragungswege in einer Reihe von Zelltypen inhibieren^[4, 5]. In T-Zellen inhibieren beide Agentien die Transkription einer Reihe von Genen, einschließlich des Gens für Interleukin-2 (IL-2), welche normalerweise durch Stimulierung (d.h. Bindung bestimmter extrazellulärer Moleküle) der T-Zell-Rezeptoren (TCR) aktiviert werden^[6]. In Mastzellen inhibieren sie die Exozytose von Sekretionsbläschen – d.h. deren Bewegung zur Zelloberfläche und Fusion mit der Zellmembran –, die gewöhnlich durch Stimulierung des Immunglobulin-E (IgE)-Rezeptors initiiert wird^[7]. Eine Vielzahl biochemischer und biologischer Daten zeigt, daß in bei-

[*] Die Begriffe Ca^{2+} -abhängig und -unabhängig beziehen sich in diesem Zusammenhang auf die Wege der Signalübertragung, die durch An- bzw. Abwesenheit einer unmittelbaren Konzentrationszunahme von intrazellulärem cytoplasmatischem Ca^{2+} nach Bindung an den Rezeptor an der Zelloberfläche charakterisiert sind.

[*] Prof. Dr. S. L. Schreiber, M. K. Rosen
Department of Chemistry, Harvard University
Cambridge, MA 02138 (USA)

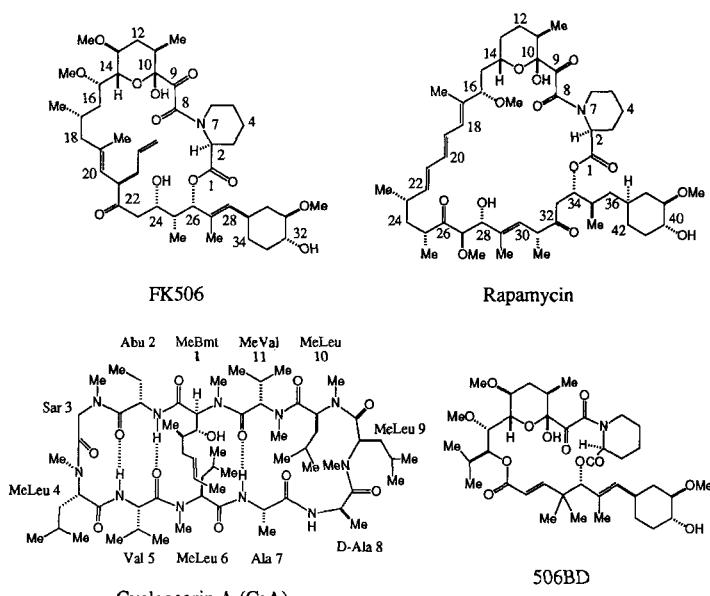


Abb. 1. Chemische Formeln der Immunophilin-Liganden.

den Fällen die Inhibierung im Cytoplasma erfolgt und nicht an der Zelloberfläche oder im Zellkern.

Auf biochemischer Ebene sind sich FK 506 und CsA ebenfalls sehr ähnlich. Mit Hilfe radioaktiv markierter und immobilisierter Derivate dieser Agentien zur Proteinreinigung wurde gefunden, daß beide mit hoher Affinität^[18] an lösliche Rezeptorproteine binden. Die Rezeptorproteine werden als Immunophiline^[18, 91] bezeichnet; dabei handelt es sich um Proteine, die Immunsuppressiva binden, da sowohl FK 506 als auch CsA ursprünglich als immunsuppressive Pharmaka^[2, 10] entdeckt wurden. Der FK 506-Rezeptor wurde FKBP (nach FK 506-Bindeprotein)^[11] genannt, der CsA-

Rezeptor Cyclophilin^[12] (CyP). Beide Proteine katalysieren die Isomerisierung von *cis*- und *trans*-Amidbindungsrotameren von Peptid- und Proteinsubstraten^[11, 12]. Die enzymatische Aktivität von FKBP wird maßgeblich durch Bindung von FK506 ($K_i = 0.4 \text{ nM}$), jedoch nicht durch CsA^[11] inhibiert, und die Aktivität von CyP wird durch CsA ($K_i = 6 \text{ nM}$)^[12], jedoch nicht durch FK506 inhibiert.

Obwohl FK 506 in Zellassays nahezu 100mal effektiver ist als CsA, verhalten sich die beiden Moleküle in fast jeder Hinsicht sowohl in T-Zellen als auch in Mastzellen gleich. Die ähnliche biologische Funktion und die Entdeckung, daß die Verbindungen zwei unterschiedliche Rotamasen^[1] blockieren, führten zur Annahme, daß die biologischen Wirkungen dieser Agentien auf deren Rotamaseinhibition beruhen. Es wurde angenommen, daß ein notwendiger Schritt bei der Aktivierung unbekannter Proteine, die für die IL-2-Transkription in T-Zellen erforderlich sind, die rotamasekatalysierte Isomerisierung einer Peptidyl-Prolyl-Amidbindung ist. Die Inhibition dieser Katalyse durch FK 506 oder CsA würde dann zur Inhibition dieses Prozesses führen^[13].

Starke Argumente gegen diese „Rotamase-Hypothese“ brachten biochemische und biologische Untersuchungen von zwei strukturverwandten Verbindungen: Rapamycin^[14, 15], einem immunsuppressiven Pilz-Naturstoff und FKBP-Ligand, und 506BD^[16], einem synthetischen FKBP-Liganden (Abb. 1). Betrachtet man die Strukturen der drei Liganden, ist es nicht überraschend, daß Rapamycin und 506BD wie auch FK 506 fest an FKBP binden und die Rotamaseaktivität des Enzyms inhibieren ($K_i(\text{Rapamycin}) = 0.2 \text{ nM}$; $K_i(506\text{BD}) = 5 \text{ nM}$)^[15, 16]. Die NMR-spektroskopische

[*] Die Bezeichnung Rotamase ist gleichbedeutend mit dem Kürzel PPIase (für Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase), das von anderen benutzt wurde, um Proteine zu beschreiben, die die Isomerisierung von *cis*- und *trans*-Amidbindungsrotameren von Peptiden und Proteinen katalysieren.



Stuart L. Schreiber wurde 1956 geboren und wuchs im Bundesstaat Virginia (USA) auf. 1977 schloß er das Studium der Chemie an der University of Virginia ab und promovierte anschließend bei R. B. Woodward und Yoshito Kishi an der Harvard University. Im Jahre 1981 begann er seine akademische Laufbahn am Department of Chemistry der Yale University. 1988 übernahm er eine Professur am Department of Chemistry der Harvard University. Seine Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Untersuchung biologischer Prozesse, wobei Methoden der Organischen Synthese sowie der Molekular- und Strukturbioologie zum Einsatz kommen.



Michael Rosen wurde 1965 in Philadelphia, Pennsylvania (USA), geboren. Bis 1987 studierte er Chemie und Chemietechnik an der University of Michigan und war 1987/88 als Winston Churchill Scholar bei Alan R. Battersby an der University of Cambridge (England). Seither arbeitet Michael Rosen als Doktorand in der Gruppe von Stuart L. Schreiber an der Harvard University, wobei er sich hauptsächlich für die NMR-spektroskopische Strukturanalyse von Proteinen und Protein-Ligand-Komplexen interessiert.

schen und kristallographischen Untersuchungen haben gezeigt, daß FK506 und Rapamycin mit derselben Rezeptorstelle von FKBP über ihre gleichartigen Strukturelemente in Wechselwirkung treten^[17]. Es ist faszinierend, daß Rapamycin nicht den gleichen T-Zell-Rezeptor(TCR)-vermittelten Signalübertragungsweg inhibiert, der durch FK506 und CsA beeinflußt wird, obgleich sowohl FK506 als auch Rapamycin an FKBP gebunden werden und dessen Rotamaseaktivität inhibieren. Es blockiert eher einen späteren Ca^{2+} -unabhängigen Weg, der mit der T-Zell-Aktivierung zusammenhängt und durch den IL-2-Rezeptor (IL-2R)^[15, 18, 19] vermittelt wird (Abb. 2). Noch verblüffender ist die Tatsache, daß

sind FK506 und Rapamycin „Prodrugs“, die durch Bindung an FKBP aktiviert werden. CsA ist ähnlich inaktiv, bis es an CyP bindet. Die Annahme, daß es sich bei den Immunophilin-Ligand-Komplexen um signalinhibierende Spezies handelt, ist als „Hypothese der aktiven Komplexe“ bezeichnet worden^[8, 9, 15, 16, 21]. Genetische Untersuchungen stützen diese Hypothese: Es wurde gezeigt, daß FKBP notwendig und hinreichend ist, um die Wirkung von Rapamycin in Hefe zu vermitteln^[22, 23], und daß CyP die Wirkung von CsA in diesem Organismus vermittelt^[21, 24]. Obwohl FK506 und Rapamycin sich strukturell ähneln und an das gleiche Protein (FKBP) binden, zeigen ihre FKBP-Komplexe paradoxe Weise unterschiedliche biologische Wirkungen. Außerdem unterscheidet sich die biologische Wirkung des CyP-CsA-Komplexes nicht von der des FKBP-FK506-Komplexes, auch wenn CsA strukturell keine Ähnlichkeit mit FK506 hat und CyP bindet, welches wiederum nicht mit FKBP verwandt ist. Es ist interessant darüber nachzudenken, daß ein noch zu entdeckender CyP-Ligand über Bindung an CyP einen Komplex bilden könnte, der die gleichen Eigenschaften wie der FKBP-Rapamycin-Komplex aufweist.

Eine offensichtliche, wenn auch unwahrscheinlich klinische Folge der biologischen Befunde ist, daß die strukturell nicht verwandten Komplexe FKBP-FK506 und CyP-CsA entweder direkt oder indirekt (über andere Proteine) über ein gemeinsames Zielmolekül (Target) wirken, welches sich vom Target bei der Reaktion mit dem FKBP-Rapamycin-Komplex unterscheidet. Das FKBP-FK506- und CyP-CsA-Target sollte eine Komponente der Ca^{2+} -abhängigen Signalübertragungswege sein, z.B. der TCR-vermittelten Transkription in T-Zellen und der IgE-Rezeptor-vermittelten Exozytose in Mastzellen. Das FKBP-Rapamycin-Zielmolekül dagegen sollte eine Komponente der Ca^{2+} -unabhängigen Signalübertragungswege sein, z.B. des IL-2R-vermittelten Wachstums in T-Zellen. In beiden Fällen sollte das Zielmolekül vom Protein oder vom Ligand allein unbeeinflußt bleiben, da nur die Immunophilin-Ligand-Komplexe aktive Inhibitoren sind (Abb. 3 oben).

Kürzlich konnten wir zeigen, daß Calcineurin (CN), auch als Proteinphosphatase 2B bekannt, eine calmodulinabhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase^[25], alle vorhergesagten biochemischen Eigenschaften eines FKBP-FK506- und CyP-CsA-Zielmoleküls aufweist^[26]. CN ist ein heterodimeres Protein, das aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist: Calcineurin A (CNA), welches die calmodulinbindenden und phosphataseaktiven Zentren enthält, und Calcineurin B (CNB), ein Ca^{2+} -bindendes Protein mit bislang unbekannter Funktion. Bindung von Calmodulin an CNA bewirkt ein zehnfaches Ansteigen der Phosphataseaktivität des Enzyms. In Assays zur direkten Bindung wird CN sowohl an FKBP-FK506- als auch CyP-CsA-Komplexe gebunden, jedoch nicht an FKBP oder CyP allein und auch nicht an den FKBP-Rapamycin-Komplex. Die Bindung von CN an FKBP-FK506 wird außerdem durch CyP-CsA (nicht aber durch CyP oder CsA allein) inhibiert. Das heißt, die beiden Komplexe konkurrieren um dieselben oder zwei wechselwirkende Bindungszentren. Die Phosphataseaktivität von Calcineurin, bestimmt an einem Phosphopeptidsubstrat, wird durch die Komplexe FKBP-FK506 und CyP-CsA stark inhibiert, bleibt jedoch unbeeinflußt durch FKBP, CyP, FK506, Rapamycin, 506BD oder den FKBP-Rapamycin-Komplex. Interessanterweise wurde kürzlich berichtet, daß die Trans-

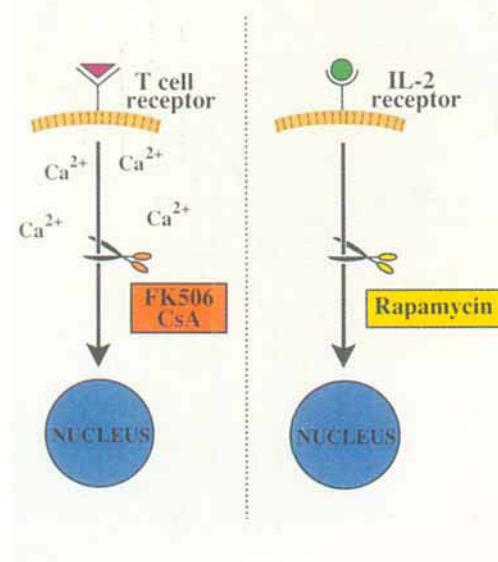
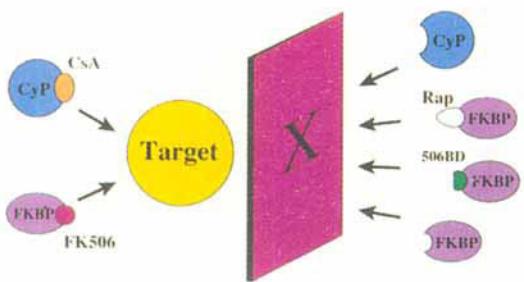


Abb. 2. FK506 und CsA inhibieren Ca^{2+} -abhängige Signalübertragungswege, während Rapamycin Ca^{2+} -unabhängige Wege inhibiert, wie exemplarisch an T-Zellen verdeutlicht wird. Die Signalübertragungswege gehen vom T-Zell-Rezeptor bzw. IL-2-Rezeptor aus. Analoge Signalübertragungen gibt es auch bei anderen Zelltypen, z.B. Mastzellen und Neuronen.

506BD keinen hemmenden Einfluß auf einen der Signalübertragungswege hat, die durch FK506 und Rapamycin inhibiert werden. Außerdem können FK506, Rapamycin und 506BD gegenseitig ihre Wirkung blockieren, vermutlich durch kompetitive Bindung an *einen* Rezeptor, FKBP. Im Gegensatz dazu bleibt die Wirkung von FK506 und Rapamycin durch CsA unbeeinflußt, da dieses keine Bindung mit FKBP eingeht. Die Aktivitäten von CsA werden weder von FK506, Rapamycin noch von 506BD beeinflußt, da sie nicht an CyP binden^[15, 16, 19, 20]. Wenn die biologischen Eigenschaften von FK506 und Rapamycin auf die Inhibition der Rotamaseaktivität von FKBP zurückzuführen wären, dann sollten auch beide die gleichen Reaktionswege beeinflussen. 506BD sollte dann ebenfalls diese Wege inhibieren und folglich biologisch aktiv sein. Daß dies jedoch nicht der Fall ist, impliziert, daß FK506 und Rapamycin *nicht* eine Funktion von FKBP *eliminieren*; vielmehr wird dem Protein eine Funktion *hinzugefügt*. In gewissem Sinne



Bindung zustande kommen. Die pentameren Immunophilin-Wirkstoff-CNA-Calmodulin-Komplexe (Abb. 3 unten) werden dann in Kenntnis biochemischer Daten zu Wechselwirkungen zwischen Immunophilin-Ligand-Komplexen und Calcineurin analysiert werden.

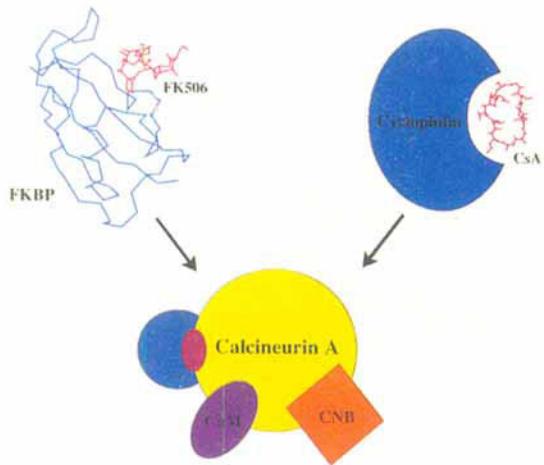


Abb. 3. Oben: Die Komplexe CyP-CsA und FKBP-FK506 wirken auf ein gemeinsames Zielmolekül (Target) ein, das nicht durch FKBP oder CyP allein oder durch die Komplexe FKBP-Rapamycin und FKBP-506BD angegriffen wird. Unten: Bildung des pentameren Immunophilin-Wirkstoff-CNA-CNB-Calmodulin-Komplexes (siehe Text).

lokation einer cytosolischen Komponente des Transkriptionsfaktors NF-AT (reguliert die IL-2-Transkription und ist FK506-sensitiv) in den Zellkern – nach Zunahme des intrazellulären Calciumspiegels – sowohl durch FK506 als auch CsA blockiert wird^[27]. Die Abhängigkeit vom intrazellulären Calciumspiegel und von der Lokalisierung im Cytosol sowie die Sensitivität für FK506 und CsA veranlaßten uns und andere Arbeitsgruppen zur Spekulation, daß diese Komponente von NF-AT ein Substrat für CN und die Lokalisierung in der Zelle vom Phosphorylierungsgrad abhängig sein könnte^[9, 28, 29]. Die Inhibierung der IL-2-Transkription durch FK506 und CsA wäre folglich ein Resultat der indirekten Inhibition der Dephosphorylierung einer Komponente von NF-AT. Wenn das bewiesen werden kann, zeigen diese Entdeckungen, daß CN ein cytoplasmatisches Signalaübertragungsmolekül ist.

Daraus ergibt sich eine wichtige Frage: Wie kann die Bindung von FK506 und Rapamycin an FKBP und von CsA an CyP, bei der die Liganden und die Rezeptoren verändert werden, die Komplexe dazu befähigen, Funktionen zu erfüllen, zu denen die individuellen Komponenten nicht in der Lage sind? Im weiteren konzentriert sich dieser Beitrag auf Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, die zur Beantwortung dieser Frage am relevantesten sind. Speziell wollen wir über die Strukturen der niedermolekularen Naturstoffe und der Proteine diskutieren sowie über die Änderungen, die durch

3. Untersuchungen zur Struktur von FKBP und seinen Komplexen mit FK506 und Rapamycin

3.1. Frühe Arbeiten

Die frühen Untersuchungen zur Struktur von FKBP-FK506- und CyP-CsA-Komplexen konzentrierten sich auf die Analyse der Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor. Diese Arbeiten wurden unter anderem dadurch vorangetrieben, daß zwei Mechanismen für die Rotamasekatalyse und folglich die Rotamaseinhibition durch die Liganden vorgeschlagen worden waren^[30] (Abb. 4). Der ei-

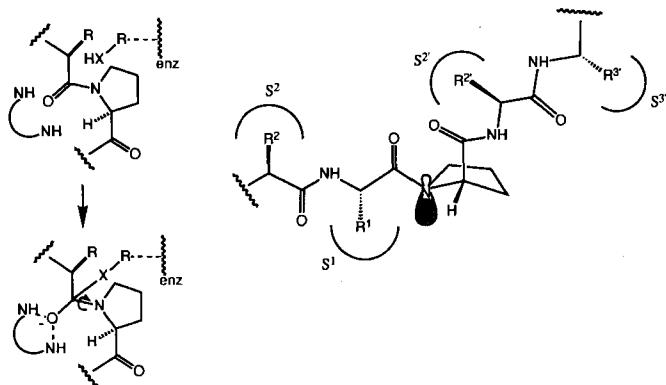


Abb. 4. Zwei vorgeschlagene Mechanismen der Rotamasekatalyse: Links: prämärer Schritt der Amidbindungskatalyse; rechts: Katalyse durch Stabilisierung einer verdrillten Amidbindung. enz = Enzym.

ne Mechanismus schließt die anfängliche Bildung eines tetraedrischen Enzym-Substrat-Adduktes ein, vergleichbar mit dem Addukt, das bei der Hydrolyse der Amidbindung durch Serin- oder Cystein-Proteasen entsteht. Resultat der Rotation um die C-N-Bindung im Addukt und des anschließenden Bindungsbruchs am tetraedrisch koordinierten Kohlenstoffatom wäre eine Isomerisierung der Amidbindung. Dieser Mechanismus wird durch Ergebnisse von Untersuchungen von Fischer et al.^[12b] gestützt. Diese zeigten, daß durch Modifizierung eines aktiven Cysteins in CyP mit *p*-Hydroxymercuribenzoësäure die Rotamaseaktivität des Enzyms verringert wird. Fischer et al.^[31] fanden außerdem einen inversen sekundären Deuterium-Isotopeneffekt mit Substraten, die $[\alpha, \alpha^2\text{H}]$ Gly-Pro enthalten. Dieser weist auf eine Änderung der Hybridisierung ($\text{sp}^2 \rightarrow \text{sp}^3$) und damit auf die Bildung einer kovalenten Bindung im Übergangszustand hin. Diese Ergebnisse wurden allerdings von Harrison und Stein^[32] angefochten, die unter Verwendung der gleichen Substrate einen normalen sekundären Deuterium-Isotopeneffekt fanden. Weiterhin wurde durch ortsspezifische Mutagenese gefunden, daß keiner der Cysteinreste in CyP für die Katalyse notwendig ist^[33]. Diese Ergebnisse und die Messung der thermodynamischen Aktivierungsparameter

von CyP^[32] und FKBP^[34, 35] führten zum Vorschlag eines alternativen Mechanismus der Rotamaseaktivität. Danach wird eine Übergangszustandsstruktur gebunden, die eine verzerrte oder verdrehte Amidbindung enthält. Die Energie, die benötigt wird, die Amidbindungsresonanz zu überwinden und die C-N-Bindung zu isomerisieren, würde aus den nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und einem Peptidsubstrat herrühren.

Der Mechanismus über das tetraedrische Intermediat führte zu der Annahme, daß FK506 und Rapamycin an FKBP durch nucleophilen Angriff einer Seitenkette des Enzyms an einem der beiden elektrophilen Carbonylkohlenstoffatome des Liganden (C8 oder C9) binden könnten. ¹³C-NMR-Untersuchungen des Komplexes aus vollsynthetischem [8,9-¹³C]FK506^[36] und rekombinantem menschlichen FKBP^[37] liefern allerdings keinen Beweis für die Bildung eines tetraedrischen Adduktes^[30]. Außerdem zeigten diese Untersuchungen, daß FK506 nur in einer Konformation an FKBP bindet, obwohl der freie Ligand in organischer Lösung als 2:1-cis-trans-Gemisch der Amidbindungsrotamere vorliegt.

Der Befund, daß FK506 und Rapamycin keine kovalente Bindung mit FKBP eingehen, legt eine mögliche Erklärung für die starke Wechselwirkung zwischen den Liganden und ihrem Rezeptor nahe. Im festen Zustand beträgt der Diederwinkel um die C8-C9-Bindung sowohl in FK506 als auch in Rapamycin etwa 90°. Diese Konformation wird auch in den Komplexen beider Liganden mit FKBP beibehalten. Ein Diederwinkel von 90° zwischen C8 und C9 und eine planare N7-C8-Amidgruppe plazieren die Ketocarbonylgruppe ungefähr senkrecht zur Ebene des Pipedolinylringes (Pipecolin = Methylpiperidin). Da der Pipecolinylring dem Prolinring in natürlichen Peptiden sehr ähnelt, befindet sich die Ketocarbonylgruppe von FK506 und Rapamycin in der gleichen Lage wie eine verzerrte Amidcarbonylgruppe eines Peptides, das der Rotamasekatalyse unterliegt (Abb. 5). Auf diese Weise ermöglichen die im rechten Winkel angeordneten Ketocarbonylgruppen von FK506 und Rapamycin es diesen Liganden, die Übergangszustandsstruktur, die eine verzerrte Amidbindung enthält, nachzuahmen^[30].

Die Betrachtung von FK506 und Rapamycin als verdrillte Amid-Peptidomimetica wurde durch Untersuchungen der Substratspezifität von FKBP erweitert^[34]. Es zeigte sich, daß in der Peptidserie Succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-(*p*-Nitro)anilid die Peptide mit den verzweigten hydrophoben Aminosäuren Leu, Ile und Val als Xaa (Leu > Ile > Val) stark bevorzugt sind (bis zu 1000fach bessere Substrate als Peptide mit Xaa-Aminosäuren mit geladenen Seitenketten, bestimmt durch Messung der $K_{cat}K_m^{-1}$ -Werte). Die Strukturanalyse von FK506 und Rapamycin bietet eine vernünftige Erklärung dieser Beobachtungen. Beginnend mit der Pipecolinsäureeinheit und fortlaufend in der „N-terminalen“ Richtung haben beide Liganden eine Dicarbonyl- und eine tertiäre Hydroxygruppe sowie eine verzweigte aliphatische Kette. Diese Struktur ähnelt einer Peptideinheit mit Amidcarbonylgruppe, Amidstickstoff und der Seitenkette eines verzweigten aliphatischen Aminosäurerestes, der N-terminal mit Prolin verknüpft ist (Abb. 6). Die Bindung von FK506

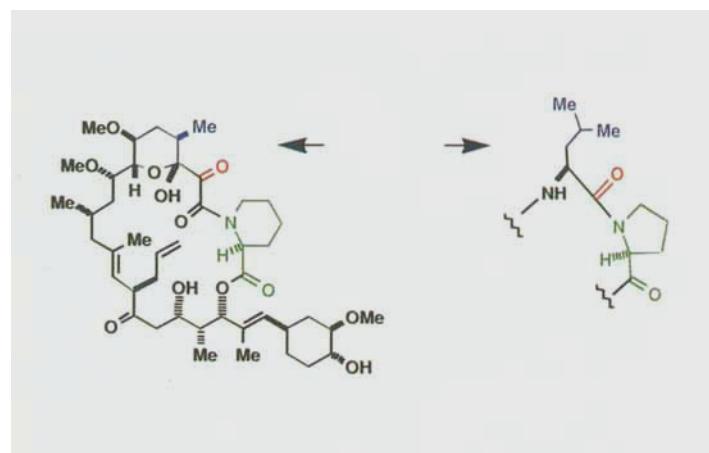


Abb. 6. FK506 (links) und Rapamycin können ein Leucin-Prolin-Substrat (mit verdrillter Amidbindung rechts) imitieren. Die analogen Atome haben die gleiche Farbe. Leu ist der bevorzugte P1-Rest.

und Rapamycin an FKBP sollte demnach aus der Fähigkeit der Liganden resultieren, ein Leu-Pro-Dipeptid mit verdrillter Amidbindung zu imitieren^[38].

3.2. Dreidimensionale Strukturen

Um die enzymatischen, ligandbindenden und biologischen Eigenschaften der Immunophilin weiter zu klären, untersuchten wir NMR-spektroskopisch die Struktur von ungebundenem menschlichen FKBP^[39-41]. Bedeutsam für den Erfolg unserer Bemühungen waren die vorteilhaften Eigenschaften dieses Enzyms: Es ist löslich und stabil und liefert hervorragende NMR-Spektren. Aus der fruchtbaren Zusammenarbeit mit Professor Jon Clardys Arbeitsgruppe an der Cornell University resultierten hochaufgelöste Kristallstrukturen sowohl des FKBP-FK506- als auch des FKBP-Rapamycin-Komplexes^[42-44]. Die Analyse von drei FKBP-Strukturen (gebundene und freie Formen) ermöglichte neue Einblicke in zahlreiche Aspekte der Immunophilinfunktion.

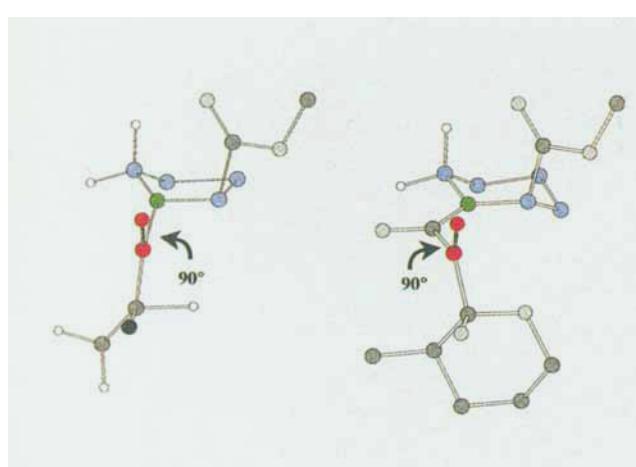


Abb. 5. FK506 und Rapamycin können eine verdrillte Peptido-Prolyl-Amidbindung in einem Peptidsubstrat imitieren. Links: Modell einer verdrillten Amidbindung in einem Peptidsubstrat. Rechts: Teil der Struktur von freiem FK506 im Kristall. Die analogen Carbonylgruppen in den beiden Strukturen sind rot gekennzeichnet.

3.2.1. Übersicht über die Strukturen

Alle drei FKBP-Strukturen zeigen die gleiche Faltung des Proteins (Abb. 7 links). Die Struktur ist durch eine fünfsträngige antiparallele β -Faltblattstruktur mit einer neuen +3, +1, -3, +1-Schleifentopologie charakterisiert. Die Stränge der Faltblattstruktur, die fast rechtwinklig zur Längsachse des Moleküls verlaufen, bestehen aus den Resten 2–8, 21–30, 35–38 und 46–49 (dieser Strang wird durch eine Schleife von Rest 39–45 unterbrochen), 71–76 sowie 97–106. Eine kurze amphipatische α -Helix mit den Re-

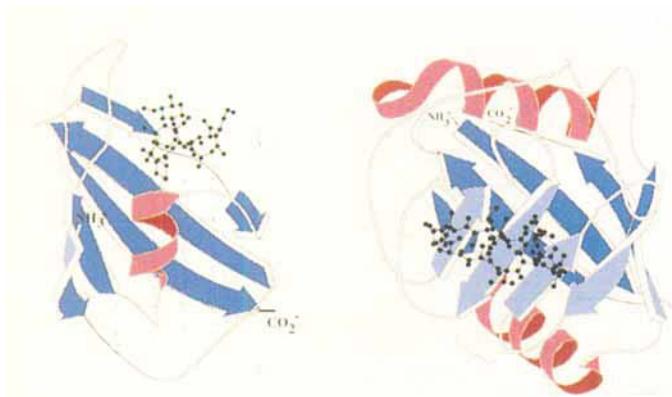


Abb. 7. Richardson-Darstellung von FKBP (links) und CyP (rechts). Ein Kugel-Stab-Modell von FK506 ist im Ligandbindungsbereich von FKBP positioniert [42, 44]. Ein analoges Modell von CsA [69, 70] wurde benutzt, um schematisch die Lage des Ligandbindungsbereiches in CyP zu kennzeichnen [67, 68]. Wir erzeugten das Modell des CyP-CsA-Komplexes durch Andocken der Struktur von gebundenem CsA [69] an die Struktur von freiem CyP[68], wobei wir auf intermolekulare NOEs, die zwischen MeLeu 9 von CsA und Trp 121 von CyP [73] beobachtet wurden, zurückgriffen. Wir danken Professor Ke für die Koordinaten von CyP.

sten 57–63 richtet sich nach der Längsachse des Proteins aus und lagert sich an die Faltblattstruktur an, wodurch ein dichtgepackter hydrophober Kern entsteht. Der Kern ist ausschließlich aus aliphatischen und aromatischen Resten aufgebaut, wobei außer einem alle aromatischen Reste an einem Ende des Moleküls gruppiert sind. Die konservierten aromatischen und aliphatischen Seitenketten von Tyr 26, Phe 36, Phe 46, Val 55, Ile 56, Trp 59, Tyr 82 und Phe 99 umsäumen am N-Terminus der α -Helix eine flache Spalte, die Bindungsstelle für FK506 und Rapamycin. Die Seitenketten dieser Reste sind sowohl in der gebundenen als auch freien Form von FKBP gut definiert (Abb. 8 und 9). Beide Liganden füllen die Bindungstasche gut aus und zeigen eine Reihe ähnlicher hydrophober Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein. Der bindende Bereich von FK506, d.h. der Teil des Moleküls, der mit FKBP in Wechselwirkung tritt, reicht von der C24-Hydroxygruppe über die Diketopipecolineinheit und den Pyranosering bis zur C15-Methoxygruppe. Dieser Befund wurde aufgrund der Strukturanalyse von FK506 und Rapamycin sowie ihrer biologischen Eigenschaften erwartet und führte zum Entwurf des FKBP-Liganden 506BD (siehe Abb. 1)^[16]. Der größte Teil des trisubstituierten Cyclohexylrestes (C26–C34) von FK506 und die Kohlenstoffatome C18–C23 des Makrocyclus, einschließlich der Allylgruppe, kommen mit FKBP nicht in Berührung und sind dem Lösungsmittel ausgesetzt.

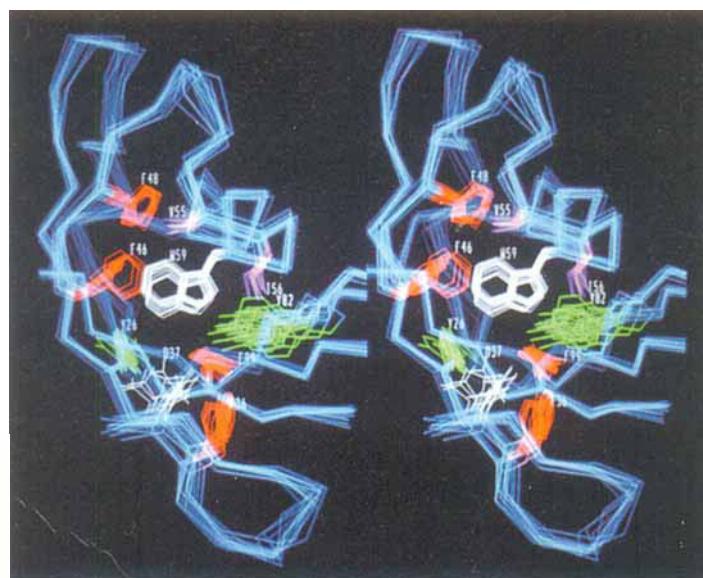


Abb. 8. Stereobild ausgewählter Reste in der Ligandbindungstasche von FKBP. Überlagerung von 15 Strukturen des freien Proteins, die durch Moleküldynamiksimulationsrechnung (NOE restrained) ermittelt wurden. Die Orientierung ist ungefähr senkrecht zu der in Abbildung 7 (die α -Helix liegt oben rechts und die β -Stränge unten links). Die Reste sind durch den Ein-Buchstaben-Aminosäurecode gekennzeichnet. Farbe der Seitenketten: Phe = rot; Tyr = grün; Arg, Asp, Trp = weiß; Ile, Val = purpur. Die Schleifen Ser 38-Pro 45 und Gly 83-His 94 wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

Ähnlich verläuft der bindende Bereich des Rapamycins von der C28-Hydroxygruppe bis zum Pyranosering; die Kohlenstoffatome C15–C27 sind in Kontakt mit dem Lösungsmittel. Der Cyclohexylrest von Rapamycin (C34–C42) orientiert sich anders als der von FK506 und geht mehrere Wechselwirkungen mit FKBP ein. Der Pipecolinylrest ist der am tiefsten eingebettete Teil beider Liganden (Abb. 9). Er steht in van-der-Waals-Wechselwirkung mit dem Indolring von Trp 59 an der Bindungstaschenrückseite und mit den Seitenketten von Tyr 26, Phe 46, Val 55, Ile 56 und Phe 99 an den Seiten der Bindungstasche. Die unmittelbare Nähe die-

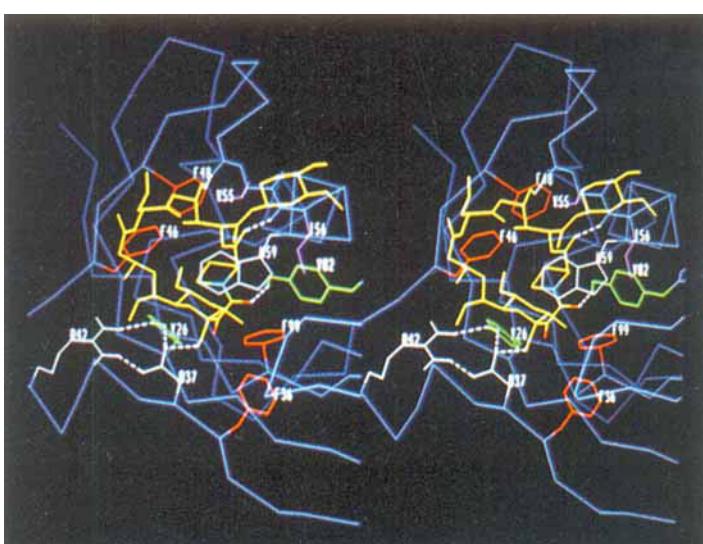


Abb. 9. Stereobild ausgewählter Reste in der Bindungstasche des FKBP-FK506-Komplexes. Orientierung und Farben der Seitenketten wie in Abbildung 8. Gebundenes FK506 ist gelb, Wasserstoffbrückenbindungen (siehe Text) sind weiß dargestellt.

ser Gruppe zu den aromatischen Resten des Proteins wird auch in NMR-Spektren des FKBP-FK506-Komplexes durch die extreme Hochfeldverschiebung ($\delta = -2$ bis 0) der Pipecolinylmethylen-Protonen und einige NOE-Kreuzsignale im Arenbereich widergespiegelt^[17]. Daneben treten weitere hydrophobe Kontakte zwischen den Liganden und dem Protein auf. Dazu gehören auch Wechselwirkungen zwischen dem Pyranosering und den Resten Tyr 26, Asp 37, Tyr 82, His 87 und Ile 90 sowie zwischen den Regionen C24–C26 von FK506 und C28–C32 von Rapamycin und den Resten Phe 46 und Glu 54 von FKBP. Folglich könnten die nanomolaren Bindungskonstanten von FK506 und Rapamycin teilweise auf die komplementären hydrophobe Oberfläche von FKBP zurückzuführen sein.

Die günstigen van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen FKBP und FK506/Rapamycin werden durch ein ähnliches Netz intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen ergänzt. Beide Liganden haben gleiche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der C1-Estercarbonylgruppe und dem Ile56-NH, der C8-Amidcarbonylgruppe und der phenolischen OH-Gruppe von Tyr 82, der Hemiketal-OH-Gruppe an C10 und dem Asp37-Carboxylat. Trotz der Unterschiede zwischen den Bereichen C24–C26 von FK506 und C28–C33 von Rapamycin können beide analogen Wasserstoffbrückenbindungen zu Glu 54-CO eingehen (FK506 von der C24-Hydroxygruppe, Rapamycin von der C28-Hydroxygruppe aus). Rapamycin zeigt eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen der C40-Hydroxygruppe und der CO-Gruppe der Glu 53-Seitenkette. Analoges konnte für den FKBP-FK506-Komplex nicht beobachtet werden. Das Muster der Wasserstoffbrückenbindungen, an denen Ile56-NH, Glu54-CO und Gln53-CO beteiligt sind, erinnert an die antiparallelen β -Faltblatt-artigen Strukturen, die man oft in Protein-Peptid-Komplexen gefunden hat. Wasserstoffbrückenbindungen werden dann noch zwischen dem Protein und Teilen von FK506 und Rapamycin, die man als peptidomimetisch beschreiben könnte, gebildet: die Bereiche zwischen der C1-Carbonylgruppe und der C24- bzw. C28-Hydroxygruppe. Die strukturelle Analogie zwischen den Liganden und einem Tetrapeptid ist in Abbildung 10 dargestellt. Die

Pipecolinylestercarbonylgruppe wirkt wie die Prolinamidcarbonylgruppe in einem Leu-Pro-Peptidfragment. Der Bereich von O1 bis C25 (C29 in Rapamycin), einschließlich der Cyclohexyleinheit, entspricht etwa einem aromatischen Aminosäurerest. Die C24-Hydroxygruppe (C28-OH in Rapamycin) entspräche dann dem Amid-NH des darauffolgenden Restes in der Kette. Folglich könnten FK506 und Rapamycin an FKBP gebunden werden, indem sie als Übergangszustandsanaloga eines Leu(oder Val)-Pro-Xaa-Yaa-Peptides fungieren. Wir sind augenblicklich dabei, diese Hypothese mit Peptiden und Peptidanalogien (designed anhand der Strukturen von FKBP-FK506- und FKBP-Rapamycin-Komplexen)^[45] zu untersuchen. Biochemische Studien und die Strukturanalyse der Komplexe mit FKBP (durch Röntgenkristallstrukturanalyse und/oder NMR-Spektroskopie) sollten es dann ermöglichen, die energetischen Beiträge der verschiedenen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen zu klären.

Die Hypothese, daß FK506 und Rapamycin Übergangszustandsanaloga eines FKBP-Substrates sind, würde bedeuten, daß außer den oben diskutierten noch weitere wichtige Wechselwirkungen zwischen dem Protein und der Ketocarbonylgruppe der Liganden vorhanden sein sollten. Diese könnten dann eine verzerrte Amidbindung eines Übergangszustands bei der Rotamasekatalyse stabilisieren. Anfangs hatten wir aufgrund der zahlreichen bekannten Strukturen von Protein-Ligand-Komplexen angenommen, daß die Ketocarbonylgruppe (an C9) durch ein Netz von Wasserstoffbrückenbindungen oder typische elektrostatische Wechselwirkungen mit geladenen Resten gebunden wird. Die Strukturen der beiden Rezeptor-Ligand-Komplexe zeigen aber deutlich, daß die Ketocarbonylgruppe keine Wasserstoffbrückenbindung zum Protein oder andere Kontakte zu irgendwelchen geladenen Resten des Proteins aufbaut. Stattdessen liegt sie in unmittelbarer Nähe zu den C⁶H-Atomen an den Kanten von drei aromatischen Ringen, Tyr 26, Phe 36 und Phe 99 (Abb. 9). Solche C–H \cdots O-Wechselwirkungen wurden in kleinen organischen Molekülen^[46] und Proteinen^[47] beobachtet, und es wurde postuliert, daß diese zur Stabilität solcher Systeme beitragen. Auch die Ergebnis-

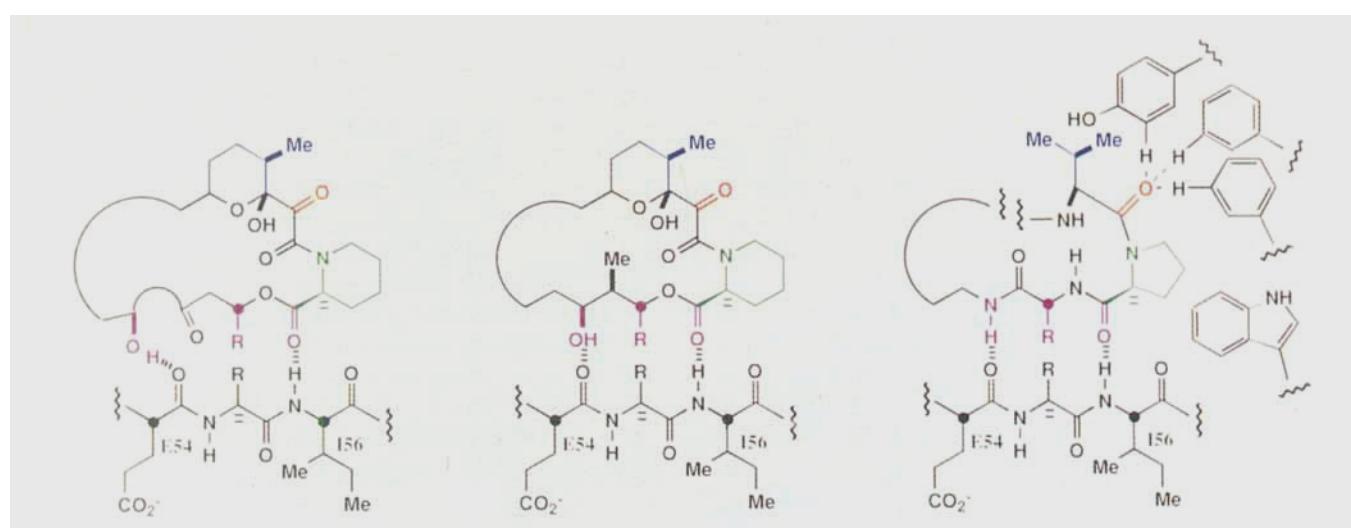


Abb. 10. Schematische Darstellung der Bindung zwischen FKBP und den Liganden Rapamycin (links) und FK506 (Mitte) sowie einem Peptid (rechts). Analoge Atome sind durch die gleiche Farbe gekennzeichnet.

se theoretischer Arbeiten stützen die Vorstellung, daß C–H···O-Wechselwirkungen sowohl kleine Moleküle als auch Proteine stabilisieren^[48]. Unseres Wissens sind aber die FKBP-Komplexe die ersten Beispiele für diese Wechselwirkung, wo sie signifikant zur Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor beiträgt. Außerdem liegt damit auch ein neuerlicher Katalysemechanismus vor, bei dem die Stabilisierung des Übergangszustandes durch Aren-CH-Carbonyl-Wechselwirkungen erreicht wird.

3.2.2. Strukturelle Konsequenzen der Bindung

Da weder FKBP noch FK506 oder Rapamycin in der Lage sind, CN zu binden oder die Phosphataseaktivität von CN zu inhibieren, ist es bedeutsam, die Unterschiede zwischen den freien und den gebundenen Formen sowohl des Proteins als auch der Liganden zu analysieren, um die biologische Wirkungsweise der beiden Komplexe zu verstehen. Wie werden FKBP und seine Liganden durch Bindung so aktiviert, daß FKBP-FK506 Calcineurin (CN) und FKBP-Rapamycin ein anderes Zielprotein erkennt? Die Existenz und Kenntnis freier und gebundener Strukturen aller Komponenten dieser Komplexe ermöglichen ein Herangehen an diese Frage.

3.2.2.1. Vergleich von freiem und gebundenem FKBP

Vergleicht man die Struktur von freiem FKBP mit der der FKBP-Ligand-Komplexe, wird deutlich, daß die Mehrzahl der Reste in der Proteinbindungtasche durch die Ligandbindung kaum gestört wird. Insbesondere zeigen die aromatischen und aliphatischen Reste, die direkt mit dem Ligand wechselwirken (Tyr 26, Phe 46, Val 55, Ile 56, Trp 59 und Phe 99), nur geringe Veränderungen in den Konformationen beim Übergang von der gebundenen in die freie Form (vgl. Abb. 8 und 9). Außerdem unterscheiden sich auch Bereiche des Proteins, die nicht direkt in die Bindung einbezogen sind (z.B. der größte Teil der α -Helix und des β -Faltblatts), in gebundener und freier Form nur unwesentlich. Feine Veränderungen in diesen Bereichen könnten sich als bedeutsam erweisen, doch scheint dies, wie in Abschnitt 5 diskutiert wird, unwahrscheinlich. Es gibt aber mehrere Schleifen in FKBP, die hinsichtlich Struktur und Dynamik wesentliche Veränderungen infolge der Ligandbindung erfahren. Diese Schleifen sind, nicht überraschend, am Rand der Bindungstasche zu finden. In freiem FKBP konnte die durch die sieben Reste Ser 39 bis Pro 45 erzeugte Ausbuchtung, die in der Mitte des fünften Stranges des β -Faltblatts liegt, anhand der NMR-Daten strukturell nur mangelhaft charakterisiert werden (Abb. 11). Das Fehlen mittel- und langreichweiterer NOEs in dieser Schleife und die relativ schwachen sequentiellen und Aminosäure-internen („intraresidualen“) NOEs legen weiterhin nahe, daß dieser Bereich eine große Zahl von Konformationen einnimmt (Fehlordnung). Bei der Kristallstrukturanalyse des FKBP-FK506-Komplexes ergab diese Schleife jedoch eine gut definierte Elektronendichte. Die Struktur wird durch eine besonders große Zahl von Rückgrat/Rückgrat- und Rückgrat/Seitenketten-Wasserstoffbrückenbindungen trotz ihrer eher ungewöhnlichen Konformation stabilisiert. Ein ähnlicher Satz von Wasserstoffbrück-

kenbindungen findet sich auch im FKBP-Rapamycin-Komplex. Allerdings weisen die hohen Temperaturfaktoren der Reste 40–43 in dieser Struktur auf größere Beweglichkeit oder Fehlordnung als im FKBP-FK506-Komplex hin. Dieser Unterschied röhrt wahrscheinlich von der unterschiedlichen Zahl intermolekularer Kontakte in dieser Region in beiden Komplexen her^[44].

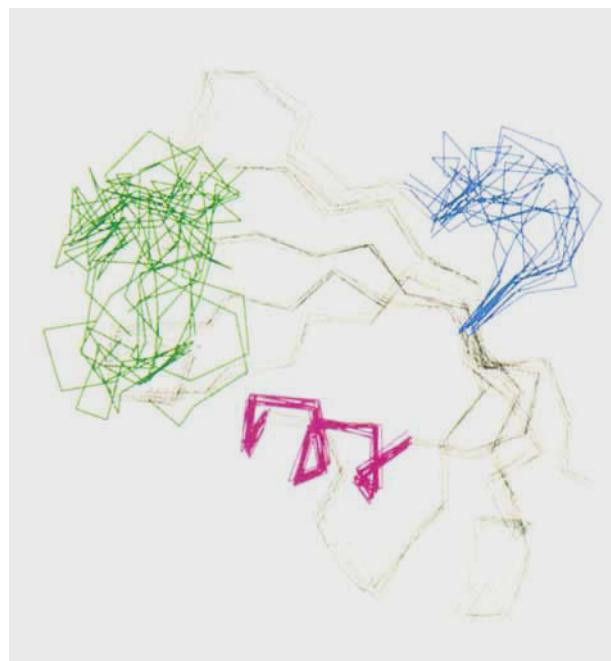


Abb. 11. Überlagerung des α -Kohlenstoffgerüsts von zehn Strukturen des freien FKBP's, erzeugt durch Moleküldynamiksimulationen unter Einbeziehung der NOEs als experimenteller Randbedingung. Die Blickrichtung ist wie bei Abbildung 8 und 9. Die α -Helix ist rot (wie in Abb. 7). Die basische Schleife Ser 38–Pro 45 ist blau, die Schleife Gly 83–His 94 grün.

In beiden Strukturen scheinen viele der Wasserstoffbrückenbindungen durch eine Asp-Arg-Tyr-Triade^[49], die die Seitenketten von Asp 37, Arg 42 und Tyr 26 einschließt, ermöglicht zu werden (siehe Abb. 9). Diese Wechselwirkung beugt das Rückgrat der Schleife zum Rumpf des Proteins, wodurch sich viele Wasserstoffbrücken-donoren und -acceptoren nahekommen. In freiem FKBP konnte für solche Wechselwirkungen mit Arg 42 bisher NMR-spektroskopisch kein Beweis erbracht werden. Vorläufige NMR-Studien am FKBP-FK506-Komplex zeigten, daß die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen mehrerer Reste zwischen Ser 39 und Pro 45 durch die Ligandbindung deutlich verändert werden. Daraus folgt, daß die Ligandbindung die Möglichkeiten für Wasserstoffbrückenbindungen in diesem Bereich erhöht und die Konformation und/oder Beweglichkeit der Schleife verändert. Es ist interessant, daß der Bereich von Lys 34 bis Lys 44 eine der am höchsten geladenen (sieben von elf Resten sind geladen) und am stärksten basischen (effektive Ladung +3) Sequenzen von FKBP ist (siehe hFKBP12-Sequenz in Abb. 12). Die Nähe zum gebundenen Ligand, die strukturellen Änderungen durch die Ligandbindung und die hohe Ladungsdichte weisen darauf hin, daß dieser Bereich für die Bindung an CN im pentameren Komplex wichtig sein könnte.

Mustrans2	16	GVDISPKQDE	GVLKVIKREG	TGTETPMIGD	RVFVHYTGWL	LDGTFKD-----SSL	DR-K-DKFSFDL	75
PaORF	117	ARFGVREL TG	GVLVSELRRG	QGNGIGAATQ	-VHVRYRGLL	ADGQVFD-----QSE	SA---EWFALD-	173
CtMIP	57	KAGVIELEPN	KLHDRVVKEG	TGRVLSG-KP	TALLHYTGSF	IDGKVFD-----SSE	KN-K-EPIILLPL	115
LpMIP	117	NKPGVVV LPS	GLQYKVINAG	NG-VKPGKSD	TVTVEYTGRL	IDGTVFD-----STE	KT-G-KPATFQV	175
NmFKBP	1	M	GSLIIEDLQE	SFGKEAVKGK	EITVHYTGWL	EDGTFKD-----SSL	DR-R-QPLTITL	51
ScFKBP	1	MSEVIEG	NVKIDRISPG	DGATFPKTGD	LVTIHYTGT	ENGQKFD-----SSV	DR-G-SPPFCNI	57
NcFKBP	1	MTIPQLD	GLQIEVQQEG	QGTRETRRGD	NVDVHYKGVL	TSGKKFD-----ASY	DR-G-EPLNFTV	57
hFKBP13	1	TGAEGKRK	LQIGVKRKVD	HCPIKSRKGD	VLHMHYTGKL	EDGTEFD-----SSL	PQ-N-QPFVFSL	58
bFKBP30	92	SEETLDEGPP	KYTKSVLKKG	DKTNFPKKGD	VVHCWYTGT	QDGTVFDTNIQTSSK	KKKNAKPLSFKV	158
bFKBP12	1		GVQVETISPG	DGRTFPKRGQ	TCVVHYTGML	EDGKKFD-----SSR	DR-N-KPFKFVL	50
hFKBP12	1		GVQVETISPG	DGRTFPKRGQ	TCVVHYTGML	EDGKKFD-----SSR	DR-N-KPFKFML	50
		BBB BBB		22 BBB BBB BBB	11 BBB	B33 11	BBB B2	
Mustrans2	76	GKGEVIKAWD	IAVATMKVGE	VCHITCKPEY	AYGAAGSPPK	IAPPNATLVFE	VELFEFKGED	LTEED
PaORF	174	S---VIEGWR	TALRAMPVGA	RWRVVIPI SAQ	AYHGEGAGDL	IAPPDAPLVFE	IDLLGFR*	227
CtMIP	116	TK--VIPGFS	QGMQGMKEGE	VRVLYIHPDL	AYGTTAGQ--L	-PPNSLLIFE	VKLIEANDDN	VSVTE*
LpMIP	176	S--QVIPGWT	EALQLMPAGS	TWEIYVPSGL	AYGPRSVGGP	IAPPNETLIFK	IHLISVKKSS	*
NmFKBP	52	GVGQVIKGWD	EGFGGMKEGG	KRKLTIPSEM	GYGatrrggv	IAPPHATLIFE	VELLK VYE*	109
ScFKBP	58	GVGQVIKGWD	VGIPKLSVGE	KARLTIPGPY	AYGPRGF PGL	IAPPNSTL VFD	VELLKVN*	114
NcFKBP	58	GQQQVIKGWD	EGLLGMKIGE	KRKLTIA PHL	AYGNRAVGGI	IAPPANSTLIFE	TELVG IKGVQ	KGE*
hFKBP13	59	GTGQVIKGWD	QGLLGMC EGE	KRKLVIPSEL	GYGERGAPPK	IAPPGGATLVFE	VELLKIERRT	EL*
bFKBP30	159	GIGKVIRGWD	EALLTMSKGE	KARLEIEPEW	AYGKKGQPDX	IAPPQPNXLIFE	VELV DID*	215
bFKBP12	51	GKQE VIRGWE	EGVAQM SVGQ	RAKLTISP DY	AYGATGHPGI	IAPPNATL IFD	VELLKLE*	107
hFKBP12	51	GKQE VIRGWE	EGVAQM SVGQ	RAKLTISP DY	AYGATGHPGI	IAPPHATLVFD	VELLKLE*	107
	2	aaaaa	aaall	22 BBB BBB	311 2'3	22 BBB	BBB BBB	

Abb. 12. Sequenzanordnung bekannter FK-BPs. Es wird nur der homologe Bereich jedes Proteins gezeigt. Die Zahlen an den Enden jeder Reihe sind die Positionen der benachbarten Aminosäuren im gesamten Protein. Lücken in den Sequenzen sind durch Bindestriche ausgefüllt, C-Termini sind mit Sternen markiert und unsichere Zuordnungen in Kleinbuchstaben geschrieben. Buchstaben in fetter Schrift entsprechen Resten von hFKBP12, die mit FK506 in Wechselwirkung treten (nach der Röntgenstrukturanalyse des Komplexes) [42, 44]. Der Grad der Erhaltung wird durch gefüllte oder leere Kreise über den Sequenzen angezeigt: ● vollständig konserviert, ○ starke Priorität für eine Aminosäure (mindestens siebenmal), ◉ konservative Substitutionen, ○ meist ähnliche Aminosäuren. Ganz unten unter den Sequenzen ist die Sekundärstruktur von hFKBP12 (im Komplex mit FK506) angegeben: α -Helix markiert mit α , antiparalleler β -Strang mit β und β -Turns mit Zahlen, um die entsprechenden zweiten und dritten Positionen zu kennzeichnen. Die folgenden Sequenzen sind aufgenommen: menschliches FKBP12 [37], Rinder-FKBP12 [57a], Rinder-FKBP25 [57b], menschliches FKBP13 [56], NcFKBP (*Neurospora crassa*) [57c], ScFKBP (*Saccharomyces cerevisiae*) [57d], NmFKBP (*Neisseria meningitidis*) [57e], LpMIP (*Legionella-pneumophila*-Makrophagenaktivitätspotenziator) [57f], CtMIP (*Chlamydia trachomatis*) [57g], PaORF (offener Leserahmen im *Pseudomonas-aeruginosa*-algR2-Gen) [57h] und MuTrans2 (Homologes vom Maus Transition Protein 2) [57i].

Eine zweite Region von FKBP, die sich bei Ligandbindung deutlich zu verändern scheint, ist das Segment von Tyr 82 bis His 94 (grün in Abb. 11). Diese Schleife ist in freiem FKBP nur ungenügend definiert. Dieses Segment zeigt wie die oben beschriebene basische Schleife wenige langreichweitigen NOEs und nur schwache sequentielle und Aminosäure-interne NOEs. Zusätzlich liefern die TOCSY- und NOESY-NMR-Spektren Hinweise auf zwei unterschiedliche Konformationen der Schleife, die sich langsam (auf der NMR-Zeitskala) ineinander umwandeln^[39]. Obwohl die exakte Natur dieser Umwandlung bisher noch nicht bekannt ist, zeigen Störungen in der chemischen Verschiebung, daß verschiedene Reste zwischen Tyr 82 und His 87 involviert sind^[50]. Folglich scheint die Schleife Tyr 82 bis His 94 bei Abwesenheit eines Liganden zwei oder mehr unterschiedliche Konformationen einzunehmen. Im Gegensatz dazu liegt die Schleife in beiden FKBP-Ligand-Komplexen in einer einzigen, gut definierten Konformation vor, die durch mehrere Wasserstoffbrückenbindungen im Protein und eine Reihe von van-der-Waals-Wechselwirkungen zum Ligand stabilisiert ist. Diese Veränderungen deuten darauf hin, daß auch diese Schleife (wie die von Ser 39 bis Pro 45) in die CN-Erkennung einbezogen sein könnte. Wenn dies zuträfe, dann könnte die CN-Bindungsregion eine Ausdehnung von fast 20 Å haben und Regionen sowohl hoher positiver Ladungsdichte (vom Protein) als auch hoher Hydrophobie (vom Liganden) enthalten. Derzeit werden Mutant-

geneseuntersuchungen durchgeführt, um die Bereiche von FKBP, die bei der Bildung des ternären Komplexes mit CN wesentlich sind, definitiv zu identifizieren.

3.2.2.2. Vergleich der freien und gebundenen FKBP-Liganden

Die Unterschiede zwischen freiem und gebundenem FK506 und Rapamycin sind ebenfalls sehr aufschlußreich. Ungebundenes FK506 wurde vielfältig untersucht, unter anderem durch Röntgenstrukturanalyse^[1], NMR-Spektroskopie^[51, 52] und theoretische Rechnungen^[53]. Abbildung 13 zeigt oben die Struktur des freien Moleküls^[1]. FK506 liegt im Kristall (kristallisiert aus organischem Lösungsmittel) als ein Konformer mit einer *cis*-Amidbindung vor. Dagegen findet man in organischer Lösung ein 2:1-Gemisch von *cis*:*trans*-Amidbindungsrotameren^[1, 51, 52]. Die Strukturen der beiden Rotamere wurden kürzlich durch Moleküldynamiksimulationen mit NOEs als experimenteller Randbedingung berechnet^[51, 52]. Obgleich sie in mancher Hinsicht der Struktur im Kristall ähneln, unterscheiden sich die beiden Konformere in anderen Aspekten beträchtlich. Im FKBP-bindenden Bereich ähnelt die *cis*-Struktur in Lösung der Struktur im Kristall. In der Region um C23 zeigen sich aber große Abweichungen in den C20-C21-, C21-C22-, C23-C24-, C24-C25-, C25-C26- und C26-C27-Torsionswinkeln. Am bemerkenswertesten ist, daß der Cyclohexylrest im Kristall

vom Makrocyclus wegweist, während er in Lösung unter den Makrocyclus gefaltet ist, was auf einen Diederwinkel von 91° (C25-C26-C27-C28) zurückzuführen ist. Das in Lösung vorliegende *trans*-Konformer unterscheidet sich in der FKBP-bindenden Domäne von der Struktur im Kristall, während der Rest des Moleküls relativ ähnlich ist. Neben den Veränderungen der C1-C2- und C9-C10-Torsionen (wegen der *trans*- versus *cis*-Amidbindung) liegen die einzigen Unterschiede zwischen beiden Strukturen in den Torsionswinkeln von C16 bis C19. Ein wesentliches Merkmal (siehe unten) aller drei ungebundenen Konformere ist die Orientierung der Pyranoseeinheit außerhalb des Makrocyclus, wodurch der Pyranosering keinerlei intramolekulare Wechselwirkungen eingeht.

Ungebundenes FK506 wurde auch theoretisch untersucht^[53]. Variation der Torsionswinkel im Makrocyclus des Moleküls nach der Monte-Carlo-Methode ergab 21 Konformationen mit niedriger Energie (maximal 12 kcal mol⁻¹ mehr als die Struktur geringster Energie)^[53], darunter auch die *cis*- und *trans*-Amidbindungsisomere. Mit Moleküldynamiksimulationen sind Struktur und Dynamik von FK506 in

Wasser berechnet worden^[53] (die Unlöslichkeit von FK506 in wäßrigem Medium verhinderte direkte Strukturanalysen in dieser Umgebung). Im Verlauf einer 200ps-Simulation (beginnend mit der energieminierten Struktur im Kristall) hat FK506 zwei stabile Konformationen eingenommen, die sich primär in ihren C17-C18- und C18-C19-Torsionswinkeln unterschieden. Flexibilität war auch um die C1-C2- und C8-C9-Torsionen zu beobachten. Generell gab es während der 200 ps keine bedeutenden Abweichungen der Struktur von der Konformation im festen Zustand.

Die Struktur von gebundenen FK506^[42, 44, 54] unterscheidet sich stark von der des freien Liganden^[42, 44] (Abb. 13 Mitte). Das trifft sowohl auf die Konformation in Lösung als auch auf die im festen Zustand zu. (Es ist notwendig darauf hinzuweisen, daß die Struktur von FK506 in wäßriger Lösung noch nicht experimentell bestimmt wurde. Die Unterschiede zwischen der freien und gebundenen Form des Moleküls (siehe unten) sind also nicht notwendigerweise eine Folge der Bindung und entsprechend vorsichtig zu interpretieren.) Die markanteste Veränderung zwischen den kristallinen Formen ist, daß im gebundenen FK506 eine *trans*-Amidbindung vorliegt, im freien Molekül jedoch die *cis*-Form. Diese Änderung wird durch Rotationen um die C1-C2-, C14-C15-, C15-C16- und C16-C17-Bindungen kompensiert. Bei denselben Torsionswinkeln wurden auch wesentliche Änderungen festgestellt, wenn die in Lösung vorliegenden Formen mit der gebundenen Form verglichen werden. Die Unterschiede in den Torsionswinkeln der Bindungen, die den Pyranosering flankieren (C14-C15 und die Amidbindung in der *cis*-Konformation oder C9-C10 in der *trans*-Konformation), bewirken eine Rotation dieses Teils unter den Makrocyclus in der gebundenen Struktur. So erhält der bindende Bereich eine kompaktere Gestalt und der Ligand einen hydrophoben Kern. Im Endeffekt nimmt die Energie durch ungünstige sterische Wechselwirkungen bei der Bindung um nur 3 kcal mol⁻¹ zu (Vergleich der Strukturen von freier und gebundener Form im Kristall)^[42]. Die Rotation von 150° um die C14-C15-Bindung führt zur sterischen Wechselwirkung zwischen der C13- und der C15-Methoxygruppe. In allen Formen des freien Liganden befinden sich die Gruppen ungefähr in anti-Stellung zu allen anderen Gruppen. In der Struktur von gebundenem FK506 ist die C15-Methoxygruppe auf die Außenseite des Makrocyclus rotiert und nimmt eine gauche +/gauche--Orientierung in Bezug auf die C13-Methoxygruppe ein. Die energetische Konsequenz dieser Wechselwirkung, die in Rapamycin nicht vorhanden ist, könnte teilweise die Ligandspezifität, wie sie in anderen FKBP s beobachtet wurde (siehe Abschnitt 6), verursachen.

Im Gegensatz zu FK506 sind freies und gebundenes Rapamycin sehr ähnlich^[43, 44]. Die Standardabweichung der Atomkoordinaten nach Superposition der gebundenen und der ungebundenen Konformation (RMS-Wert) beträgt nur 0.48 Å. Wie gebundenes FK506 hat Rapamycin eine *trans*-Amidbindung im festen Zustand (in organischer Lösung liegt ein 4:1-Gemisch der *trans*:*cis*-Amidrotamere vor). Außerdem wird der Pyranosering auch hier unter den Makrocyclus gefaltet, und die Cyclohexyleinheit weist vom Makrocyclus weg. Es ist interessant, daß der Bindungsbereich von gebundenem FK506 im wesentlichen die gleiche Konformation hat wie der entsprechende Bereich von Rapamycin. Der RMS-Wert für die beiden gebundenen

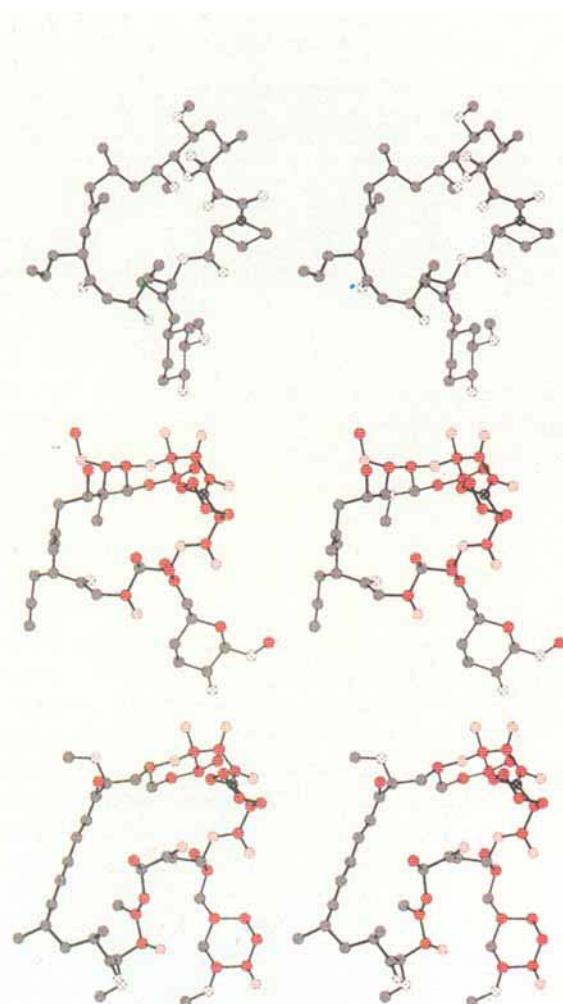


Abb. 13. Stereobilder der Strukturen von freiem FK506 (oben), gebundenem FK506 (Mitte) und gebundenem Rapamycin (unten) im Kristall. In der Mitte und unten sind Atome, die mit Schweratomen von FKBP12 in enge Nachbarschaft treten (<4 Å), rot gekennzeichnet [42–44].

Liganden (von C1 bis C13) beträgt 0.12 Å. Folglich tritt die FKBP-Bindungstasche nur mit einer Konformation der beiden Liganden in starke Wechselwirkung. Daß die FKBP-Affinität von Rapamycin doppelt so hoch ist wie die von FK506, reflektiert zum Teil seine größere Neigung, diese Konformation anzunehmen.

Obwohl sich die Konformation von FK506 durch die Bindung an FKBP signifikant zu ändern scheint, gilt Ähnliches nicht für Rapamycin, und zwar hinsichtlich beider Domänen des Moleküls. Während die Ligandbindung die Änderung der Konformation von FK506 unterstützt und so eine bessere Wechselwirkung mit CN im pentameren Komplex ermöglicht, scheint bei Rapamycin die Ligandbindung lediglich die Umhüllung des Liganden durch Proteinreste zu bewirken. Die Bindung könnte auch beim Transfer beider Moleküle weg von der Lipidmembran hin ins wäßrige Milieu des Cytoplasmas helfen. Da FK506 und Rapamycin den gleichen Bindungsort in FKBP haben, ist anzunehmen, daß die Selektivität der beiden FKBP-Ligand-Komplexe aus der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung der Liganden resultiert. Sie führt zu zwei unterschiedlichen Protein-Ligand-Oberflächen, die den Komplexen erlauben, zwei unterschiedliche Targets zu binden.

3.3. 506BD

Der synthetische FKBP-Ligand 506BD^[16] erwies sich als äußerst hilfreich für das Verständnis der strukturellen Grundlagen der biologischen Wirkung von FK506 und Rapamycin. 506BD enthält die FKBP-Bindungsdomäne von FK506 und Rapamycin; es fehlt jedoch der Effektorbereich der Liganden^[16]. Die Geometrie der bindenden Domäne wird durch einen (sowohl strukturell als auch synthetisch) einfachen *trans*-Enoatspacer beibehalten. Die Fähigkeit von 506BD, an FKBP zu binden und die biologische Wirkung von FK506 und Rapamycin zu inhibieren, und die Unfähigkeit des Liganden, Signalübertragungswege zu inhibieren, demonstrieren deutlich die bifunktionale (bindend und als Effektor) Natur von FK506 und Rapamycin. Rückblickend war der Erfolg mit 506BD als FKBP-Ligand ein glücklicher Zufall, da das Molekül auf Grundlage der Struktur von ungebundenem kristallinem FK506 entworfen wurde. Die Struktur des gebundenen Konformers sollte erst zwei Jahre später bekannt werden. Da die freie und die gebundene Struktur von FK506 sehr unterschiedlich sind, ist es überraschend, daß eine Brücke, die zur Verknüpfung zweier Punkte im freien Molekül entworfen wurde, auch in der Lage ist, dieselben Punkte im gebundenen Molekül zu verknüpfen. Der Enoatspacer in 506BD sollte C16 und C25 verbinden, also eine Distanz von 5.2 Å in freiem FK506 überbrücken^[1]. Um sowohl das *cis*- als auch ein mögliches *trans*-Amidbindungsrotamer zu simulieren, wurde ein *trans*-Enoat verwendet. Die Bereiche, die den Spacer begrenzen, sollen ebenfalls die lokalen Vorzugskonformationen erhalten (C14-C26-Region von FK506). Die Untersuchung von gebundenem FK506 macht deutlich, daß trotz der vielen oben beschriebenen unerwarteten Veränderungen C16 und C25 in dieser Konformation 4.2 Å voneinander entfernt sind. Folglich kann die *trans*-Enoatbrücke diese Punkte verknüpfen, ohne daß die Struktur des bindenden Bereiches wesentlich gestört wird.

3.4. Erkenntnisse aus der Proteinsequenz

FKBP ist nur ein Mitglied einer wachsenden Familie von FK506- und Rapamycin-bindenden Proteinen. Es wurden mindestens vier weitere Proteine, die diese beiden Liganden binden, in menschlichen T-Zellen beobachtet und teilweise charakterisiert^[55, 56]. Außerdem wurde in verschiedenen Organismen, einschließlich anderen Säugetieren, Bakterien und Hefe, eine Anzahl von Proteinen identifiziert, die eine große Homologie zu FKBP aufweisen^[57]. Auch Cyclophilin waren in einer Reihe von Zelltypen und in unterschiedlichen Organismen nachweisbar^[58]. Die Molekulmasse der bekannten FKBPs reicht von 12 kDa für die archetypische Form des Proteins (ab hier als FKBP12 bezeichnet) bis zu 59 kDa für das phosphorylierte, in T-Zellen gefundene FKBP59. Trotz der Größenunterschiede haben alle Mitglieder der FKBP-Familie, deren Sequenzen bis heute bestimmt worden sind – entweder direkt durch Edman-Abbau oder indirekt durch Klonierung und Sequenzierung ihrer komplementären DNA (cDNA) –, einen FKBP12-artigen Bereich von etwa 12 kDa. Eine Anordnung von Sequenzen einiger dieser Proteine zeigt Abbildung 12 (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Einige Merkmale sind auffallend: Erstens, obwohl die Zahl der Aminosäureaustausche ab Rest 25 bis zum C-Terminus relativ gering ist (Numerierung der Reste wie bei hFKBP12), zeigt der N-Terminus eine hohe Zahl von Austauschen unter den verschiedenen Proteinen. Interessanterweise entsprechen die Reste 1 bis 13 und 13 bis 29 in hFKBP12 den ersten zwei von vier Exons in der genomischen DNA, die das Protein codiert^[59]. Diese Exons sind von den anderen beiden Exons, die die Reste 29 bis 66 und 67 bis 107 codieren, durch ein langes Intron von 16 000 Basen getrennt. Die anderen Introns sind wesentlich kleiner und enthalten nur 109 und 3300 Basen. Diese Genstruktur läßt vermuten, daß sich die N-terminalen Regionen der FKBPs durch „Rekrutierung“ nicht zusammenhängender Exons durch das lange Intron entwickelt haben. Die Analyse des FKBP12-Genes ermöglichte so eine evolutionäre Erklärung für die hohe Variabilität im N-terminalen Bereich von Mitgliedern der FKBP-Familie^[59].

Die Untersuchung der Sequenzanordnung im Lichte der Strukturen von freiem FKBP12 und der zwei FKBP12-Ligand-Komplexe ergab weiteren Einblick in die Voraussetzungen für die Stabilität, die Ligandbindung und die Rota-masekatalyse dieser Proteine. Insgesamt dreizehn Reste sind in allen bekannten FKBPs vollständig konserviert. Sechs davon, Gly 33, Gly 69, Gly 83, Gly 28, Leu 97 und Leu 103, sind wichtig für die strukturelle Integrität der Proteine^[57b]. Die restlichen sieben, Tyr 26, Phe 36, Asp 37, Val 55, Ile 56, Tyr 82 und Phe 99, bilden die Bindungstasche oder sind wichtig für die Kontakte zu Liganden. Trp 59, welches ebenfalls für die Struktur der Bindungstasche wichtig erscheint, tritt in allen bis auf eine Sequenz auf, wo es durch Phe ersetzt ist. Der hohe Erhaltungsgrad von Resten in der FKBP-Bindungstasche läßt vermuten, daß alle Proteine der Familie die Liganden in ähnlicher Weise binden. In allen Fällen wird die Koordination von Liganden eine große Zahl von van-der-Waals-Wechselwirkungen mit aromatischen und aliphatischen Resten des Proteins plus einer Anzahl von spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen vom Liganden zum Protein involvieren. Die Sequenzerhaltung und die Annahme, daß FK506 und Rapamycin Übergangszustandsanaloge sind,

lassen vermuten, daß diese Art der Wechselwirkungen für die Rotamasekatalyse notwendig sein könnte. Die konservierten Reste Tyr 26, Phe 36 und Phe 99 sollten für die Stabilisierung einer Carbonylgruppe eines verdrehten Amids im Übergangszustand wichtig sein. Die potentiell mögliche Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen der phenolischen Hydroxygruppe von Tyr 82 und die mögliche Salzbrückenbindung des Carboxylatrestes von Asp 37 mögen ebenso wichtig sein. Weiterhin wurde vorgeschlagen, daß die Hydrophobie der rotamaseaktiven Regionen von FKBP und CyP eine wichtige Rolle im enzymatischen Mechanismus der Isomerisierung spielt^[35, 44, 60]. Dampfdruckmessungen zeigten, daß die Peptidbindungen in wäßrigen Medien hochsolvatisiert sind^[61]. Wolfenden und Radzicka^[60] postulierten, daß gebundene Wassermoleküle die Isomerisierung der Amidbindung inhibieren, da die wahrscheinlich nicht resonanzstabilisierte Struktur des Übergangszustands weniger polar ist als die Strukturen von Ausgangsstoff oder Endprodukt. Ein Enzym, welches die Desolvatation durch Präsentation einer hydrophoben Region fördert, wird die Isomerisierung erleichtern. Zur Stützung dieser Hypothese einer Katalyse durch Desolvatation^[62] seien NMR-Daten erwähnt, die zeigen, daß die Isomerisierung von *N,N*-Dimethylacetamid in Methylenchlorid wesentlich schneller ist als in Wasser^[63]. Kofron et al. diskutierten einen ähnlichen Mechanismus^[35] auf der Grundlage theoretischer Rechnungen, wonach Wechselwirkungen mit Wasser die Flexibilität von Amidbindungen reduzieren^[64]. Schließlich erwähnten Van Duyne et al.^[44] Rechnungen, die ergaben, daß der Dipol entlang der C-N-Bindung in einem verdrehten Amid geringer ist als in der planaren Spezies^[65] und daß die Stabilität der dipolaren Spezies mit der Polarität der Umgebung abnimmt^[66]. Daher postulieren sie, daß die hydrophobe bindende Region von FKBP die Isomerisierung durch Destabilisierung der stark dipolaren Amidbindung in einem Peptidsubstrat fördern sollte.

4. Strukturuntersuchungen von Cyclophilin (CyP) und seinen Komplexen mit Cyclosporin A (CsA)

4.1. Cyclophilin (CyP)

Zwar ist die Struktur des CyP-CsA-Komplexes noch unbekannt, doch bestimmten in jüngster Zeit Kallen et al. die Struktur eines CyP-Tetrapeptid-Komplexes und Ke et al. die von freiem CyP durch Röntgenstrukturanalyse^[67, 68]. Außerdem haben Weber et al. und Fesik et al. die Struktur von CsA gebunden an CyP durch isotopeneditierende NMR-Spektroskopie bestimmt^[69, 70]. Die Ergebnisse all dieser Studien bieten viele Anhaltspunkte, die Struktur und die biologische Funktion des CyP-CsA-Komplexes zu verstehen. Wie man in Abbildung 7 erkennt, hat die Struktur von CyP keine Ähnlichkeit mit der von FKBP12. CyP besteht aus einer achtsträngigen antiparallelen β -Faltstruktur („ β -barrel“), die an beiden Enden durch eine α -Helix begrenzt wird. Die Topologie der β -Stränge ist +1, -3, -1, -2, +1, -2, -3, welche eine ungewöhnliche Schleifenkreuzung verursacht, die an diejenige in FKBP12 erinnert. Die achtsträngige β -Faltstruktur von CyP ist mit manchen Strukturen von β -Proteinen verwandt^[71], darunter denen der Proteine, die Bilin^[72a] und

Retinol^[72b] binden, sowie der von β -Lactoglobulin^[72c] und Insecticyanin^[72d]. Diese Proteine binden, wie CyP auch, kleine hydrophobe Liganden. Die Ligandenbindungstasche der β -Proteine befindet sich in einer Spalte zwischen den beiden β -Faltblättern, die das Faß formen^[71, 72]. Wie intermolekulare NOEs und Veränderungen der chemischen Verschiebungen bei Koordination sowie die Gesamtgeometrie des Proteins zeigen, befindet sich in CyP die CsA-Bindungstasche nicht im Inneren des zentralen β -Fasses^[67, 68]. Vielmehr ist die Bindungstasche eine Spalte an der Oberfläche des Proteins, die von einem Blatt des Fasses und der Schleife von Lys 118 bis His 126 gebildet wird. Frühere NMR-Untersuchungen ergaben, daß gebundenes CsA die Seitenketten des einzigen Tryptophanrestes von CyP, Trp 121, und einen nicht identifizierten Phenylalaninrest kontaktiert^[73]. Die CyP-Struktur bestätigt diese Daten, da sich Trp 121 an einem Ende der Bindungstasche befindet und Phe 60 und Phe 113 an deren Boden. Die Struktur ermöglicht auch eine Erklärung der Inhibition der CyP-Rotamaseaktivität und der CsA-Bindung durch Modifikation der Cysteinreste mit *p*-Hydroxymercuribenzoësäure^[12b], da sich Cys 115 und Cys 62 beide in der Bindungstasche befinden. Die Funktion der anderen Reste in der Bindungstasche, wie His 54, Arg 55, Ile 57, Met 61, Asn 102, Gln 111, Leu 122 und His 126, ist noch unklar. Der generell hohe Erhaltungsgrad dieser Reste in den verschiedenen Cyclophilinen läßt jedoch vermuten, daß diese Reste wichtige Kontakte mit Liganden übernehmen und ebenfalls für die Rotamasekatalyse wichtig sind. Deshalb ist es verblüffend, daß es, zumindest auf den ersten Blick, keine Ähnlichkeiten zwischen den aktiven Zentren von FKBP12 und CyP gibt.

4.2. Cyclosporin A (CsA)

Da keine Struktur eines CyP-CsA-Komplexes vollständig bekannt ist, ist es schwierig, Unterschiede zwischen gebundenem und freiem CyP festzustellen, die für die Wechselwirkung mit CN wichtig sein könnten. Die vorhandenen Strukturen von freiem^[74] und gebundenem CsA^[69, 70] (Abb. 14) erlauben jedoch eine solche Analyse für den Ligandteil des Komplexes. Die Konformation von gebundenem CsA ist auffallend verschieden von der Konformation des freien Liganden im kristallinen Zustand und in organischen Lösungsmitteln. (Die Strukturen von CsA im Kristall und in organischen Medien, z.B. Methylenchlorid, sind sich sehr ähnlich und werden daher gemeinsam als Konformation des „freien“ Liganden bezeichnet.) Die Unlöslichkeit von CsA in wäßrigen Medien verhinderte eine detaillierte Strukturbestimmung in mehr biologischen Umgebungen (siehe jedoch Quesniaux et al.^[75]). Wie bei den FKBP-Liganden, so sind auch hier Vergleiche zwischen freiem und CyP-gebundenem Liganden vorsichtig zu interpretieren. Ungebundenes CsA kann in zwei überlappende Bereiche unterteilt werden. Der erste besteht aus den Resten 11-3 und 4-7, die zwei Stränge eines antiparallelen β -Faltblattes bilden, die durch einen β II'-Turn an den Resten 3 und 4 verbunden sind. Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren die Struktur zwischen Abu 2-NH und Val 5-CO, Val 5-NH und Abu 2-CO sowie Ala 7-NH und MeVal 11-CO. Es ist bemerkenswert, daß alle *N*-Methylgruppen in dieser Region (11, 2, 4, 6) vom Makrocyclus weg weisen. Der zweite Bereich besteht aus den Re-

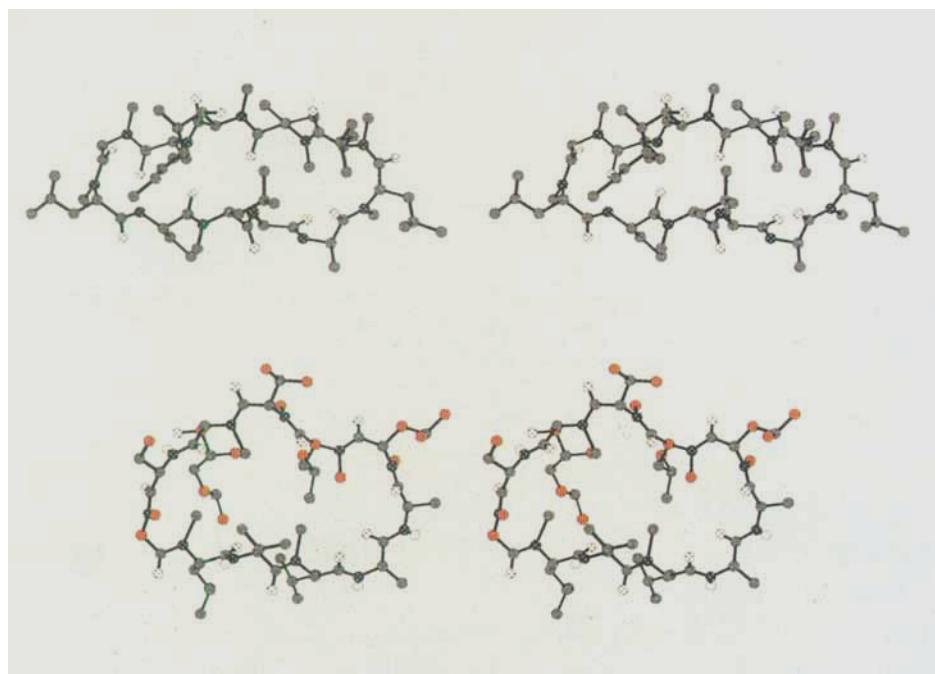


Abb. 14. Stereobilder von freiem (oben) und gebundenem (unten) CsA. In der Struktur von gebundenem CsA sind Atome, die Protonen tragen, welche in einem NOESY-Spektrum (50 ms) des CyP-CsA-Komplexes NOE-Kreuzsignale zu CyP zeigen, rot markiert [70].

sten 7–11, die eine irreguläre Schleife bilden. Diese wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung von D-Ala 8-NH zu MeLeu 6-CO und durch van-der-Waals-Wechselwirkungen, einschließlich mehrerer mit der N-Methylgruppe von MeVal 11, welche ins Innere des Makrocyclus zeigt, stabilisiert. Alle Amidbindungen in der Struktur haben *trans*-Konformation, lediglich die zwischen MeLeu 9 und MeLeu 10 hat *cis*-Konformation.

Im Gegensatz zur Struktur der freien Verbindung hat gebundenes CsA keine Elemente einer regulären Sekundärstruktur. Weiterhin hat es keine intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen. Von den sieben N-Methylgruppen sind nur zwei, die von MeVal 11 und MeLeu 9, nach außen gerichtet. Die restlichen sind nach innen gerichtet und an einer Reihe von intramolekularen van-der-Waals-Wechselwirkungen beteiligt. Dementsprechend sind alle vier Amid-NH-Gruppen und zehn von elf Amid-CO-Gruppen zumindest teilweise ungeschützt. Auf Basis der H/D-Austauschgeschwindigkeiten wurde vorausgesagt, daß eine Amid-NH-Gruppe, die von Abu 2, eine intermolekulare Wasserstoffbrücke zum CyP bildet. Auffallend ist, daß alle Amidbindungen der gebundenen Konformation in *trans*-Form vorliegen, was auf eine hohe Energiebarriere für die Bindung hinweist.

Neben der Strukturbestimmung von gebundenem CsA identifizierten Weber et al. und Fesik et al. eine Reihe intermolekularer NOEs zwischen Ligand und Rezeptor^[69, 70]. Insbesondere konnten viele NOEs aromatischer Reste von CyP, einschließlich des einzigen Tryptophans, Trp 121, beobachtet werden. Diese NOEs zeigen, wie vorhergesagt^[76], daß CsA in einer hydrophoben Bindungstasche des Proteins gebunden wird. Das Muster und die Lage der Protein-Ligand-NOEs ermöglichte beiden Arbeitsgruppen, die Bereiche von CsA zu identifizieren, die mit CyP im Komplex in Kontakt sind. Die Aminosäurereste 9–3 zeigen alle eine Reihe intermolekularer Wechselwirkungen (Abb. 14 unten). Diese Reste bilden folglich den bindenden Bereich von CsA.

Dagegen liefern die Reste 4–8 nur intramolekulare NOEs, d.h. deren Wechselwirkung mit dem Protein ist nicht groß. Das legt nahe, daß diese Reste den Bereich von CsA bilden, der bei Bindung an CyP mit Calcineurin (CN) in Berührung kommt.

Ein wichtiger Aspekt der Hypothese vom aktiven Komplex ist es, daß die einzige notwendige Bedingung für die Signalinhibierung durch einen Wirkstoff die Bindung des Immunophilin-Wirkstoff-Komplexes an seine biologische Zielstruktur ist (z.B. CN im Falle von FK506 und CsA). Eine enge Bindung des Wirkstoffs an das Immunophilin ist an und für sich nicht notwendig und, wie für 506BD demonstriert, als Ursache der Inhibierung auch nicht ausreichend. Mit dieser Erkenntnis kann man auf der Grundlage der Identifizierung der Bindungs- und der möglichen Effektordomäne von CsA die biochemischen und biologischen Daten einer großen Zahl von CsA-Analoga interpretieren. In den meisten Fällen, nicht in allen, gibt es eine direkte Beziehung zwischen CyP-Bindung und Inhibitoraktivität, gemessen in T-Zell-Aktivierungsassays^[77, 78]. Es ist nicht überraschend, daß die meisten der Analoga, die nicht an CyP binden, in den Bereichen des Wirkstoffs modifiziert sind, die mit CyP in Wechselwirkung treten. So weisen die folgenden Analoga > 80 % geringere CyP-Bindungsfähigkeit und Aktivität in T-Zell-Aktivierungsassays (verglichen mit CsA) auf: MeAla 9, MeAla 10, MeAla 11, MeLeu 11, α -Amino- γ -fluorbutyrat 2^[77]. Ähnliche Effekte findet man für eine Reihe von Analoga, in denen die MeBmt1-Seitenkette modifiziert ist. Es gibt aber einige CsA-Analoga, die keine Beziehung zwischen CyP-Bindung und Signalinhibierung zeigen. Diese Analoga können in zwei Kategorien eingeteilt werden: 1) solche, die CyP nicht fest binden, aber Inhibitoren sind, und 2) solche, die CyP zwar binden, aber keine Inhibitoren sind. Die Existenz solcher Verbindungen führte zur Annahme, daß CyP nicht der relevante biologische Rezeptor für CsA ist, oder genauer, nicht der für die biologische Wirkung von CsA verantwortliche Rezeptor^[78]. Die Hypothese vom

aktiven Komplex ermöglicht eine interessante alternative Interpretation dieser Daten. In der ersten Kategorie gibt es bisher nur eine Verbindung, Dimethyl-Bmt-CsA (Abb. 15).

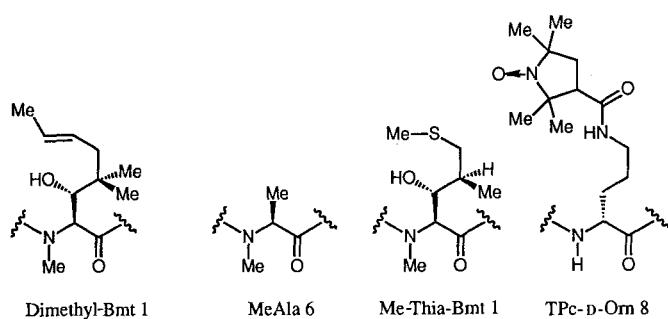


Abb. 15. Modifizierte Seitenketten von CsA-Analoga, deren immunsuppressive Aktivität nicht mit der Affinität zu CyP korreliert. Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen in CsA.

Diese bindet an CyP nur ungefähr ein Hundertstel so fest wie CsA, behält aber 35 % der Inhibierungsaktivität von CsA in T-Zell-Aktivierungsassays. Obwohl Dimethyl-Bmt-CsA selbst an CyP nur schwach bindet, ist es möglich, daß die Affinität bei der Bindung des Ligand-Rezeptor-Komplexes an CN verstärkt werden kann. Das heißt, die zusätzlichen Protein-Protein-Wechselwirkungen im ternären Komplex könnten ausreichen, die durch die Einführung einer Methylgruppe in CsA errichtete Energiebarriere zu überwinden. Untersuchungen des CyP-Dimethyl-Bmt-CsA-Komplexes unterstützen diese Möglichkeit^[79]. Die zweite Kategorie der CsA-Analoga bilden Verbindungen mit Modifikationen an drei Resten: MeBmt 1, MeLeu 6 und d-Ala 8. Diese Verbindungen enthalten unter anderem MeAla 6, Me-Thia-Bmt 1 und TPc-d-Orn 8 (Abb. 15). Die Eigenschaften dieser Verbindungen erinnern an die von 506BD, welches FKBP bindet, aber die Signalübertragung in T-Zellen oder Mastzellen nicht stört. In Analogie zu 506BD haben diese Moleküle die notwendigen Elemente zur Wechselwirkung mit CyP, jedoch verfügen sie nicht über die geeignete Struktur, um ihre Ligand-Rezeptor-Komplexe an CN zu binden. Diese Erklärung stimmt mit der Lokalisierung der Reste 6 und 8 in der Effektordomäne von CsA überein. Darüber hinaus sind die MeBmt-1-Derivate der zweiten Kategorie alle in der MeBmt-Seitenkette modifiziert, die sich in der Nähe der Seitenkette von MeLeu 6 an einer Außenfläche des CsA-Makrocyclus befindet. Daher kann MeBmt 1 sowohl für den Kontakt zu CyP als auch zu CN im pentameren Komplex wichtig sein. Zur Stützung dieser Hypothesen hinsichtlich der Wirkungsweisen der verschiedenen synthetischen Analoga zeigten vorläufige Ergebnisse in unserem Laboratorium bei einer Reihe von FK506- und CsA-Analoga, daß die berichtete immunsuppressive Aktivität exakt mit der Fähigkeit der Komplexe dieser Moleküle korreliert, zusammen mit ihren jeweiligen Immunophilinrezeptoren die Phosphataseaktivität von CN zu inhibieren^[79].

Die Konformation der CsA-Effektordomäne gibt auch eine Vorstellung von der Art der Wechselwirkung des CsA-Teils des CyP-CsA-Komplexes mit CN. Das Rückgrat von CsA, beginnend an der Carbonylgruppe an Sar 3 bis zum Amid an Ala 7, mit Ausnahme von MeLeu 4, erinnert an einen Strang eines β -Faltblattes. Daher mögen die Wechsel-

wirkungen zwischen gebundenem CsA und CN denjenigen zwischen β -Faltblattsträngen ähneln. Die Carbonylgruppen der Reste 3 und 5 und die NH-Gruppe von Rest 7 liegen alle in der Ebene des CsA-Makrocyclus und sind nach außen gerichtet. Die Amidebene mit Val 5-NH und MeLeu 4-CO ist zur Ebene des Makrocyclus abgewinkelt, trotzdem ist Val 5-NH immer noch für Wasserstoffbrückenbindungen mit CN verfügbar. Die N-Methylgruppen der Reste 4 und 6, die die reguläre Anordnung der Wasserstoffbrückenbindungen sterisch behindern könnten, sind in das Innere des Makrocyclus gerichtet und stören daher nicht. Schließlich zeigen die Seitenketten der Reste 4, 5 und 6 alternierend über und unter die Ebene des CsA-Makrocyclus, ähnlich wie es von β -Faltblattstrukturen bekannt ist. Das ermöglicht, daß die Seitenketten von MeLeu 4 und MeLeu 6 stabilisierende Kontakte mit den Seitenketten von MeLeu 10 und MeBmt 1 auf der Oberfläche des Makrocyclus aufnehmen. Die Gesamtheit dieser Eigenschaften der Seitenketten 4, 5 und 6 und der Amidgruppen der Reste 3 und 7 im Rückgrat ergibt eine regulär geformte und zugängliche Oberfläche, die in der Lage ist, eine Anzahl hydrophober Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit CN einzugehen. Die Struktur dieser Oberfläche läßt vermuten, daß der CsA-Anteil des CyP-CsA-Komplexes mit CN in der Art einer β -Faltblattstruktur in Wechselwirkung tritt.

5. Strukturen von pentameren Immunophilin-Wirkstoff-CNA-CNB-Calmodulin-Komplexen

5.1. Kontakte zwischen den Immunophilin-Ligand-Komplexen und Calcineurin (CN)

Es ist interessant, darüber nachzudenken, welche Regionen der Immunophilin-Ligand-Komplexe für den Kontakt zu deren biologischen Zielstrukturen wichtig sind und welche Regionen den Komplexen Spezifität verleihen, so daß sie mit verschiedenen Partnern in Wechselwirkung treten können. Ist es möglich, daß nur die Ligandteile der Komplexe den Partner kontaktieren, und daß die einzige Funktion des Proteins die genaue Positionierung des Liganden und dessen Ausrichtung in die für die Bindung notwendige Konformation ist? Oder kann es sein, daß nur das Protein für die Bindung wichtig ist und daß sich die Funktion der Liganden darauf beschränkt, bestimmte Proteinkonformationen zu induzieren oder zu stabilisieren, die dann in der Lage sind, mit verschiedenen biologischen Partnern in Wechselwirkung zu treten? Oder ist es möglich, daß eine gemeinsame Moleküloberfläche, geformt aus Ligand *und* Rezeptor, zur Bindung benötigt wird und daß sich Liganden und Rezeptoren in ihrer Form gegenseitig beeinflussen? Eine Reihe von Hinweisen läßt vermuten, daß zumindest für die FKBP12-Ligand-Komplexe die letztgenannte Möglichkeit die wahrscheinlichste ist. Die Strukturen von Rapamycin in freier und gebundener Form sind im wesentlichen gleich. Daher braucht Rapamycin nicht mit FKBP12 in Wechselwirkung zu treten, um eine biologisch aktive Konformation einzunehmen. Dennoch ist es allein inaktiv^[22, 23]. Beim Protein zeigt der Vergleich der Struktur von freiem FKBP12 mit den Strukturen des

FK506- und des Rapamycin-Komplexes, daß die Regionen des Proteins, die den Ligand nicht kontaktieren, bei der Komplexbildung nicht wesentlich verändert werden. Somit üben die Liganden keine großen allosterischen Effekte auf das Protein aus, die eine Bindung an die Zielstruktur erleichtern würden. Das ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, daß FKBP12 relativ klein ist. Ein Vergleich der beiden Komplexe zeigt, daß sogar in den Regionen der Struktur, die die Liganden umgeben, die beiden Proteine einander sehr ähnlich sind. (Die Unterschiede in der Region Gly 28–Gly 33 sind hauptsächlich auf Kristallpackungseffekte zurückzuführen und daher wahrscheinlich unwichtig^[44].) Angesichts der unterschiedlichen biologischen Effekte der Komplexe scheint es unwahrscheinlich, daß nur das Protein in Wechselwirkung mit dem biologischen Zielmolekül tritt. Nach dieser Analyse gibt es einen ternären Komplex, in dem sowohl das Immunophilin als auch der Ligand Kontakt mit dem Partner haben.

5.2. Struktur der FKBP-FK506- und CyP-CsA-Bindungsstelle an Calcineurin

Phosphataseinhibition und Bindungsdaten^[26] der Immunophilin-Ligand-Komplexe geben Hinweise auf die Strukturen der pentameren Komplexe. Die Fähigkeit von CyP-CsA, Calcineurin (CN) und Calmodulin von einem immobilisierten FKBP-FK506-Reagens zu verdrängen, zeigt, daß die beiden Komplexe entweder einen gemeinsamen Ligandbindungsbereich oder zwei zueinander in Beziehung stehende Ligandbindungsbereiche an CN haben^[26]. Aus den verfügbaren Strukturdaten ist nicht ersichtlich, wie die beiden Komplexe mit demselben Ligandbindungsbereich von CN in Wechselwirkung treten könnten. Die Beantwortung dieser Frage erfordert zusätzliche Informationen über die Regionen der beiden Proteine (FKBP12 und CyP), die an der Erkennung von CN beteiligt sind. Das Unvermögen von Calmodulin oder der CNB-Untereinheit, die Immunophilin-Wirkstoff-Komplexe zu binden, läßt vermuten, daß sich der (die)Ligandbindungsbereich(e) wahrscheinlich in der CNA-Untereinheit befinden^[79]. Die Verstärkung der Bindung von FKBP-FK506 und CyP-CsA an CN in Gegenwart von Calmodulin weist außerdem darauf hin, daß die Calmodulin- und die Immunophilin-Ligand-Bindungsstellen nicht unabhängig voneinander sind^[79]. Die Wechselwirkung zwischen diesen Bindungsstellen mag indirekt übertragen werden, durch Induzierung von Veränderungen in CN, oder direkt durch stabilisierende Wechselwirkungen zwischen Calmodulin und dem Immunophilin-Ligand-Komplex, wenn beide an CNA gebunden sind. Einen tieferen Einblick in die Immunophilin-Ligand-Bindungsstelle kann man aus der Substratabhängigkeit der CN-Inhibition gewinnen. Die Dephosphorylierung eines aus 20 Resten bestehenden Phosphopeptides durch CN wird sowohl von FKBP-FK506 als auch von CyP-CsA stark inhibiert ($K_i = \text{ca. } 30 \text{ nm}$, mit Rinder-CN und menschlichen Immunophilinen^[79]). Die Dephosphorylierung von *p*-Nitrophenylphosphat wird jedoch bei ähnlichen Konzentrationen der beiden Immunophilin-Wirkstoff-Komplexe um ungefähr den Faktor 3 beschleunigt^[26]. Diese Befunde zeigen, daß die Bindungsstelle für die Komplexe zwar nicht das aktive Zentrum der Enzymaktivität ist, daß sich wahrscheinlich aber Bindungsstelle und aktives Zentrum in

unmittelbarer Nähe befinden. Eine ähnliche Beziehung zwischen Ligandbindungsstelle und aktivem Zentrum findet man in einem Komplex aus Peptidinhibitor und *cyclo*-AMP-abhängiger Protein-Kinase, von dem kürzlich eine Kristallstrukturanalyse gelang^[88]. Abbildung 16 zeigt ein Modell der Immunophilin-Ligand-Bindungsstelle. Unsere gegen-

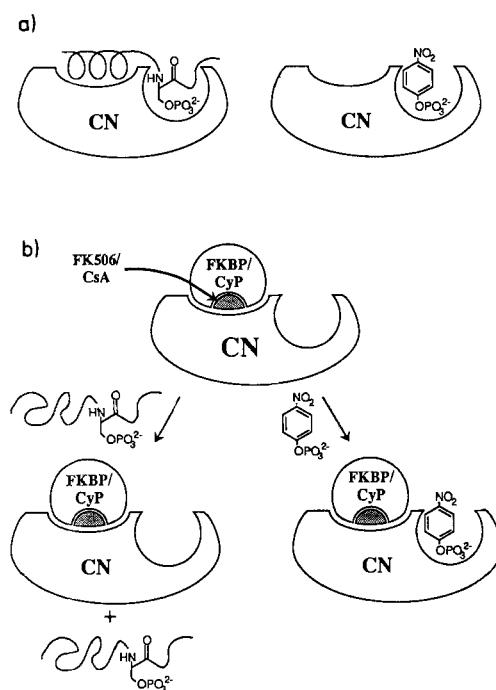


Abb. 16. Modell für den Ort der Bindung des Immunophilin-Ligand-Komplexes an CN. a) Zwei Substrate, ein Phosphopeptid und ein *p*-Nitrophenylphosphat sind an CN gebunden. b) Die Immunophilin-Ligand-Komplexe FKBP12-FK506 und CyP-CsA beeinflussen die Enzymaktivität von CN gegenüber verschiedenen Substraten (Phosphopeptid und *p*-Nitrophenylphosphat) unterschiedlich.

wärtige Vorstellung von der Bindung eines pentameren Komplexes umfaßt eine durch Calmodulin erleichterte Koordination von FKBP-FK506 oder CyP-CsA an eine oder zwei miteinander wechselwirkende hydrophobe Ligand-bindungsstellen, die an das phosphataseaktive Zentrum in der A-Untereinheit von CN angrenzen.

6. Zusätzliche Funktionen der Immunophiline

Viele Befunde deuten darauf hin, daß die Immunophiline neben der Vermittlung der Signalinhibition von FK506, Rapamycin und CsA noch andere Funktionen in der Zelle haben. Zum Beispiel ist FKBP13 ein membrangebundenes Protein, und in Mastzellen ist es das am häufigsten vorkommende^[7, 55, 56]. Obwohl FKBP12 und FKBP13 zu 43 % über die gleiche Aminosäuresequenz verfügen und alle Reste in der Ligandenbindungsstelle gleich sind, unterscheiden sich die beiden Proteine deutlich in den Regionen, die die Bindungsstelle direkt umgeben. So sind die Reste in der hochgeladenen basischen Schleife von FKBP12 (Arg 40 bis Lys 44) durch völlig andere, ungeladene Reste in FKBP13 (RDRNK → LPQHQ, im Ein-Buchstaben-Aminosäure-

code) ersetzt. Falls diese Schleife für die Bindung des FKBP12-FK506-Komplexes an CN wichtig ist, dürften diese Unterschiede auf eine veränderte biologische Funktion von FKBP13 hinweisen. Tatsächlich bindet der FKBP13-FK506-Komplex nicht an CN, wenngleich die strukturelle Ursache dafür noch nicht feststeht^[79]. Anhaltspunkte für die biologische Funktion von FKBP13 können außerdem aus der Proteinsequenz gewonnen werden. Im Unterschied zu allen anderen bekannten FKBPs wird FKBP13 mit einem Signalpeptid am N-Terminus synthetisiert, welches dem Protein den Weg in das endoplasmatische Reticulum (ER) weist^[55, 80]. Im ER wird das Peptid abgespalten, wobei die lösliche Form des Moleküls entsteht. Am äußersten C-Terminus enthält FKBP13 eine mögliche ER-Retentionssequenz^[81], Arg-Thr-Glu-Leu-CO₂⁻ (Abb.12). Diese hält das Protein im ER zurück, so daß es nicht ausgeschieden wird oder in andere Teile der Zelle wandert. Diese beiden Signalpeptide zeigen, daß FKBP13 ein ER-Protein ist, und man kann annehmen, daß es eine Funktion in der Regulierung des Proteinhaushaltes in diesem Organell hat. So hat FKBP13 wahrscheinlich eine ähnliche Funktion wie die Hitzeschockproteine^[82] und die Proteindisulfid-Isomerase^[82, 83], die ungefaltete oder falsch gefaltete Polypeptidketten im ER stabilisieren, und so deren Aggregation und Ausfällung verhindern. Möglicherweise stabilisiert FKBP13 ebenfalls ungefaltete Peptide durch Wechselwirkungen mit seiner hydrophoben Tasche. Es könnte auch als Proteinfaltungsenzym („Foldase“) durch Förderung der *cis-trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Amidbindungen wirken. Dieser Vorgang wurde bei der in-vitro-Faltung einer Reihe von Proteinen als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt identifiziert^[84].

Ahnliche Funktionen wurden für zwei Mitglieder der Cyclophilinfamilie, CyP-B^[58, 58g] und das Proteinprodukt des ninaA-Gens^[58d, 85], postuliert. Diese beiden Proteine befinden sich im ER, obwohl CyP-B ein lösliches Protein ist, während das ninaA-Protein über eine durch die Membran reichende C-terminale Domäne an die Membran gebunden ist. Das ninaA-Protein, welches sich in den Photorezeptorzellen der Augen von *Drosophila melanogaster* befindet, wird für die richtige Funktion des Sehpigmentes Rhodopsin benötigt. Drosophila-Photorezeptorzellen, die ein mutiertes ninaA-Gen enthalten, haben einen stark reduzierten Gehalt an Rhodopsin, wodurch die Sehfunktion beeinträchtigt wird (Rhodopsin kann das ER nicht verlassen^[86]). Wenn das mutierte Gen durch den Wildtyp ersetzt wird, werden die Rhodopsinfunktion sowie die normale Sehfunktion wiederhergestellt. Die Wirkungen des ninaA-Proteins sind substratspezifisch: von den homologen Rhodopsinen Rh1, Rh2 (70% Übereinstimmung der Aminosäuren mit Rh1) und Rh3 (35% Übereinstimmung der Aminosäuren mit Rh1) werden nur Rh1 und Rh2 von den ninaA-Mutationen beeinflußt. Diese Ergebnisse zeigen, daß das ninaA-Cyclophilin für die richtige Übertragung des Rhodopsins vom ER zum Membranplasma des Auges notwendig ist^[58d, 85, 86].

Ein weiteres interessantes Mitglied der FKBP-Familie, FKBP25^[57b], wurde mit Hilfe einer synthetischen, auf Rapamycin basierenden Affinitätsmatrix^[55] entdeckt. Dieses Protein besteht aus zwei klar voneinander zu unterscheidenden Domänen. Die aus 114 Resten bestehende C-terminale Region ist zu FKBP12 homolog (42% Sequenzidentität). Die N-terminale Region aus 101 Resten zeigt jedoch keiner-

lei besondere Homologie zu irgendeinem bekannten Protein. Im Gegensatz zu FKBP12 und FKBP13, die FK506 und Rapamycin mit ungefähr gleicher Affinität binden, hat FKBP25 eine etwa 200fach höhere Selektivität für Rapamycin als für FK506 (K_i (Rapamycin) = 0.9 nM; K_i (FK506) = 160 nM). FKBP25 hat ferner eine mögliche Zellkernlokalisierungssequenz^[87], bestehend aus einem Lys₄-Tetrapeptid und einem von zwei Lys₂-Dipeptiden. Die Lokalisierung von FKBP25 im Kern läßt darauf schließen, daß dieses Protein eine andere Funktion hat als FKBP12 und FKBP13. Die Rapamycinselektivität und das Vorhandensein einer N-terminalen Domäne stützen diese Annahme. Die Aufklärung der Funktion von FKBP25 bedarf jedoch noch einer Reihe von Analysen. Dazu gehören die Bestätigung der Lokalisierung im Zellkern, die Bestimmung von Funktion und Struktur der N-terminalen Domäne und die Abschätzung der Fähigkeit zur Bildung inhibierender Komplexe mit FK506 und Rapamycin.

Die Gesamtheit der Befunde über Immunophilin macht deutlich, daß sie vielfältige Funktionen wahrnehmen. Sie wurden in praktisch allen bis heute untersuchten Organismen gefunden, und zwar gewebespezifisch. Sie sind in den verschiedensten Teilen der Zelle, vom Cytoplasma bis zum Kern, lokalisiert. Sie existieren in löslichen und in membrangebundenen Formen. Schließlich zeigen fast alle bis heute untersuchten Proteine Rotamaseaktivität, wenngleich die Substratspezifität von Protein zu Protein schwankt. Diese Befunde geben zwar Hinweise auf die genauen biologischen Funktionen dieser Familie von Proteinen, sie machen aber auch deutlich, daß noch viele interessante Aspekte der Immunophilinfunktionen unentdeckt sind.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Mit einer Familie von Naturstoffen wurde also eine neue Familie von Rezeptorproteinen, die Immunophilin, gefunden. Deren Studium führte zu der Erkenntnis, daß sie als Komplexe mit ihren jeweiligen immunsuppressiven Liganden wirksam sind. Daraus resultieren die Verwendung der Immunophilin-Ligand-Komplexe als Sonden zur Untersuchung zellulärer Signalübertragungswege, wobei als Zielverbindung dieser Komplexe Calcineurin identifiziert wurde. Dessen Substrate zu bestimmen, ist der nächste Schritt. Auf diese Weise wird, angefangen vom inhibitorisch wirksamen Naturstoff, ein Signalübertragungsweg entschlüsselt, und zwar Molekül für Molekül durch die Black Box Cytoplasma.

Für Naturstoffe, die von einem Organismus gebildet werden, ist es nicht ungewöhnlich, an Proteine in einem anderen Organismus zu binden. Beispiele dafür sind viele therapeutisch nützliche Verbindungen wie Opiate und antimitotisch wirksame Substanzen. Außerdem gibt es Beispiele für Liganden, die die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen steigern. So tritt zum Beispiel das retinolbindende Protein (RBP) nur mit dem Rezeptor Präalbumin in starke Wechselwirkung, wenn es an Retinol gebunden ist^[89]. Die Einzigartigkeit der Immunophilin-Story besteht darin, daß alle drei Liganden – FK506, CsA und Rapamycin – beide Eigenschaften aufweisen. Nicht nur, daß sie in anderen Organismen als in denjenigen, in denen sie produziert wurden, an Proteine binden, sie verstärken in gebundenem Zustand

auch noch die Wechselwirkungen zwischen diesen und anderen Proteinen. Somit haben sich alle drei bekannten natürlichen Immunophilinliganden mit zwei getrennten, aber miteinander in Beziehung stehenden Funktionen entwickelt. Es fällt schwer zu glauben, daß diese duale Funktion zufällig entstanden sein soll, besonders wenn man die in der Einleitung dieses Artikels beschriebenen komplexen Beziehungen zwischen den drei Liganden bedenkt.

Diese Verlegenheit führt zu einer Reihe grundlegender, unbeantworteter Fragen zur Funktion dieser faszinierenden Verbindungen und ihrer biologischen Rezeptoren. Zunächst: Warum existieren die Immunsuppressiva FK506, CsA und Rapamycin? Was nützt es Pilzen, Verbindungen mit einem solch komplizierten und in Wechselbeziehung stehenden Spektrum von Eigenschaften zu synthetisieren? Gleichfalls: Warum existieren Immunophiline? Sicher sind sie nicht im Verlauf der Evolution entstanden, um Moleküle, die nur in Mikroorganismen vorkommen, zu binden. Wenn sie zu dem Zweck vorhanden sind, die Signalübertragung in Zellen zu regulieren, wie werden sie dann aktiviert? Gibt es endogene Verbindungen, deren Wirkungen durch die Immunsuppressiva nachgeahmt werden? Wenn dem so ist, können wir dann diese Verbindungen identifizieren und die Strukturen der gebundenen Moleküle zum Design besserer immunsuppressiver Agentien nutzen? Bei detaillierterer Betrachtung ergeben sich immer neue Fragen: Worin besteht die physiologische Funktion von Calcineurin (CN), und was sind seine natürlichen Substrate? Außerdem, wie nah sind wir daran, alle Moleküle in der Black Box der Signalübertragung von den Rezeptoren der Zelloberfläche zum Zellkern zu kennen? Was ist die Zielstruktur des später wirksamen FKBP-Rapamycin-Komplexes? Steht dieser Komplex in Beziehung zu CN? Schließlich, was ist die strukturelle Basis für die Bildung der ternären Ligand-Immunophilin-Target-Komplexe? Können wir aus den Strukturen dieser Komplexe grundlegende Erkenntnisse über die Mechanismen der molekularen Erkennung gewinnen? Die Beantwortung dieser Fragen hängt, wie auch die Studien, die uns zu diesen Fragen geführt haben, von einer Vielzahl experimenteller Methoden und Strategien ab. Es bleibt zu hoffen, daß es uns durch Anwendung der einander ergänzenden Methoden der Chemie, Biologie und Strukturanalyse gelingt, in Zukunft noch wesentlich spannendere Fragen aufzuwerfen.

Wir danken unseren vielen Kollegen und Freunden, die an der Strukturaufklärung der Immunophiline beteiligt waren. Im besonderen brachte uns die kontinuierliche Zusammenarbeit mit Greg Van Duyne und Jon Clardy von der Cornell University eine Fülle von Einblicken in die molekularen Grundlagen der Immunophilinfunktion. Unser Erfolg bei der Bestimmung der Struktur von freiem FKBP12 in Lösung wäre ohne die Geduld, die Anleitung und die Mühen von Stephen Michnick sowie die harte Arbeit und kritische Analyse von Tom Wandless und Professor Martin Karplus vom Harvard Chemistry Department undenkbar gewesen. Unser Dank gilt ferner Mark Albers und Tom Wandless für die kritische Durchsicht des Manuskriptes, Robert Standaert für die Überlassung von Abbildung 12, Dr. Thomas Wehlage für Hilfe bei der Korrektur des deutschen Manuskripts und Dr. Hengming Ke von der University of North Carolina für die Überlassung der Koordinaten von CyP (verwendet für Abb. 7) vor ihrer Publikation. Schließlich schulden wir anderen Mitgliedern der Schreiber-Gruppe großen Dank, wie M. A., Jun Liu, Pat Martin, R. S., und T. W., deren Mühe und Begeisterung das Immunophilin-Pro-

pekt hier bei uns aufregend und erfolgreich werden ließen. M. K. R. dankt der American Chemical Society, Division of Organic Chemistry, und Merck, Sharp & Dohme für finanzielle Unterstützung in Form eines Graduiertenstipendiums. Die Immunophilin-Forschung im Laboratorium von S. L. S. wird von den National Institutes of General Medical Sciences (GM-38627 und GM-40660) gefördert.

Eingegangen am 25. Oktober 1991 [A 859]
Übersetzt von Dipl.-Chem. Doris Böhme, Böhlitz-Ehrenberg

- [1] H. Tanaka, A. Kuroda, H. Marusawa, H. Hatanaka, T. Kino, T. Hoto, M. Hashimoto, T. Taga, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5031–5033.
- [2] A. W. Thomson, *Immunol. Today* **1989**, *10*, 6–9.
- [3] a) A. Rüegger, M. Kuhn, H. Licht, H. R. Loosli, R. Huguenin, C. Quierez, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1075; b) T. J. Petcher, H. P. Weber, A. Rüegger, *ibid.* **1976**, *59*, 1480; c) R. M. Wenger, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1986**, *50*, 123–168; *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 88–96; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 77–85.
- [4] a) J. E. Kay, C. R. Benzie, M. R. Goodier, C. J. Wick, S. E. A. Doe, *Immunology* **1989**, *67*, 473–477; b) J. E. Kay, S. E. A. Doe, C. R. Benzie, *Cell. Immunol.* **1989**, *124*, 175–181; c) P. Walliser, C. R. Benzie, J. E. Kay, *Immunology* **1989**, *68*, 434–435.
- [5] J. E. Kay, A. L. Moore, S. E. A. Doe, C. R. Benzie, R. Schönbrunner, F. X. Schmid, A. P. Halestrap, *Transplantation Proc.* **1990**, *22*, 96–99.
- [6] M. J. Tocci, K. A. C. Matkovich, P. Kwok, F. Dumont, S. Lin, S. Degudibus, J. J. Siekierka, J. Chin, N. I. Hutchinson, *J. Immunol.* **1989**, *143*, 718–726.
- [7] T. Hultsch, M. W. Albers, S. L. Schreiber, R. J. Hohman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6229–6233.
- [8] S. L. Schreiber, *Science* **1991**, *251*, 283–287.
- [9] Im Mittelpunkt dieses Artikels stehen primär strukturelle Aspekte; zur Diskussion biologischer Aspekte der Immunophilin-Forschung siehe: S. L. Schreiber, J. Liu, M. W. Albers, R. Karmacharya, E. Koh, P. K. Martin, M. K. Rosen, R. F. Standaert, T. J. Wandless, *Transplantation Proc.* **1991**, *23*, 2851–2857.
- [10] a) N. Yoshimura, S. Matsui, T. Hamashima, T. Oka, *Transplantation* **1989**, *47*, 351; b) N. Yoshimura, S. Matsui, T. Hamashima, T. Oka, *ibid.* **1989**, *47*, 356; c) T. Starzl, J. Fung, R. Venkataraman, S. Todo, A. J. Demetris, A. Jain, *Lancet ii* **1989**, 1000–1004.
- [11] a) M. W. Harding, A. Galat, D. E. Uehling, S. L. Schreiber, *Nature* **1989**, *341*, 758–760; b) J. J. Siekierka, S. H. Y. Hung, M. Poe, C. S. Lin, N. H. Sigal, *ibid.* **1989**, *341*, 755–757.
- [12] a) R. E. Handschumacher, M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge, D. W. Seicher, *Science* **1984**, *226*, 544–546; b) G. Fischer, H. Bang, C. Mech, *Biomed. Biochim. Acta* **1984**, *43*, 1101–1111; c) G. Fischer, B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiehaber, F. X. Schmid, *Nature* **1989**, *337*, 476–478; d) N. Takahashi, T. Hayano, M. Suzuki, *ibid.* **1989**, *337*, 473–475.
- [13] E. E. Emmel, C. L. Verweij, D. B. Durand, K. M. Higgins, E. Lacy, G. R. Crabtree, *Science* **1989**, *246*, 1617–1620.
- [14] A. J. Findlay, L. Radics, *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 579–590.
- [15] B. E. Bierer, P. S. Mattila, R. F. Standaert, L. A. Herzenberg, S. J. Burakoff, G. Crabtree, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9231–9235.
- [16] B. E. Bierer, P. K. Somers, T. J. Wandless, S. J. Burakoff, S. L. Schreiber, *Science* **1990**, *250*, 556–559; b) P. K. Somers, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8045–8056.
- [17] T. J. Wandless, S. W. Michnick, M. K. Rosen, M. Karplus, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2339–2341.
- [18] F. J. Dumont, M. J. Staruch, S. L. Koprak, M. R. Melino, N. H. Sigal, *J. Immunol.* **1990**, *144*, 251–258.
- [19] J. E. Kay, L. Kromwel, S. E. A. Doe, M. Denyer, *Immunology* **1991**, *72*, 544–549.
- [20] F. J. Dumont, M. R. Melino, M. J. Staruch, S. L. Koprak, P. A. Fischer, N. H. Sigal, *J. Immunol.* **1990**, *144*, 1418–1424.
- [21] M. Tropschug, I. B. Barthelmes, W. Neupert, *Nature* **1989**, *342*, 953–957.
- [22] Y. Koltin, L. Fauchette, D. J. Bergsma, M. A. Levy, R. Cafferkey, P. L. Koser, R. K. Johnson, G. P. Livi, *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 1718–1723.
- [23] J. Heitman, N. R. Movva, M. N. Hall, *Science* **1991**, *253*, 905–909.
- [24] Über ähnliche Ergebnisse mit FK506 wurde berichtet: J. Heitman, N. R. Movva, P. C. Hiestand, M. N. Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 1948–1952.
- [25] C. B. Klee, M. H. Krinks, *Biochemistry* **1978**, *17*, 120–126; b) C. B. Klee, T. H. Crouch, M. H. Krinks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, *76*, 6270–6273.
- [26] J. Liu, J. D. Farmer, Jr., J. Friedman, I. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, *66*, 807–815.
- [27] W. M. Flanagan, B. Corthesy, R. J. Bram, G. R. Crabtree, *Nature* **1991**, *352*, 803–807.
- [28] A. L. DeFranco, *Nature* **1991**, *352*, 754–755.

- [29] Kürzlich wurde von einem Beispiel einer von der Dephosphorylierung abhängigen Übertragung eines cytoplasmatischen Transkriptionsfaktors in den Zellkern berichtet: T. Moll, G. Tebb, U. Surana, H. Robitsch, K. Nasmyth, *Cell* **1991**, *66*, 743–758.
- [30] M. K. Rosen, R. F. Standaert, A. Galat, M. Nakatsuka, S. L. Schreiber, *Science* **1990**, *248*, 863–866.
- [31] G. Fischer, E. Berger, H. Bang, *FEBS Lett.* **1989**, *250*, 267–270.
- [32] a) R. K. Harrison, R. L. Stein, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1684–1689; b) R. K. Harrison, C. G. Caldwell, A. Rosegay, D. Melillo, R. L. Stein, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7063–7064.
- [33] J. Liu, M. W. Albers, C. Chen, S. L. Schreiber, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 2304–2308.
- [34] M. W. Albers, C. T. Walsh, S. L. Schreiber, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4984–4986.
- [35] J. L. Kofron, P. Kusmic, V. Kishore, E. Colón-Bonilla, D. H. Rich, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6127–6134.
- [36] M. Nakatsuka, J. A. Ragan, T. Sammakia, D. B. Smith, D. E. Uehling, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *112*, 5583–5601.
- [37] a) R. F. Standaert, A. Galat, G. L. Verdine, S. L. Schreiber, *Nature* **1990**, *346*, 671–674; b) N. Maki, F. Sekiguchi, J. Nishimaki, K. Miwa, T. Hayano, N. takahashi, M. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 5440–5443.
- [38] Eine Warnung, die hemiketale Hydroxygruppe als Imitation einer Amid-NH-Gruppe zu interpretieren: D. K. Donald, M. E. Cooper, M. Furber, E. Wells, R. Hutchinson, F. M. Black, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1375–1378.
- [39] M. K. Rosen, S. W. Michnick, M. Karplus, S. L. Schreiber, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4774–4789.
- [40] S. W. Michnick, M. K. Rosen, T. J. Wandless, M. Karplus, S. L. Schreiber, *Science* **1991**, *251*, 836–839.
- [41] J. A. Moore, D. A. Peattie, M. J. Fitzgibbon, J. A. Thomson, *Nature* **1991**, *351*, 248–250.
- [42] G. D. Van Duyne, R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber, J. A. Clardy, *Science* **1991**, *251*, 839–842.
- [43] G. D. Van Duyne, R. F. Standaert, S. L. Schreiber, J. A. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7433–7434.
- [44] G. D. Van Duyne, R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber, J. Clardy, unveröffentlicht.
- [45] Y. Ikeda, S. L. Schreiber, unveröffentlicht.
- [46] R. Taylor, O. Kennard, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5063–5070.
- [47] K. A. Thomas, G. M. Smith, T. B. Thomas, R. J. Feldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, *79*, 4843–4847.
- [48] K. B. Wiberg, R. F. Waldron, G. Schulte, M. Saunders, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 971–978.
- [49] A. Horovitz, L. Serrano, B. Avron, M. Bycroft, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **1990**, *216*, 1031–1044.
- [50] M. K. Rosen, S. W. Michnick, S. L. Schreiber, unveröffentlicht.
- [51] P. Karuso, H. Kessler, D. F. Mierke, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9434–9436.
- [52] D. F. Mierke, P. Schmieder, P. Karuso, H. Kessler, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1027–1047.
- [53] J. Pranata, W. L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9483–9493.
- [54] A. M. Petros, R. T. Gampe, Jr., G. Gemmecker, P. Neri, T. F. Holzman, R. Edalji, J. Hochlowski, M. Jackson, J. McAlpine, J. R. Luly, T. Pilot-Matas, S. Pratt, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2928–2931.
- [55] H. Fretz, M. W. Albers, A. Galat, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. J. Burakoff, B. E. Bierer, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1409–1411.
- [56] Y.-J. Jin, M. W. Albers, W. S. Lane, B. E. Bierer, S. L. Schreiber, S. J. Burakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 6677–6681.
- [57] a) Rind, 12 kDa: W. S. Lane, A. Galat, M. W. Harding, S. L. Schreiber, *J. Protein Chem.* **1991**, *10*, 151; b) Rind, 25 kDa: A. Galat, W. S. Lane, R. F. Standaert, S. L. Schreiber, *Biochemistry*, im Druck; c) *Neurospora crassa*; M. Tropschug, E. Wachter, S. Mayer, E. R. Schönbrunner, F. X. Schmid, *Nature* **1990**, *346*, 674; d) *Saccharomyces cerevisiae*, G. Wiederrecht, L. Brizuela, K. Elliston, N. H. Sigal, J. J. Siekierka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 1029; siehe auch [22, 24]; e) *Neisseria meningitidis*: A. C. F. Perry, I. J. Nicolson, J. R. Saunders, *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 1691; R. F. Standaert, A. Galat, G. L. Verdine, S. L. Schreiber, *Nature* **1990**, *346*, 671; f) *Legionella pneumophila* – Makrophageninfektivitätspotentiator (MIP): N. C. Engleberg, C. Carter, D. R. Weber, N. P. Cianciotto, B. I. Eisenstein, *Infect. Immunity* **1989**, *57*, 1263; g) *Chlamydia trachomatis*: A. G. Lundemoose, S. Birkelund, S. J. Fey, P. M. Larsen, G. Christiansen, *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 109; h) offener Leserahmen von *Pseudomonas aeruginosa* algR2 Gen: J. Kato, L. Chu, K. Kitano, J. D. DeVault, K. Kimbara, A. M. Chakrabarty, T. K. Misra, *Gene* **1989**, *84*, 31; G. Wiederrecht, L. Brizuela, K. Elliston, N. H. Sigal, J. J. Siekierka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 1029; i) Mutrans2 (Homologes von Maus Transition Protein 2; S. Nelki, C. Greenhall, F. Shanahan, K. Dudley, unveröffentlichte Sequenz von der EMBL-Datenbank (Zugangsnummer X17068, **1990**).
- [58] a) *Neurospora crassa*: M. Tropschug, D. W. Nicholson, F.-U. Hartl, H. Köhler, N. Pfanner, W. Wachter, W. Neupert, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 14433–14440; b) *Saccharomyces cerevisiae*: B. Haendler, R. Keller, P. C. Hiestand, H. P. Kocher, G. Wegmann, N. R. Movva, *Gene* **1989**, *83*, 39–46; c) *Escherichia coli*: J. Liu, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 4028–4032 (Rotamaseaktivität dieses Proteins wird nicht durch CsA inhibiert); d) *Drosophila melanogaster* ninaA: S. Schneuwly, R. D. Shortridge, D. C. Larribee, T. Ono, M. Ozaki, W. L. Pak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 5390–5394; B.-H. Shieh, M. A. Stammes, S. Seavello, G. L. Harris, C. S. Zuker, *Nature* **1989**, *338*, 67–70; e) Tomate, Mais, *Brassica napus*: C. S. Gasser, D. A. Gunnin, K. A. Budeler, S. M. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 9519; f) menschliches CyP-B: E. R. Price, L. D. Zydownsky, M. Jin, C. H. Baker, F. D. McKeon, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 1903–1907; g) *Saccharomyces cerevisiae* CyP-B: P. L. Koser, D. Sylvester, G. P. Livi, D. J. Bergsma, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 1643; h) menschliches CyP-C: J. Friedman, I. Weissman, *Cell* **1991**, *66*, 798–806.
- [59] A. G. DiLella, R. J. Craig, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8512–8517.
- [60] R. Wolfenden, A. Radzicka, *Chemtracts Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *2*, 52–54.
- [61] R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1987–1988.
- [62] a) S. G. Cohen, V. M. Vaidy, R. M. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1970**, *66*, 249–253; b) R. Wolfenden, *Science* **1983**, *222*, 1087–1093.
- [63] T. Drakenberg, K. I. Dahlqvist, S. Forsén, *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 2178–2183.
- [64] S. Scheiner, C. W. Kern, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 7042–7050.
- [65] K. B. Wiberg, K. E. Laidig, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5935–5943.
- [66] K. B. Wiberg, R. F. Waldron, G. Schulte, M. Saunders, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 971–977.
- [67] J. Kallen, C. Spitzfaden, M. G. M. Zurini, G. Wider, H. Widmer, . Wüthrich, M. D. Walkinshaw, *Nature* **1991**, *353*, 276–279.
- [68] H. Ke, L. D. Zydownsky, J. Liu, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 9483–9487.
- [69] C. Weber, G. Wider, B. von Freyberg, R. Traber, W. Braun, H. Widmer, K. Wüthrich, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6563–6574.
- [70] S. W. Fesik, R. T. Campe, Jr., H. L. Eaton, G. Gemmecker, E. T. Oleniczak, P. Neri, T. F. Holzman, D. A. Egan, R. Edalji, R. Simmer, R. Helfrich, J. Hochlowski, M. Jackson, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6574–6583.
- [71] L. Sawyer, *Nature* **1987**, *327*, 659.
- [72] a) R. Huber, M. Schneider, O. Epp, I. Mayr, A. Messerschmidt, J. Pflugrath, H. Kayser, *J. Mol. Biol.* **1987**, *195*, 423–434; b) M. E. Newcomer, T. A. Jones, J. Åqvist, J. Sundelin, U. Eriksson, I. Rask, P. A. Peterson, *EMBO J.* **1984**, *3*, 1451–1454; c) M. Z. Papiz, L. Sawyer, E. E. Eliopoulos, A. C. T. North, J. B. C. Findlay, R. Sivaprasadarao, T. A. Jones, M. E. Newcomer, P. J. Kralius, *Nature* **1986**, *324*, 383–385; d) H. M. Holden, W. R. Rypniewski, J. H. Law, I. Rayment, *EMBO J.* **1987**, *6*, 1565–1570.
- [73] S. W. Fesik, R. T. Gampe, Jr., T. F. Holzman, D. A. Egan, R. Edalji, J. R. Luly, R. Simmer, R. Helfrich, V. Kishore, D. H. Rich, *Science* **1990**, *250*, 1406–1409.
- [74] a) H.-R. Loosli, H. Kessler, H. Oschkinat, H.-P. Weber, T. J. Petcher, A. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 682–704; b) H. Kessler, M. Köck, T. Wein, M. Gehrke, *ibid.* **1990**, *73*, 1818–1832.
- [75] V. F. J. Quesniaux, R. M. Wanger, D. Schmitter, M. H. V. Van Regenmortel, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1988**, *31*, 173–185.
- [76] S. L. Heald, M. W. Harding, R. E. Handschumacher, I. M. Armitage, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4466–4478.
- [77] P. L. Durette, J. Boger, F. Dumont, R. Firestone, R. A. Frankshun, S. L. Koprak, C. S. Lin, M. R. Melino, A. A. Pessolano, J. Pisano, F. A. Schmidt, N. H. Sigal, M. J. Staruch, B. E. Witzel, *Transplantation Proc.* **1988**, *20*(2), Suppl 2, 51–57.
- [78] N. H. Sigal, F. Dumont, P. L. Durette, J. J. Sickierka, L. Peterson, D. H. Rich, B. E. Dunlap, M. J. Staruch, M. R. Melino, S. L. Koprak, D. Williams, B. Witzel, J. M. Pisano, *J. Exp. Med.* **1991**, *173*, 619–628.
- [79] J. Liu, S. L. Schreiber, unveröffentlicht.
- [80] W. T. Wickner, H. F. Lodish, *Science* **1985**, *230*, 400–407.
- [81] a) H. R. B. Pelham, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 483–486; b) H. R. B. Pelham, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1989**, *5*, 1–23.
- [82] J. E. Rothman, *Cell* **1989**, *59*, 591–601.
- [83] R. B. Freedman, *Trends Biol. Sci.* **1984**, *438*–441.
- [84] J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan, *Biochemistry* **1975**, *14*, 4953–4963; b) F. X. Schmid, R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, *75*, 4764–4768; c) F. X. Schmid, R. Grafl, A. Wrba, J. J. Beintema, *ibid.* **1986**, *83*, 872–876; d) H. P. Bächinger, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17144–17148; e) J. M. Davis, B. A. Boswell, H. P. Bächinger, *ibid.* **1989**, *264*, 8956–8962.
- [85] M. A. Stammes, B.-H. Shieh, L. Chuman, G. L. Harris, C. S. Zuker, *Cell*, **1991**, *65*, 219–227.
- [86] N. J. Colley, E. K. Baker, M. A. Stammes, C. S. Zuker, *Cell* **1991**, *67*, 255–263.
- [87] a) P. A. Silver, *Cell* **1991**, *64*, 489–497; b) J. Robbins, S. M. Dilworth, R. A. Laskey, C. Kingwall, *Cell* **1991**, *64*, 615–623.
- [88] D. R. Knighton, J. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, *ibid.* **1991**, *253*, 414–420.
- [89] C. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland, New York, **1991**, S. 60–61.