

# Über Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen und ihre Effektoren

Gunter Fischer\*

Professor Alfred Schellenberger zum 65. Geburtstag gewidmet

Nimmt ein Protein seine dreidimensionale, gefaltete, native Struktur ein, so sind Konformationsänderungen innerhalb der Polypeptidkette die elementaren Prozesse. Noch vor einigen Jahren galt die Faltung der Proteine in der Zelle als autonomer Vorgang, an dem weder Enzyme noch Hilfsstoffe beteiligt sind. Neuerdings werden immer mehr Faltungshelfer gefunden, zu denen auch Enzyme, die Konformationsänderungen katalysieren, gehören. Die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung, die innerhalb der Kette vor einem Prolinrest lokalisiert ist, wird durch Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) beschleunigt. Dies sind allgegenwärtige, phylogenetisch hochkonservierte Enzy-

me, von denen man bisher zwei Familien, die Cyclophiline und die FK506-bindenden Proteine, kennt. Ihre katalytische Aktivität ist außerordentlich hoch, so daß die Geschwindigkeitskonstanten der von ihnen katalysierten bimolekularen Reaktionen das diffusionskontrollierte Limit für Enzym-Substrat-Reaktionen erreichen. Diese Enzyme können die Isomerisierung sowohl von Oligopeptiden als auch von Faltungsintermediaten der Proteine beschleunigen. Welche Struktureinheiten bei Reaktionen in der Zelle als Substrate erkannt und welche Reaktionen dort katalysiert werden, ist noch nicht bekannt. Sicher ist, daß die Isomerasen mit Hitzeschockproteinen der nichtaktivierten Steroidrezepto-

ren oder auch mit dem gag-Polypeptid des Aids-Virus HIV-1 wechselwirken. Hochwirksame Inhibitoren der PPIasen sind die immunsuppressiven Verbindungen Cyclosporin A und FK 506. Überraschenderweise wirken diese Verbindungen zwar in der Signalkette der T-Zelle, aber nicht durch die Inhibierung des Enzyms; die Inhibitor-Enzym-Komplexe selbst sind die Wirkstoffe. Diese haben molekulare Eigenschaften, die die Einzelkomponenten nicht aufweisen, und die nun weitere Zellbestandteile beeinflussen können. Unter diesen Aspekten werden die gegenwärtig diskutierten Modelle zur Unterdrückung der antigen- und mitogenstimulierten klonalen Expansion der T-Zellen vorgestellt.

## 1. Einführung

Es gibt Reaktionen, für die scheint eine durch Enzyme induzierte Geschwindigkeitserhöhung und eine Selektivitätskontrolle in zellulärer Umgebung völlig überflüssig zu sein. Sie laufen, auch unkatalysiert, schnell und scheinbar spezifisch ab, so daß die Bereitstellung eines Enzyms durch den Syntheseparat der Zelle eine Verschwendung von Ressourcen wäre. Zu diesen offensichtlich autonomen Prozessen gehören generell solche, bei denen sich die Konformation in Naturstoffen ändert. Den Biochemiker interessieren natürlich besonders Konformationsänderungen in Proteinen, weil Proteine die zentralen Regulations-elemente der Zelle sind.

Durch Befunde aus zahlreichen Restrukturierungsexperimenten an entfalten Proteinen wurde diese Sicht der Dinge bestätigt. Geht man von einem Protein in denaturiertem Zustand aus, bei dem keine der ursprünglich vorhandenen Sekundärstrukturmerkmale der Polypeptidkette mehr nachweisbar sind, führen bei kleinen globulären Eindomänenproteinen alle Konforma-

tionsänderungen nach einem Sprung in eine renaturierende Umgebung ziemlich schnell zur Konformation des nativen Proteins. Zusätzliche Komponenten, die diese Faltung fördern, müssen dabei nicht zugegeben werden. Im Licht dieser Ergebnisse besteht ein nur geringer Evolutionsdruck, Organismen mit Enzymen auszustatten, die Konformationsänderungen katalysieren und dabei Proteine als Substrate erkennen können.

Eine ganz bestimmte, auch intrazellulär relevante Konformationsänderung, und zwar die *cis/trans*-Isomerisierung an der Aminosäure Prolin, benötigt relativ viel Zeit. Diesen Widerspruch konnte meine Arbeitsgruppe 1984 auflösen, indem wir das erste, eine Konformationsänderung an einer formalen Einfachbindung katalysierende Enzym, eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase), nachwiesen und isolierten<sup>[1]</sup>. Neue Enzyme sind erfahrungsgemäß als potentielle Zielobjekte für das Screening der Kulturfiltrate von Mikroorganismen nach Effektoren und für die chemisch-synthetische Pharmakaentwicklung besonders interessant<sup>[2]</sup>. In unserem Fall verlief die Entwicklung ein wenig anders. Erst lange nach dem klinischen Einsatz des immunsuppressiven Medikaments Cyclosporin A (CsA), einem cyclischen Undecapeptid, und nach der Identifizierung eines cytosolischen Rezeptorproteins für CsA durch Handschumacher et al.<sup>[3]</sup>, konnten N. Takahashi et al.<sup>[4]</sup> und

[\*] Prof. Dr. G. Fischer  
Max-Planck-Gesellschaft, Arbeitsgruppe Enzymologie der Peptidbindung  
Weinbegweg 16a, D-06120 Halle  
Telefax: Int. + 345/647126

wir<sup>[5]</sup> die enzymatische Aktivität dieses Rezeptors nachweisen und die Inhibitorwirkung von CsA auf die Enzymaktivität nachweisen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen verliefen im Falle des immunsuppressiven Peptidomakrolids FK506 die Rezeptorisolierung und die enzymologischen Experimente zeitgleich, wobei die Inhibierung einer nicht mit dem CsA-empfindlichen Enzym identischen PPIase durch FK506 festgestellt wurde<sup>[6]</sup>.

Völlig unerwartet war aber der Befund von amerikanischen Arbeitsgruppen, daß die suppressive Wirkung dieser Wirkstoffe auf die klonale Expansion der T-Zellen nicht aus der direkten Inhibierung der PPIase-Aktivität resultiert. Nach den bisherigen Erkenntnissen präsentiert das Protein die im Wirkstoff-Protein-Komplex in bezug auf die Konformation veränderten Liganden einer weiteren in der Zelle vorhandenen Komponente, und zwar der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin, die nun ihrerseits in ihrer dephosphorylierenden Wirkung inhibiert wird<sup>[7-9]</sup> (siehe Abschnitt 9).

Deshalb soll neben einer Betrachtung zum Vorkommen, zu den Eigenschaften und zum Mechanismus der durch PPIasen katalysierten Reaktionen in dieser Übersicht auch auf neue Erkenntnisse zur biologischen Wirkung der Immunsuppressor-Enzym-Komplexe eingegangen werden.

## 2. Prolin – ein molekularer Schalter

Verfolgt man die Umstrukturierung von Polypeptidketten, so kann man oft langsame Teilreaktionen (bis in den Stundenbereich) beobachten, wenn Prolin am Kettenaufbau beteiligt ist<sup>[10, 59]</sup>. Solche Faltungsvorgänge laufen nicht nur im Reagenzglas während künstlich eingeleiteter Renaturierungs- und Denaturierungsreaktionen ab, sondern auch in vivo bei der ribosomalen Proteinsynthese und -reifung, beim Transport von Polypeptiden durch Membranen, bei der Beseitigung funktionsgestörter Proteine sowie bei der Bindung von Liganden an und Oligomerisierung von Proteinen<sup>[11]</sup>. Bei vielen dieser Prozesse tritt kurzzeitig ein *cis/trans*-Isomerenverhältnis auf, das nicht dem des thermodynamischen Gleichgewichts entspricht und das für die augenblickliche individuelle Umgebung der Polypeptidkette maßgeblich ist.

Zur Illustration des Faltungsproblems ist in Abbildung 1 ein Ausschnitt aus der Struktur einer Polypeptidkette dargestellt. Eine Anzahl formaler Einfachbindungen ermöglicht Rotations-

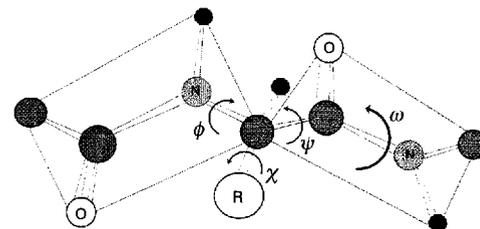


Abb. 1. Bezeichnung der Rotationswinkel in einer Polypeptidkette.

prozesse im Peptidrückgrat und in den Seitenketten und gewährleistet somit die Flexibilität der Polypeptidkette. Diese Torsionsbewegungen bedingen die meisten dynamischen Prozesse in einem Protein, also auch die Faltung. Als ungekoppelte Elementarprozesse sind sie bis auf eine Ausnahme (Veränderung des Winkels  $\omega$ ) schnell (Relaxationszeiten  $\ll 1$  s); durch die gegenseitige Beeinflussung der Rotationen und durch Nachbarschaftseffekte resultieren Umwandlungszeiten zwischen  $10^{-11}$  und  $10^3$  s. Zu besonders langsamen Konformationsänderungen neigt infolge der wohlbekanntesten Elektronendelokalisierung innerhalb der Amidbindung und einer zusätzlichen sterischen Komponente die Prolylpeptidbindung (Abb. 2). Zudem

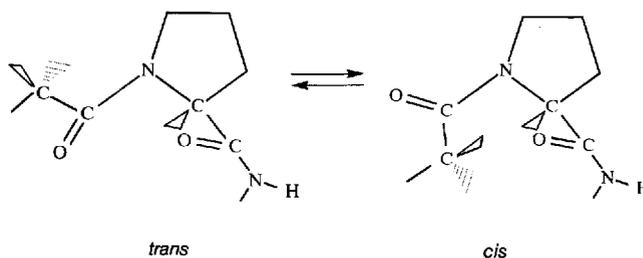


Abb. 2. Die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung N-terminal zum Prolin.

sind – anders als bei der C(O)NH-Bindung – die beiden energieärmsten Anordnungen im Konformationsraum, *cis* ( $\omega \approx 0^\circ$ ) und *trans* ( $\omega \approx 180^\circ$ ), bei der Prolylpeptidbindung thermodynamisch vergleichbar stabil. Im Prinzip können bei Polypeptiden mit  $n$  Prolinresten bis zu  $2^n$  Isomere als Bindungspartner bei Erkennungsprozessen und als Reaktionspartner auf molekularer Ebene in der Zelle zur Verfügung stehen. Die Tendenz von



Gunter Fischer, geboren 1943 in Altenburg, Thüringen, absolvierte von 1959–1962 eine Chemiefacharbeiterausbildung und das Abitur, bevor er 1967 sein Chemiestudium an der Universität Halle abschloß. Bis 1971 fertigte er bei A. Schellenberger seine Promotion A über die Reaktivität von  $\alpha$ -Ketosäuren an, 1978 seine Promotion B über die Reaktivität von Amidgruppen. Nach seiner Industrietätigkeit am Forschungszentrum Biotechnologie/Berlin wurde er 1988 als Dozent für Biochemie an die Universität Halle berufen, 1990 als Gastprofessor für sechs Monate an die Universität Würzburg. Seit 1992 ist er Leiter der Arbeitsgruppe „Enzymologie der Peptidbindung“ der Max-Planck-Gesellschaft in Halle und erhielt 1993 einen Lehrstuhl für Molekulare Biochemie an der dortigen Universität. Schwerpunkte seiner Forschung sind Struktur und Wirkung von Faltungsenzymen sowie der Einfluß von Iminosäuren auf die Peptidkonformation.

Proteinen, eine dreidimensionale Struktur zu bilden, ist ausgeprägt. Da in dieser Struktur die *cis*- und *trans*-Isomere nicht mehr energiegleich sind, ist das Vorliegen des weniger bevorzugten Isomers recht unwahrscheinlich.

Im Gefolge der *cis/trans*-Isomerisierung kommt es periodisch zu einer Veränderung der Lage benachbarter Kettensegmente, da sich die Propagationsrichtung des Polypeptidrückgrats in beiden Isomeren unterscheidet. In dieser Hinsicht ähnelt die *cis/trans*-Isomerisierung an der Peptidbindung N-terminal bezüglich der Prolineinheit einem molekularen Schaltvorgang, der wie folgt charakterisiert ist:

1. Es gibt zwei stabile Schalterstellungen; Zwischenpositionen sind instabil.
2. Der Schaltwiderstand ist auf der Skala der Aktivierungsenergien für biologische Erkennungsprozesse hoch.
3. Die Betätigung des Schalters führt zu einer Verstärkung eines Effekts am Ankunftsort des Signals. Im Falle des Prolinschalters resultiert hauptsächlich eine mechanische Bewegung, die sich in der Umorientierung der Segmente des Proteintrückgrats zeigen kann.
4. Isomerisierungskatalysatoren wie die PPIasen übernehmen die Funktion eines den Schaltwiderstand senkenden Regelglieds und sorgen in Gegenwart vieler Schalter zusätzlich für eine selektive Auswahl. Die Regelung des Schaltwiderstands (die Rotationsbarriere) erfolgt über die Enzymkonzentration und die Auswahl der Schaltelemente durch die Enzymspezifität.

Ein Beispiel für einen photoaktivierbaren Schaltvorgang ist die biologisch außerordentlich bedeutungsvolle *cis/trans*-Isomerisierung der C=C-Bindungen im Retinal und den Retinalproteinen<sup>[1,2]</sup>.

### 3. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen und andere immunophile Proteine

PPIasen können bereits in katalytischen Mengen die Isomerisierung der Prolylpeptidbindung (siehe Abb. 2) beschleunigen, wenn diese Struktureinheit in einem geeigneten Substratpeptid eingebaut ist. Untersucht man ein beliebiges Zellmaterial aus Säugetiergewebe, kann man PPIasen aufgrund ihrer Aktivitäten entdecken, die sich sowohl in der Molekülmassenverteilung als auch im isoelektrischen Verhalten unterscheiden (Abb. 3 und 4). Dies kann als erstes Indiz dafür gelten, daß eine ganze Gruppe solcher Enzyme existieren könnte.

In der Enzymnomenklatur sind PPIasen unter den *cis/trans*-Isomerasen (EC-Nummer 5.2.1.8) eingeordnet. Die mitunter in der Literatur auftauchenden alternativen Bezeichnungen „Rotamasen“<sup>[13]</sup> oder „Rotomasen“<sup>[14]</sup> gehen auf die Bezeichnung „Rotamerisierung“ für den Vorgang der Konformationsänderung zurück. Bisher sind zwei Proteinfamilien bekannt, die eine PPIase-Aktivität aufweisen: die Cyclophiline (Cyp) und die FK506-bindenden Proteine (FKBP) (Synonyme: FK506-bindende PPIasen, Makrophiline). Welche spezifische enzymatische Funktion zeichnet nun diese beiden Enzymgruppen aus?

Die enzymatisch katalysierte Isomerisierung am Prolin ist reversibel, d. h. sie ist an die gleichzeitige Gegenwart der *cis*- und der *trans*-Konformere gekoppelt. Schließt man irreversible Fol-

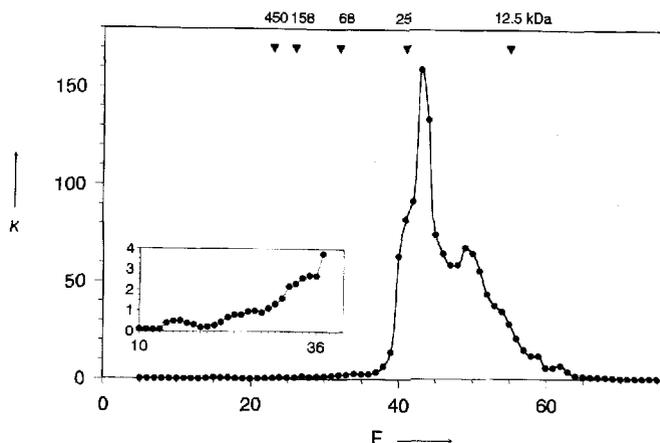


Abb. 3. Die Auftrennung der Aktivität der PPIasen aus dem Cytosol von Schweinenieren nach dem Molekulargewicht [kDa]. Die Aktivität wurde mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-nitroanilid anhand des gemessenen Beschleunigungsfaktors  $K$  in der jeweiligen Säulenfraktion  $F$  bestimmt;  $K = (k_b - k_0)/k_0$ ;  $k_b$  ist die Geschwindigkeitskonstante für die unkatalysierte,  $k_0$  für die katalysierte Isomerisierung (FPLC-Trennung an einer Bio-GPC-Diol-Säule (330 × 10 mm)). Das eingefügte Bild zeigt den Kurvenverlauf für die Fraktionen 10 bis 36 mit einem veränderten Ordinatenmaßstab.

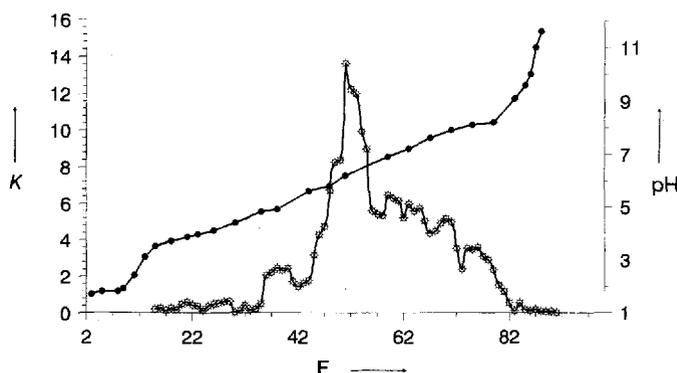


Abb. 4. Die Auftrennung der Aktivität (x) der PPIasen aus dem Cytosol von Schweinenieren nach dem isoelektrischen Verhalten der Enzyme in einem pH-Gradienten (●); Aktivitätsbestimmung siehe Abb. 3; Trennung mit einer kontinuierlichen Free-Flow-Elektrophorese (Octopus, Fa. Dr. Weber, Ismaning) bei 5°C in 0,2% Servalyt (pH 3–10), 0,1% Dextran ( $M = 1$  kDa).

gereaktionen an das *cis/trans*-Gleichgewicht an, so sind auch die katalysierten Teilreaktionen *cis* → *trans* und *trans* → *cis* getrennt zugänglich. Für alle drei Fälle liegen in vitro gesicherte experimentelle Daten zur PPIase-Katalyse vor, aber welcher der drei Fälle in vivo hauptsächlich von diesen Enzymen katalysiert wird, darüber kann gegenwärtig nur spekuliert werden. Untersucht man humanes Cyp18cy (zu den Bezeichnungen für die PPIase-Familien siehe<sup>[15]</sup>), setzt Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilid als Substrat ein und hält während der *cis* → *trans*-Isomerisierung die PPIase-Konzentration sehr niedrig, so wird für diese Konformationsänderung eine normale Michaelis-Menten-Kinetik ermittelt, ohne daß bei niedrigen Substratkonzentrationen  $[S]_0$  Anzeichen eines sigmoiden Kurvencharakters oder andere Effekte im  $v/[S]_0$ -Graphen sichtbar werden ( $v$  entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit). Die Reaktionsbeschleunigung für die *cis* → *trans*-Isomerisierung in Oligopeptidsubstraten (wenn  $[S]_0 \ll K_m$ ) ist linear von der Enzymkonzentration abhängig<sup>[1, 16, 17]</sup>.

Unter den für den Standardaktivitätstest geltenden Reaktionsbedingungen (Enzymkonzentration  $[E]_0 \ll [S]_0$ ) ändern die PPI-

asen das *cis/trans*-Verhältnis des Substrats selbstverständlich nicht. Allerdings entspricht die Isomerenverteilung nach der Bindung von Substraten<sup>[18, 19]</sup> (und von Inhibitoren<sup>[20, 21]</sup>) an PPIasen nicht derjenigen des freien Liganden im festen Zustand oder in Lösung. Am Enzym wird manchmal das *trans*-, manchmal das *cis*-Isomer besser gebunden. Liegen PPIase und Substrat stöchiometrisch oder die PPIase gar im Überschuß vor, kann dadurch das Isomerengleichgewicht von prolinhaltigen Polypeptiden völlig verändert werden. Untersucht man zelluläre Prozesse, an denen PPIasen beteiligt sind, ist dies ein wichtiger Aspekt, da die intrazellulären Enzymkonzentrationen oftmals hoch sind. Im Cytosol von humanen Erythrocyten ist die Konzentration von Cyclophilinen mindestens  $4 \mu\text{M}$ <sup>[22]</sup> und kann somit leicht die Konzentration eines potentiellen, intrazellulären Substrats übertreffen.

Mit der katalytischen Funktion untrennbar verbunden ist eine spezifische Erkennungs- und Bindungsfähigkeit der PPIasen für einen in einer linearen Polypeptidkette eingebauten Prolinrest. Diese Bindungsfähigkeit könnte durch begünstigende Nebenbindungsstellen noch verstärkt werden. Unter diesen Umständen könnten PPIasen auch eine Rolle als Bindungsproteine mit einer „spezifischen Prolinerkennung“ spielen. So erinnert die achtsträngige, antiparallele  $\beta$ -Barrel-Struktur des humanen Cyp18cy an typische Strukturen von Bindungs- und Transportproteinen für kleine hydrophobe Moleküle, beispielsweise die des Bilin-Bindungsproteins, des Retinol-Bindungsproteins und des Streptavidins, obwohl die Bindungsstellen dieser Proteine für ihre Liganden ganz anders aufgebaut sind<sup>[23, 24]</sup>.

Nach unseren bisherigen Erkenntnissen können PPIasen die Isomerisierung der offenkettigen *N*-Alkylpeptidbindung in Oligopeptiden nicht gut beschleunigen. Dies zeigt, daß für die Katalyse der Proteinfaltung das Prolin selbst und nicht etwa eine spezielle Eigenschaft der Peptidbindung von Bedeutung ist<sup>[25]</sup>.

Die Aminosäuresequenzen der Cyclophiline und der FKBP<sup>[26]</sup> sind, auch in den für die Enzymaktivität wichtigen Regionen der Peptidkette, nicht sehr ähnlich; auch die Strukturhomologie der aktiven Zentren ist sehr begrenzt<sup>[27]</sup>. Die beiden Enzymfamilien lassen sich auch sehr gut durch ihr abweichendes Verhalten gegenüber Cyclosporin A und Peptidomakroliden unterscheiden. Nur CsA und seine Derivate inhibieren Cyclophiline, während FKBP von Peptidomakroliden inaktiviert werden. Eine Kreuzinhibition wird nicht beobachtet.

Innerhalb der beiden Familien sind die Aminosäuresequenzen quer durch das Organismenreich hochkonserviert. Unter den Isoformen der Cyclophiline und denen der FKBP eines Zelltyps wird ein für die Enzymaktivität offensichtlich besonders wichtiger Kernbereich durch C-terminale und N-terminale Extensionen unterschiedlicher Länge komplettiert. Eine solche Konservierung größerer Kernbereiche im Verlauf der Evolution wird als Hinweis auf eine zentrale Bedeutung der betreffenden Proteinfunktion im zellulären Geschehen gedeutet.

Einige PPIase-Gene wurden bereits auf dem humanen Genom lokalisiert: humanes Cyp23sc ist auf Chromosom 15<sup>[28]</sup>, Cyp150mem auf Chromosom 3<sup>[29]</sup>, FKBP12cy auf Chromosom 20 und FKBP13cy auf Chromosom 11<sup>[30]</sup> angeordnet. In einer Genbank aus humaner Leukocyten-DNA sind ein einziges funktionales Cyp18cy-Gen und fünfzehn Pseudogene vorhanden<sup>[31]</sup>.

Um zu verdeutlichen, daß die PPIasenfamilien als Rezeptorproteine in das Immungeschehen eines Säugerorganismus eingebunden sind, wurde von S. L. Schreiber et al. die Bezeichnung „Immunophiline“ geschaffen<sup>[32]</sup>. Dieser Terminus bezieht sich auf die Bindung der immunsuppressiven Medikamente Cyclosporin A, Rapamycin und FK506 (Abb. 5) unter Bildung eines

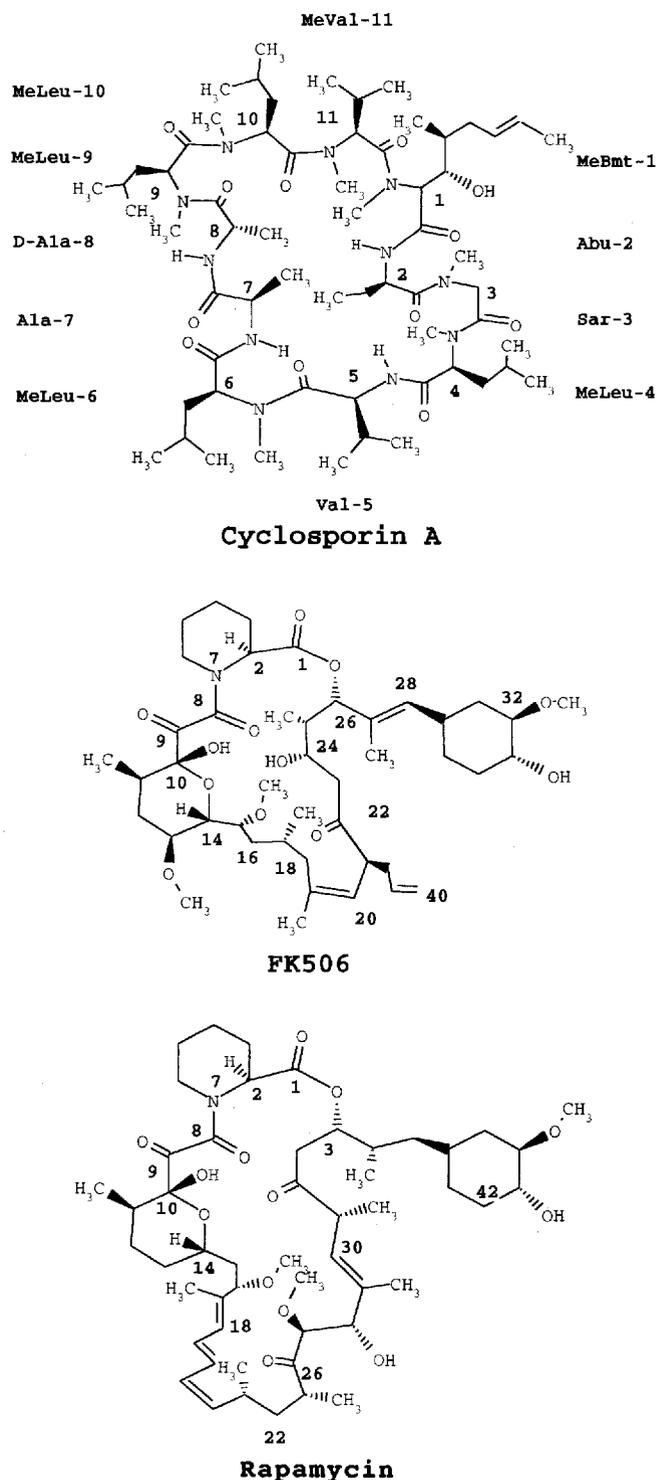


Abb. 5. Immunsuppressive Inhibitoren der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. Am Cyclosporin A entspricht MeBmt (4*R*)-4[(*E*)-2-Butenyl]-4-*N*-dimethyl-L-threonin und Abu L- $\alpha$ -Aminobuttersäure. Substituiert man MeBmt am C21-Atom (Ethylgruppe anstelle des Allylrests), erhält man die immunsuppressive Verbindung Ascomycin.

Wirkstoff-Protein-Komplexes. Cyclosporin A, Rapamycin und FK506 (Synonym: Tacrolimus) sind aus Mikroorganismen stammende Naturprodukte, die spezifische Wirkungen im Immunsystem<sup>[33, 34]</sup>, aber nicht nur dort<sup>[35]</sup>, ausüben. In antigen-stimulierten T-Lymphocyten werden durch diese Immunsuppressiva  $Ca^{2+}$ -abhängige Wege in der zur klonalen Expansion der Zellen führenden Signaltransduktion blockiert. Einer der Hauptfaktoren, warum die T-Zell-Antwort nach der Triggerung des Rezeptor-CD3-Komplexes durch ein präsentiertes Antigen oder Mitogen unterdrückt wird, scheint die Inhibierung der Expression einiger wichtiger Lymphokingene zu sein. Dazu gehören die Gene mehrerer Interleukine (IL-2, IL-3, IL-4), die Faktoren GM-CSF (Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor), Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  sowie das Onkogen *c-myc*<sup>[36]</sup>. Als Regulationsebene hat sich die Translokation von Komponenten der bisher proteinchemisch noch recht wenig charakterisierten Transkriptionsfaktoren (AP-3, NF-AT, NF- $\kappa$ B) aus dem Cytosol in den Kern herausgestellt<sup>[37]</sup>.

Immunophil sind aber weit mehr Proteine als die, deren PPIase-Aktivität nachgewiesen wurde<sup>[38, 39]</sup>. Unter anderem binden die immunsuppressiven CsA-Derivate [D-Lys( $\epsilon$ -Dansyl)<sup>8</sup>]-CsA und [D-Dab(Boc)<sup>8</sup>]-CsA (Dissoziationskonstanten:  $K_d = 60 \pm 33$  nM bzw.  $570 \pm 380$  nM) ähnlich stark an G-Actin aus Jurkat-Zellen wie an die PPIasen aus dem gleichen Zellhomogenat<sup>[40]</sup>. Auch das Streßgen SSA1, das dem Actin strukturverwandte, cytosolische Hefeanalogon des Hitzeschockproteins hsp70, kann [D-Lys( $\epsilon$ -Dansyl)<sup>8</sup>]-CsA mit einer Dissoziationskonstanten von 53 nM binden<sup>[40]</sup>. Die In-situ-Affinitätsphotomarkierung von Fibroblasten, Hepatocyten und lymphoiden Zell-Linien mit [<sup>3</sup>H]N-(Diazotrifluorethyl)benzyl-D-Lys<sup>8</sup>-cyclosporin führt zu einer Vielzahl mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (SDS = Natriumdodecylsulfat) detektierbaren, spezifisch markierten Proteinen im Bereich von ca. 20–200 kDa, die nur zum Teil den bisher bekannten PPIasen zugeordnet werden können<sup>[39, 41]</sup>. Darunter befindet sich als identifizierbares Material auch ein Membranprotein des  $Na^+$ /D-Glucose-Cotransporters der Niere mit einem Molekulargewicht von 75 kDa<sup>[42]</sup>.

Die spezifische Bindung von Interleukin-8 (IL-8) an CsA ( $K_d = 850$  nM) wird sogar noch immunchemisch in den Bereich der Bindungsfähigkeit von PPIasen gerückt, da die Kreuzreaktivität eines Antiserums gegen humanes, rekombinantes IL-8 mit einer cytosolischen PPIase nachgewiesen wurde. Im enzymatischen Standardtest zeigt IL-8 jedoch keine PPIase-Aktivität<sup>[43]</sup>. Noch weitgehend uncharakterisiert ist ein cytosolisches, 50 kDa schweres, immunophiles Protein aus Jurkat- und Milzzellen. Es bindet hochaffin sowohl CsA ( $K_d = 39$  nM) als auch FK506 ( $K_d = 2$  nM), ohne PPIase-aktiv zu sein. Sowohl Rapamycin als auch CsA können mit [<sup>3</sup>H]-Dihydro-FK506 vom Bindungsort verdrängt werden<sup>[44]</sup>.

Auf der molekularen Ebene noch völlig ungeklärt ist die Bindung von Cyclosporinderivaten an das für einen speziellen Typus der Vielfachresistenz von Krebszellen verantwortliche, membranständige P-Glycoprotein (170 kDa)<sup>[45]</sup>. Ebenso wie diese Cyclosporine verhindern auch FK506 und der PPIase-Inhibitor Rapamycin das Ausschleusen cytotoxischer Stoffe aus den Zellen durch eine hochaffine Bindung an das P-Glycoprotein<sup>[46]</sup>.

Die Immunophilie umfaßt einerseits einen weitaus größeren Proteinpool als den der PPIasen. Andererseits gehören zu der

Tabelle 1. Eigenschaften einiger Cyclophiline.  $K_d$  = Dissoziationskonstante,  $K_i$  = Inhibitionskonstante.

Cyclophilin	N-Terminus [a]	PPIase-Aktiv. [b]	Inhibierbar durch CsA [nM]	Lit.
Mensch18cy	<sup>1</sup> M(rec.); <sup>2</sup> V(nat.)	22	1.6 ( $K_i$ )	[97, 106, 107]
(Schwein) Rind18cy	<sup>2</sup> VNPTV; N-Block.	13.4	2.6 ( $K_i$ ); 20 (IC <sub>50</sub> )	[5, 51, 108]
Ratte18cy		+	sensitiv	[109]
<i>L. esc.</i> 18cy		+	sensitiv	[75]
<i>P. vulgaris</i> 18cy		+	sensitiv	[110]
<i>C. albicans</i> 18cy		+	sensitiv	[80]
<i>S. cerevisis</i> 17cy		19	40 (IC <sub>50</sub> ); 4.1 ( $K_i$ )	[111, 112]
<i>N. crassa</i> 24mito	<sup>45</sup> SKVFFD	+	200 ( $K_d$ )	[113]
<i>D. melanog</i> 26mem		[c]	wahrscheinlich	[88]
Mensch41cy	N-Block	+	300 (IC <sub>50</sub> )	[90]
Mensch24sec	<sup>32</sup> ADEKK	+	sensitiv	[92]
Mensch23sec	<sup>26</sup> DEKKK	+	84 (IC <sub>50</sub> )	[93]
Maus22sec		+	400 ( $K_d$ )	[95]
Mensch22mito		8.0	8 ( $K_i$ )	[97]
Maus23sec		+	sensitiv	[8]
<i>S. cerevisis</i> 20mito	<sup>21</sup> GKKVF	9.2	9.3 ( $K_i$ )	[99]
<i>S. cerevisis</i> 23sec	<sup>21</sup> SDVGE	+	101 (IC <sub>50</sub> )	[111, 114]
<i>S. chryso</i> 18	<sup>4</sup> KVYFD	+	25 (IC <sub>50</sub> )	[103]
<i>E. coli</i> 18cy		67.4	25000–50000 (IC <sub>50</sub> )	[115]
<i>E. coli</i> 21peri	<sup>25</sup> AKGDP	57.1	25000–50000 (IC <sub>50</sub> )	[115]

[a] Ansequenzierte N-terminale Enden isolierter, reifer Proteine (Aminosäuren im Einbuchstabencode). [b] Der Quotient  $k_{cat}/K_m$  [ $\mu M^{-1} s^{-1}$ ] ist ein Maß für die PPIasen-Aktivität. Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilid wurde als Substrat eingesetzt. Bestimmung bei 10 °C. [c] Nicht bestimmt.

Tabelle 2. Eigenschaften einiger FK506-bindenden Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (FKBP).

FKBP	N-Terminus [a]	PPIase-Aktiv. [b]	Inhibierbar durch FK506 und Rap [nM] [c]	Lit.
Mensch12cy	<sup>2</sup> GVQVE	2.2, 0.64	1.7 (FK), 0.2 (Rap), $K_i$	[162, 190, 191]
Rind12cy	<sup>2</sup> GVQVE	0.66	0.25 (Rap), $K_i$	[51, 168]
<i>S. cerevisis</i> 12cy	N-Block	82	0.9 (FK), 0.5 (Rap), $K_d$	[168, 180]
Mensch16mem	<sup>22</sup> TGT(A)EG	1.5	55 (FK), $K_i$	[192]
Mensch25	N-Block	0.8 [d]	160 (FK), 0.9 (Rap), $K_i$ [d]	[177]
Mensch52	<sup>2</sup> TAAE	0.39 [e]	10 (FK), 8 (Rap), $K_i$	[178, 193]
Kanin.52	XAEEM	[f]	[f]	[194]
<i>S. cerevisis</i> 14	<sup>18</sup> GSLSD	54	8.3 (FK), 0.7 (Rap), $K_i$	[180]
<i>S. chryso</i> 13	<sup>2</sup> SIEKP	+	≈ 40 (FK), ≈ 10 (Rap), IC <sub>50</sub>	[181]
<i>N. crassa</i> 13		+	≈ 20 (FK), IC <sub>50</sub>	[182]
<i>N. meningitidis</i> 12		+	sensitiv FK	[183]
<i>C. trachomatis</i> 27		+	sensitiv FK und Rap	[195]
<i>L. pneumophila</i> 25	<sup>21</sup> ATDAT	1.2	210	[185, 218]

[a] Ansequenziertes N-terminales Ende isolierter, reifer Proteine. [b]  $k_{cat}/K_m$  [ $\mu M^{-1} s^{-1}$ ]; Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-4-nitroanilid als Substrat;  $T = 10$  °C. [c] FK506 = FK, Rapamycin = Rap. [d] Rinderenzym. [e] Bestimmung bei 15 °C. [f] Nicht bestimmt.

Gruppe der PPIasen Proteine mit vergleichsweise geringer Affinität gegenüber Cyclosporin A (Tabelle 1) und FK506 (Tabelle 2), die somit nicht immunophil sind.

#### 4. Messung der Enzymaktivität

In Tabelle 3 sind die bisher bekannten Methoden zur Messung von PPIase-Aktivitäten aufgeführt. Sie beruhen oftmals darauf, reine *cis*- oder *trans*-Isomere oder zumindest eine Isomerenverteilung herzustellen, die von der Verteilung des den äußeren Bedingungen entsprechenden Gleichgewichtszustands abweicht. Auf diese Weise kann man die Kinetik der Einstellung

Tabelle 3. Methoden zur Messung der katalytischen Aktivität von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen.

Methode	Detektion	Reaktionsrichtung	Substrattyp	Anwendbar in Homogenaten	Lit.
Isomerspezifische Proteolyse	UV/VIS; Fluoreszenz	<i>cis</i> → <i>trans</i>	Oligopeptide	ja	[1, 4, 51, 60]
NMR-Spektroskopie	Sättigungstransfer; Linienverbreiterung	<i>trans</i> ⇌ <i>cis</i>	Oligopeptide, kurze Proteine	nein	[55–57, 61]
Solventsprung	Fluoreszenz; UV/VIS	<i>trans</i> → <i>cis</i> <i>cis</i> → <i>trans</i>	Oligopeptide	ja	[52, 53]
Rückfaltung/Entfaltung	Fluoreszenz	<i>trans</i> → <i>cis</i> ; <i>cis</i> → <i>trans</i>	Proteine	nein	[16, 62, 63]
	UV/VIS	<i>trans</i> → <i>cis</i> ; <i>cis</i> → <i>trans</i>	Proteine	nein	[62, 64]
	Circulardichroismus	<i>trans</i> → <i>cis</i> ; <i>cis</i> → <i>trans</i>	Proteine	nein	[65]
	Proteolyse	<i>trans</i> → <i>cis</i> ; <i>cis</i> → <i>trans</i>	Proteine	nein	[65, 136]
	enzymatische Aktivität	<i>trans</i> → <i>cis</i> ; <i>cis</i> → <i>trans</i>	Proteine	ja	[66–68]

des Gleichgewichts und damit die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung untersuchen. Setzt man die dynamische NMR-Spektroskopie ein, so wird die Aktivität im ungestörten *cis/trans*-Gleichgewichtszustand gemessen. Obwohl bei linearen, prolinhaltigen Oligopeptiden *cis*- und *trans*-Formen durch Tieftemperatur-HPLC manchmal getrennt werden können<sup>[4,7]</sup>, ist die Lebensdauer der isolierten, reinen Konformeren für analytische Messungen meist zu gering. Deshalb löst man die Hydrolyse einer Peptidbindung durch eine isomerspezifische Protease aus, um durch diese angekoppelte irreversible Bindungsspaltung das Konformationsgleichgewicht vorübergehend zu stören. Diese Reaktion ermöglicht eine kinetische (und thermodynamische) Analyse des Konformationsgleichgewichts, weil viele Proteasen das all-*trans*-Konformer eines Substrats mehr als 10<sup>4</sup>fach bevorzugen (Zahlenwert bezieht sich auf den  $k_{cat}/K_m$ -Wert, wobei  $k_{cat}$  der Wechselzahl und  $K_m$  der Michaelis-Konstanten entspricht). Die isomerspezifische Proteolyse kann auch dann beobachtet werden, wenn die isomerisierbare Bindung weit entfernt von der proteolytisch gespaltenen Bindung ist (Abb. 6)<sup>[48–50]</sup>.

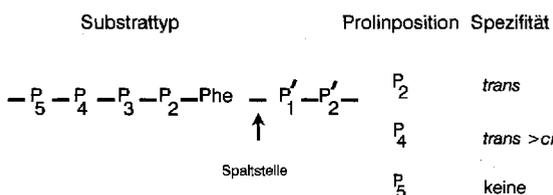


Abb. 6. Schematische Darstellung der *cis/trans*-Konformationspezifität von  $\alpha$ -Chymotrypsin für prolinhaltige Substrate, die diese Aminosäure in unterschiedlichen Positionen P der Peptidkette enthalten. Ausgewertet wurde die Spezifitätskonstante  $k_{cat}/K_m$ . Die Nebenbindungsstellen der Proteasesubstrate sind anhand der Nomenklatur von Berger und Schechter [264] bezeichnet, nach der die reaktive Bindung zwischen P<sub>1</sub> und P<sub>1</sub>' angesiedelt ist.

Abbildung 7 zeigt für den Fall  $[E]_0 k_{cat}^S \gg k_{-1} K_m^S$ , daß sich die enzymatische Bildungsgeschwindigkeit  $v$  eines gemeinsamen Reaktionsprodukts aus einem Konformerengleichgewicht heraus einem Grenzwert nähern kann, wenn das Gleichgewicht durch eine sehr aktive, konformationsspezifische Protease gestört wird. Bei hoher Enzymkonzentration  $[E]_0$  und Vorliegen eines unreaktiven Isomers S ist die Geschwindigkeit  $v$  der Produktbildung unabhängig von der Proteasekonzentration.

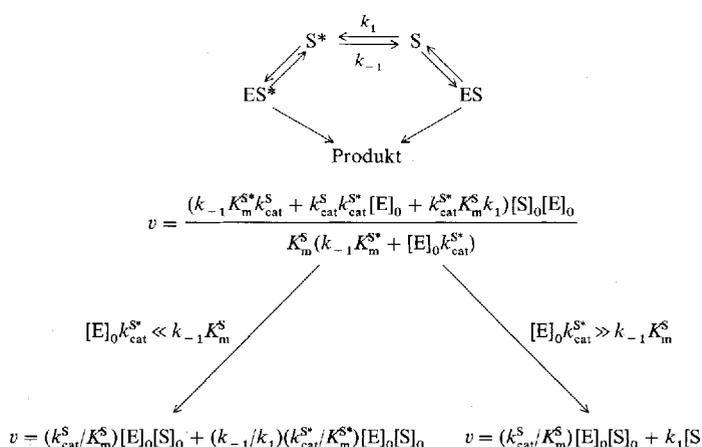


Abb. 7. Die Bildungsgeschwindigkeit  $v$  eines gemeinsamen Produkts einer enzymkatalysierten Reaktion aus einem in verschiedenen Konformationen vorliegenden Substrat S unter Stationärbedingungen ( $[S^* + S]_0 \ll K_m^S, K_m^S$ ).

Sie wird in diesem Fall nur noch von der Umwandlungsgeschwindigkeit des unreaktiven Konformers ( $k_1$ ; beim Peptidbindungsisomer *cis* → *trans*) bestimmt, die bei einem chromogenen Proteasesubstrat sehr leicht verfolgt werden kann.

Die resultierende Reaktion ist 1. Ordnung, und die Beschleunigung der *cis* → *trans*-Isomerisierung durch eine zugesetzte PPIase ist an Kurvenverläufen in Abbildung 8 zu erkennen. Wenn man bei Substratkonzentrationen  $[S]_0 \ll K_m$  für die betreffende PPIase arbeitet, ergibt sich aus der Geschwindigkeitskonstanten  $k_b$  [ $s^{-1}$ ] der beschleunigten Reaktion 1. Ordnung ( $k_u$  [ $s^{-1}$ ] ist die Konstante für die unkatalysierte Isomerisierung) sofort die Geschwindigkeitskonstante  $(k_{cat}/K_m$  [ $M^{-1} s^{-1}$ ] =  $(k_b - k_u) / [E]_0$ ) für die bimolekulare durch die PPIase katalysierte Reaktion. Die isomerspezifische Proteolyse ist eine in bezug auf die Molekülstruktur der Substrate und die proteolytische Empfindlichkeit der PPIasen in Grenzen variierbare Methode, mit der selbst PPIase-Aktivitäten in nur grob aufbereiteten biologischen Materialien quantitativ bestimmt werden können. Für rekombinantes Cyp18cy (Mensch) liegt die noch nachweisbare Enzymkonzentration im Meßansatz bei ca. 0.02 nM.

Die durch die geringen Anteile an *cis*-Isomeren (ca. 5–30% der Gesamtkonzentration, je nach Peptidstruktur) limitierten

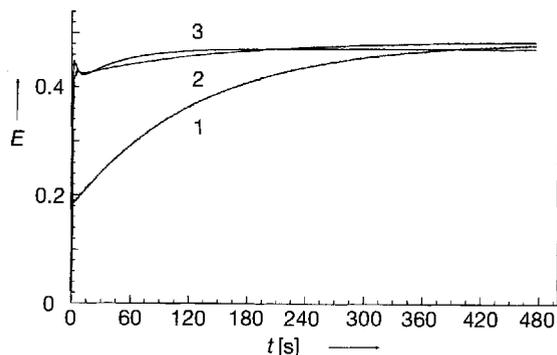


Abb. 8. Der Verlauf der Spaltung von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-nitroanilid durch die konformationsspezifische Protease Subtilisin Typ VIII ( $0.15 \text{ mg mL}^{-1}$  in  $0.035 \text{ M}$  Hepes-Puffer, pH 7.8,  $13^\circ \text{C}$ ) in Abhängigkeit von der Zeit  $t$ ; Detektion bei  $390 \text{ nm}$ . 1) Unkatalysierte *cis*  $\rightarrow$  *trans*-Isomerisierung, gestartet mit dem in  $0.2 \text{ M}$  LiCl/Trifluorethanol gelösten Peptid; 2) unkatalysierte *cis*  $\rightarrow$  *trans*-Isomerisierung, gestartet mit dem in Dimethylsulfoxid gelösten Peptid; 3) wie Kurve 2, aber mit  $5 \text{ nM}$  Cyp18cy im Ansatz. Die Spikes am Kurvenanfang sind Mischartefakte.

Amplituden der Isomerisierung führen manchmal zu Problemen mit dem Signal/Rausch-Verhältnis, und bei hohen Substratkonzentrationen kommt es zu Löslichkeitsproblemen. D. Rich et al.<sup>[51]</sup> konnten zeigen, daß in einer Lösung der Standardsubstrate Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilid in LiCl/Trifluorethanol ( $0.235\text{--}0.47 \text{ M}$ ) Konzentrationen an *cis*-Isomeren von über 50% erreicht werden, die die Ausführung der Aktivitätsbestimmung wesentlich erleichtern (Abb. 8).

Nutzt man einen solchen Lösungsmittelsprung für Peptide wie das fluorogene 2-Aminobenzoyl-Gly-Ala-Pro-Phe(4- $\text{NO}_2$ )-Xaa- $\text{NH}_2$ , die in der Fluoreszenz intramolekular gequench sind, kann sogar die Isomerisierungsgeschwindigkeit ohne Zugabe einer Hilfsprotease verfolgt werden<sup>[52]</sup>. Nach dem Sprung steigt beim Übergang in die *trans*-Konformation die Intensität der Fluoreszenz an. Mit der gleichen Technik, allerdings wird die Intensitätsabnahme der Absorption bei  $428 \text{ nm}$  im UV/VIS-Spektrum detektiert, kann die katalytische Wirkung der PPIase auf Ala-Ala-Pro-Tyr(3- $\text{NO}_2$ )-Ala $\text{NH}_2$  im reversiblen Gleichgewicht bestimmt werden<sup>[53]</sup>. Das Meßsignal resultiert aus den unterschiedlichen  $pK_a$ -Werten des 3-Nitrotyrosylrests in den beiden Konformationszuständen des Peptids<sup>[54]</sup>.

Im eindimensionalen NMR-Spektrum kann man durch Sättigungstransfer<sup>[17, 55, 56]</sup> oder durch die Analyse der Linienverbreiterung<sup>[57, 58]</sup> die Relaxationsgeschwindigkeit beider Teilreaktionen des Isomerisierungsgleichgewichts in Gegenwart katalytischer Enzymmengen messen. Auf der NMR-Zeitskala ist die Umwandlungsgeschwindigkeit der meisten *cis*- und *trans*-Prolylpeptidbindungs-Konformere langsam. Man findet deshalb für die Kerne in der Umgebung des Isomerisierungszentrums getrennte Signale für beide Molekülformen. In Gegenwart von PPIasenkonzentrationen größer  $1 \mu\text{M}$  kommt es bei dem Standardsubstrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilid durch die stark erhöhte Umwandlungsgeschwindigkeit zur Koaleszenz der beiden Resonanzsignalsätze der Konformere. Der katalysierte chemische Austausch läßt sich auch in einem NOESY-Experiment an humanem Calcitonin<sup>1-32</sup> durch das Auftreten zusätzlicher Kreuzpeaks in Gegenwart von Cyp18cy nachweisen (Abb. 9)<sup>[58]</sup>.

Untersucht man die Kinetik der Rückfaltung und der Entfaltung von Proteinen<sup>[10, 59]</sup>, so findet man unter Umständen langsame Faltungsphasen, die oftmals durch die *trans*  $\rightarrow$  *cis*-Isome-

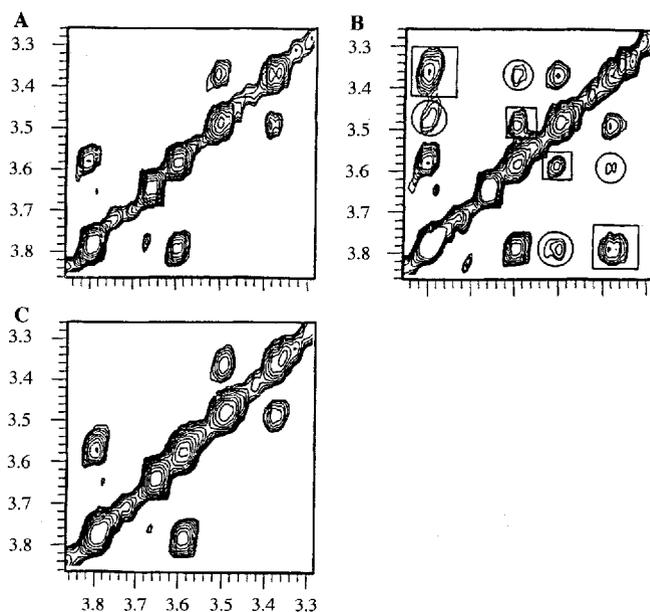


Abb. 9. Im Prolinbereich ( $\delta$ -Ringprotonen) gespreiztes  $^1\text{H-NMR-NOESY}$ -Spektrum von humanem Calcitonin<sup>1-32</sup>; A: in Phosphatpuffer, pH 6.8; B: wie A, aber zusätzlich in Gegenwart von  $25 \mu\text{M}$  Cyp18cy; C: wie B, aber Inhibition der Cyp18cy-Aktivität durch einen Überschuss an CsA. Die zusätzlichen Kreuzpeaks (Kästchen) in B kommen durch den in Gegenwart der PPIase schnellen *cis/trans*-Austausch an der Phe-<sup>23</sup>Pro-Bindung zustande. Die aus der PPIase-Katalyse resultierenden NOESY-Kreuzpeaks zwischen den  $\delta$ -Ringprotonen von *cis*- und von *trans*-<sup>23</sup>Pro sind durch Kreise gekennzeichnet [58]. An den Achsen sind die chemischen Verschiebungen  $\delta$  aufgetragen.

risierung einer oder mehrerer Prolylpeptidbindungen bedingt sind. Infolge von Polaritätsänderungen im Verlauf der Faltung verändert sich die Fluoreszenz oder die Absorption von Tyr- und Trp-Resten in Nachbarschaft der Prolineneinheiten, so daß sie als Sonden für den Isomerisierungsverlauf dienen können. Als besonders geeignetes Substrat für beide PPIasenfamilien hat sich RNase T1, die zwei Bindungen mit *cis*-Anordnung (Tyr-<sup>39</sup>Pro und Ser-<sup>55</sup>Pro) im nativen Zustand enthält, erwiesen. Unter Bedingungen, bei denen beide kinetische Prozesse getrennt zu beobachten sind, werden auch beide durch PPIasen katalysiert<sup>[25]</sup>. Geringe Konzentrationen (kleiner  $1 \text{ M}$ ) an Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid werden bei der Rückfaltung von den cytosolischen PPIasen ohne großen Aktivitätsverlust toleriert.

## 5. Die Proteinfamilie der Cyclophiline

Von den bisher bekannten 35 Proteinsequenzen, die homolog zu denen der Cyclophilinfamilie der PPIasen (Schema 1) sind, konnten viele bereits als Proteine isoliert, charakterisiert und in ihrer Enzymaktivität bestätigt werden. Tabelle 1 verdeutlicht dies und gibt weitere charakteristische Eigenschaften an.

Neben ihrer ausgeprägten Sequenzhomologie in einem mittleren, ca. 130 Aminosäuren umfassenden Kernbereich, verbindet alle eukariotischen Cyclophiline ihre ausgeprägte Affinität gegenüber Cyclosporin A (Inhibitionskonstante)  $K_i \ll 1 \mu\text{M}$  und zu vielen seiner Derivate. Prokaryotische Enzyme sind weniger bindungsfähig<sup>[104, 105, 115]</sup>, ein Befund, der aber nicht immer gültig ist<sup>[103, 116]</sup>.

Die in der Sequenz vollständig konservierten Aminosäuren sind über einen Kernbereich verteilt und in ihrer Mehrzahl im

Mensch18cy	1	10	20	30	40	50	60
Rind18cy	1	10	20	30	40	50	60
Ratt18cy	1	10	20	30	40	50	60
Maus18cy	1	10	20	30	40	50	60
Human	1	10	20	30	40	50	60
U-esc18cy	1	10	20	30	40	50	60
B-napus18	1	10	20	30	40	50	60
Z-mays18	1	10	20	30	40	50	60
P-vulgatis18cy	1	10	20	30	40	50	60
A-thaliana18	1	10	20	30	40	50	60
D-melanog18cy	1	10	20	30	40	50	60
D-discoid18cy	1	10	20	30	40	50	60
C-albicans18cy	1	10	20	30	40	50	60
S-pombe17	1	10	20	30	40	50	60
S.cerevis17cy	1	10	20	30	40	50	60
E.granulosus17	1	10	20	30	40	50	60
S-japonicum20	1	10	20	30	40	50	60
N-crassa240nm	1	10	20	30	40	50	60
D-melanog240nm	1	10	20	30	40	50	60
Huhn24sec	1	10	20	30	40	50	60
Mensch24sec	1	10	20	30	40	50	60
Mensch23sec	1	10	20	30	40	50	60
Maus23sec	1	10	20	30	40	50	60
Ratt226sec	1	10	20	30	40	50	60
Maus22sec	1	10	20	30	40	50	60
Mensch22mito	1	10	20	30	40	50	60
Mensch41cy	1	10	20	30	40	50	60
Mensch159mem	1	10	20	30	40	50	60
S.cerevis120mito	1	10	20	30	40	50	60
S.cerevis123sec	1	10	20	30	40	50	60
S.cerevis136	1	10	20	30	40	50	60
S.chrysol18cy	1	10	20	30	40	50	60
Synechococcus15	1	10	20	30	40	50	60
E.coli118cy	1	10	20	30	40	50	60
E.coli121:petri	1	10	20	30	40	50	60

Schema 1. Erläuterungen auf S. 1487.

vierten Exon verankert<sup>[166]</sup>. Sie sollten infolge der relativ kurzen Polypeptidkette von Cyp18 etwas mit der Bildung des Katalyseentrums und der Aktivierung der katalytischen Prozesse zu tun haben. Für humanes Cyp18cy wurde die dreidimensionale Struktur durch NMR-Spektroskopie und durch eine Röntgenstrukturanalyse bis zu einer Auflösung von 1.63 Å ermittelt<sup>[18, 23, 24]</sup>. Die Struktur zeigt, daß die konservierten Aminosäuren über eine Furche längs eines Falblattbereichs angeordnet sind (Abb. 10). Der konservierte Bereich umfaßt dem-

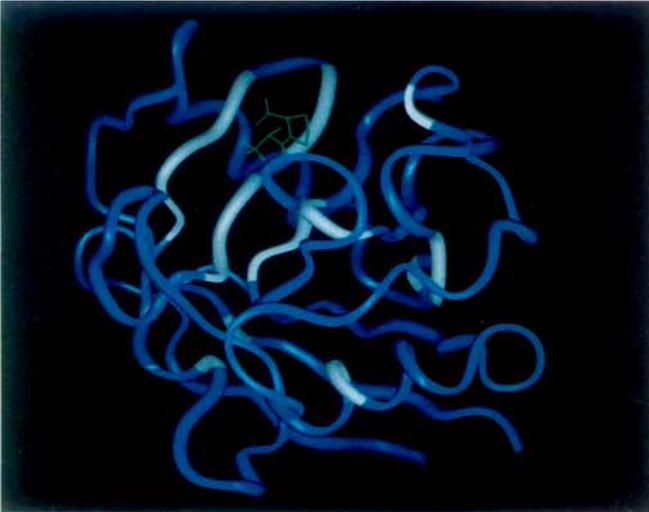


Abb. 10. Aus der Kristallstrukturanalyse [19] erhaltenes, dreidimensionales Modell von humanem, rekombinantem Cyp18cy in Gegenwart des Dipeptids Ala-Pro (grün eingezeichnete Struktur). Die Bereiche, die eine in der Cyclophilinfamilie hochkonservierte Aminosäure enthalten, sind weiß eingezeichnet.

nach ein ziemlich ausgedehntes Areal, dessen Ausmaße die der hypothetischen Substratbindungsstellen für kurzkettenoligopeptide übertreffen. Unter den bisher bekannten sechs Isoformen der menschlichen Cyclophiline ist das Cyp18cy besonders

◀ Schema 1. Aminosäuresequenzen der auf der Genebene bekannten Cyclophiline. Die Zahlen über den Sequenzen geben die Numerierung der Aminosäuren im humanen Cyp18cy an. Die fett gedruckten Buchstaben symbolisieren hochkonservierte Reste. Mensch Cyp18cy (human Cyclophilin A, human Cyclophilin 1) [69]; Rind (Schwein) Cyp18cy (bovine (pig) Cyclophilin A) [4, 5, 70]; Ratte Cyp18cy (rat Cyclophilin A) [71]; (die Sequenz von Hamster Cyp18cy ist zu 97.6% identisch [72]); Maus Cyp18cy (mouse Cyclophilin A) [73]; Huhn Cyp (Teilsequenz) [74]; *L. esculentum* Cyp18cy (Tomate) [75]; *B. napus* Cyp18 (Raps) [75]; *Z. mays* Cyp18 (Mais) [75]; *P. vulgaris* Cyp18cy (Bohne) [76]; *A. thaliana* Cyp18 [77]; *D. melanogaster* Cyp18cy (Fruchtfliege) [78]; *D. discoideum* Cyp18 (Schleimpilz) [79]; *C. albicans* Cyp18cy (Hefe) [80]; *S. pombe* cyp18 (Hefe) [81]; *S. cerevisiae* Cyp17cy (yeast Cyclophilin A) (Hefe) [82, 83]; *E. granulosus* Cyp17 (Bandwurm) [84]; *S. japonicum* Cyp20 [85]; *N. crassa* Cyp24mito [86, 87]; *D. melanogaster* Cyp26mem (ninaA) (Fruchtfliege) [88, 89]; Huhn Cyp22sec (S-Cyclophilin) [74]; Mensch Cyp41cy (Cyp-40, ERB-Cyclophilin) [90, 91]; Mensch Cyp24sec (secreted cyclophilin-like Protein, SCLP) [92]; Mensch Cyp23sec (human Cyclophilin B, Cyclophilin 2) [93]; Ratte Cyp26sec (CyLP; rat Cyclophilin B) [94] (die Sequenz in [94] enthält wahrscheinlich einen Fehler im Leseraster, der in [95] korrigiert wurde; die korrigierte Sequenz ist hier angegeben. Möglicherweise führt eine weitere Insertion einer Base zu einem Stoppcodon an der Aminosäure <sup>298</sup>Glu [96]); Mensch Cyp22mito (human Cyclophilin 3) [97]; Mensch Cyp158mem (NK-TR protein) [98]; Maus Cyp22sec (mouse Cyclophilin 2) [95]; Maus Cyp23sec (mouse Cyclophilin C) [8]; *S. cerevisiae* Cyp20mito (yeast Cyclophilin 3) (Hefe) [99, 100]; *S. cerevisiae* Cyp23sec (yeast Cyclophilin B) [101]; *S. cerevisiae* Cyp36 (Sec3) [102]; *S. chrysomallus* Cyp18 [103]; *Synechococcus* sp. Cyp 15 [A. Kaplan, PIR CSYC42]; *E. coli* Cyp18cy (*E. coli* b) [104]; *E. coli* Cyp21peri (*E. coli* a) [104, 105]; ein offenes Leseraster in *Salmonella typhimurium* (GenBank M32355) ist nahezu identisch zu *E. coli* Cyp21peri.

verbreitet und gilt nach wie vor als das Rezeptorprotein für die immunsuppressive Wirkung von CsA.

Unter den Sequenzbereichen, die für die Lokalisierung der Proteine in der Zelle verantwortlich sind, fällt bei Cyp18cy das endständige CXXL als Signal für die posttranslationale Diglykosylierung auf. Dieses sonst hauptsächlich bei kleinen G-Proteinen vorkommende Motiv bewirkt eine regulierte Membranverankerung der Proteine<sup>[117]</sup>. Experimentelle Befunde zur posttranslationalen Modifizierung von Cyclophilinen fehlen gegenwärtig. Auch beim Zelladhäsionssignal -RGD-, das bei einigen sekretorischen Vertretern im Kernbereich der Sequenz vorkommt, ist die Lokalisierung in der dreidimensionalen Proteinstruktur unbekannt, und es fehlen auch biologische Hinweise für eine spezifische Funktion in den betreffenden Cyclophilinen.

Obwohl hochreine SäugerCyp18cy thermisch und chemisch recht stabile Enzyme sind (ihre enzymatische Aktivität bleibt in Pufferlösung bei 4 °C über Monate voll erhalten), genügt aufgrund des beachtlich hydrophoben Charakters bereits eine Plastikoberfläche, um das Protein zu denaturieren<sup>[118]</sup>. Cytosolische Enzyme vom Typ Cyp18cy kommen in den Organismen und in vielen Geweben und Zelltypen in hohen Konzentrationen vor; die quantitativen Angaben scheinen jedoch stark von der Bestimmungsmethode abzuhängen. Im Säugerorganismus ist Cyp18cy nicht lymphocytenspezifisch, ein Umstand, auf den die Nebenwirkungen bei Therapien mit CsA zurückgeführt werden<sup>[119]</sup>.

Nierentubuli und Endothelzellen enthalten ca. 10 µg Cyp18cy pro mg Gesamtprotein, während dieser Wert in T-Zellen mit 3.1–7.0 µg mg<sup>-1</sup> etwas unterschritten wird<sup>[120, 121]</sup>. Im Körpergewebe liegt die Konzentration bei ca. 1–3 µg pro mg Protein, wobei Haut- und Lungengewebe den geringsten und neuroneneiche Areale<sup>[122]</sup> des Gehirns den höchsten Gehalt aufweisen<sup>[121]</sup>. Es gibt eine große intraindividuelle Schwankungsbreite in den Konzentrationen und Lokalisierungen<sup>[123]</sup>, so daß in anderen Untersuchungen der Cyp18cy-Gehalt in Lymphknoten und Milz am höchsten ist<sup>[118]</sup>. Die erhöhte Konzentration in Tumorzellen<sup>[124]</sup> ist nicht bestätigt<sup>[121]</sup>. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der confokalen Fluoreszenzmikroskopie wurde in Thymocyten Cyp18cy nicht nur im Cytosol, sondern auch in der Kernmembran und in den äußeren Bereichen des Golgi-Apparats nachgewiesen. Ein zellspezifischer, für Leber und Niere drastischer Anstieg der Cyp18cy-Konzentrationen wird nach einer Behandlung mit CsA gefunden<sup>[118, 125]</sup>.

In unerwartet hohem Maße ist humanes Cyp41cy mit Cyp18cy in Mais verwandt (67.3% Identität); das wiederum ubiquitäre Vorkommen von Cyp41cy im Körpergewebe (Gehirn > Leber, Niere, Thymus, Milz) > Lunge weist auf eine spezielle Zellfunktion dieser PPLase im Säugergewebe hin<sup>[90, 108]</sup>. Diese Vermutung wird nachdrücklich durch den Befund bestätigt, daß dieses Enzym ein Bestandteil des oligomeren, nichtaktivierten Östrogenrezeptors ist<sup>[91]</sup>. Die lange C-terminale Extension am PPLase-homologen Kernbereich von Cyp41cy zeigt die Homologie zum C-Terminus von FKBP59, der PPLase-Komponenten des nichtaktivierten Progesteronrezeptors. Auch andere Komponenten der Steroidrezeptoren, die Streßproteine hsp90 und hsp70, gehören zu den auf die Faltung von Proteinen spezialisierten Moleküle, deren molekulare Wirkung für die Rezeptorfunktion noch unbekannt ist.

Diese Einschränkung gilt auch für das an der äußeren Membran von CD3<sup>-</sup>, CD16<sup>+</sup>-Granulocyten (natürliche Killerzellen)

befindliche Cyp158mem, das bei der Erkennung von Tumorzellen und für die Cytotoxizität der Killerzellen eine Rolle spielt. Die Aminosäuresequenz und auch Untersuchungen mit Antipeptid-Antikörpern lassen darauf schließen, daß der N-terminale PPIase-Teil des Moleküls extrazellulär an den Transmembransegmenten verankert ist und somit direkt am Kontakt der Zellen untereinander teilnehmen kann<sup>[98]</sup>.

*Drosophila* Cyp26mem, das gewebsspezifische ninaA-Protein der Augen von Fruchtfliegen, ist wahrscheinlich katalytisch an der Synthese, der Faltung, dem Transport und/oder der Stabilität des photoempfindlichen Rh1-Rh6-Rhodopsins beteiligt. Cyp26mem ist ein integrales Membranprotein mit einem Cyp18cy-homologen Sequenzkernbereich, der im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) angesiedelt ist<sup>[78, 88]</sup>. Schaltet man das Cyp26mem-Gen aus, sammelt sich nicht mehr funktionelles Opsin, die Vorstufe von Rhodopsin, im endoplasmatischen Retikulum so stark an, daß dieses zur ungehemmten Proliferation angeregt wird<sup>[126]</sup>. Eine Random-Mutagenese an den *Drosophila*-Fliegen führt zu Punktmutationen im Cyp26mem, wodurch Fliegen-Phänotypen mit einer gestörten Rhodopsinproduktion entstehen. Die nachfolgende Analyse zeigte, daß die betroffenen Aminosäuren im vermuteten Substratbindungsbereich des in seiner Raumstruktur bekannten, homologen Cyp18cy angesiedelt sind<sup>[127]</sup>.

Es gibt darüber hinaus eine Gruppe von Cyclophilinen, die sekretorische Proteine sind und entsprechende Extensionen in der Aminosäuresequenz aufweisen (siehe Schema 1 und Tabelle 1). Trotzdem eine N-terminale Signalsequenz, die für den Transport notwendig wäre, fehlt, kann selbst Cyp18cy, ähnlich wie bei IL-1 beobachtet, bei geeigneter Zellstimulierung durch die Zellmembran geschleust werden<sup>[128]</sup>. Sekretorische Cyclophiline können neben einer Signalsequenz auch das ER-Retentionssignal VEKPFAlKE am C-Terminus<sup>[96]</sup> enthalten. Ihr Transport aus der Zelle und ihre Neusynthese wird durch Wachstumsfaktoren stimuliert<sup>[129]</sup>. In Übereinstimmung mit diesen aus Sequenzdaten abgeleiteten Lokalisierungen wurden im Lumen des endoplasmatischen Retikulums hohe PPIase-Aktivitäten ermittelt<sup>[130]</sup>. Biologisch signifikant könnte die beobachtete Colokalisierung mit typischen Proteinen des endoplasmatischen Retikulums, z.B. den  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen wie Calreticulin, sein<sup>[96]</sup>. Die von C. M. Deber et al.<sup>[131]</sup> vertretene Hypothese, daß die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolylbindungen in Membrankanälen eine Funktion in dynamischen Prozessen hat, macht es nicht verwunderlich, daß durch Cyclosporin A blockierbare Transportproteine, z.B. in der inneren Membran der Mitochondrien, zu finden sind<sup>[132]</sup>. Untersucht man CsA-analoge Inhibitoren<sup>[133]</sup>, so stellt man fest, daß die Inhibitionskonstanten  $K_i$  für die Inaktivierung des Rattenhomologen von Cyp22mito proportional zu den  $\text{IC}_{50}$ -Werten für die Blockierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstroms durch eine Membranpore ist. Mit Hilfe CsA-resistenter Mutanten von *Neurospora crassa* mit einem genetischen Defekt für ein funktionsfähiges Cyp24mito gelang M. Tropschug et al. erstmals der Nachweis, daß nicht die Inhibierung der PPIase-Aktivität selbst den biologischen Effekt von CsA bewirkt, sondern daß der CsA-Cyp-Komplex cytotisch sein muß<sup>[187]</sup>.

Die Deletion des Cyp20mito-, Cyp17cy- und Cyp23sec-Gens in *Saccharomyces cerevisiae*, auch in Form einer Tripel-Mutante, beeinträchtigt die Lebensfähigkeit der Hefezellen nicht<sup>[99]</sup>. Setzt

man die Hefen aber Streßbedingungen aus, so kann man die Wirkung der Cyp-Deletionen erkennen. Cyp20mito ist essentiell für das Wachstum der Hefe auf L-Lactat bei 37 °C, die Cyp20mito-Mutante ist temperatursensitiv<sup>[100]</sup>. In Pflanzenzellen beweist eine Analyse durch die Northern-Technik den Anstieg der mRNA-Konzentration von Cyp18cy als Antwort auf Streßbedingungen<sup>[76]</sup>. Die Erhöhung der Transkription des Cyp17cy-Gens von *Saccharomyces cerevisiae* um mehr als das Zweifache bei einem Hitzeschock weist eine Parallele zu dem typischen Streß-70-Gen SSA1 auf. Der entsprechende Cyp-Promoter ist demnach hitzeinduzierbar. Eine Ausschaltung der Gene von Cyp17cy und Cyp23sec vermindert erheblich die Fähigkeit der Hefezellen, einen Hitzeschock zu überleben<sup>[134]</sup>.

## 5.1. Katalytische Eigenschaften

Enzymkinetische Parameter sind bisher nahezu ausschließlich für Reaktionen von Cyp18cy bestimmt worden (siehe Tabelle 1). Bei der Enzym-Substrat-Wechselwirkung sind für die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{cat}}/K_m$  (*cis* → *trans*) der bimolekularen Reaktion im günstigsten Fall bereits Werte nahe des diffusionsbestimmten Grenzwerts von  $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt worden<sup>[135]</sup>. Eine zuverlässige Methode zur Titration der Zahl der katalytisch aktiven Zentren liegt noch nicht vor; man kann sich jedoch mit einer durch die Zunahme der Trp-Fluoreszenzintensität gut verfolgbaren Titration unter Verwendung des kompetitiven Inhibitors CsA behelfen. Das Standardsubstrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilid wird mit rekombinantem humanem Cyp18cy mit Konstanten von  $K_m = 0.87 \text{ mM}$  (*cis*),  $k_{\text{cat}} = 12700 \text{ s}^{-1}$  (*cis*) bei 0 °C umgesetzt<sup>[51]</sup>. Diese Daten zeigen, daß zumindest die cytosolischen Cyclophiline perfekt evolvierte Enzyme in bezug auf ihre katalytische Funktion sind. Bedingt durch die hohen  $k_{\text{cat}}$ -Werte wird trotz der ohnehin schon schnellen unkatalysierten Isomerisierung ( $k_u$ ) noch ein beträchtlicher Beschleunigungsfaktor  $k_{\text{cat}}/k_u$  von ca.  $10^6$  erreicht.

Die Spezifität von Cyp18cy für Nebenbindungsstellen (Nomenklatur der Nebenbindungsstellen analog derjenigen von Proteasen<sup>[264]</sup>; isomerisierbare Bindung zwischen der  $P_1$ - und der  $P_1'$ -Position) ist bisher nur für die Aminosäuren Xaa und Yaa in Suc-Ala-Xaa-Pro-Yaa-4-nitroanilid einigermaßen aufgeklärt. Vergleicht man das beste mit dem schlechtesten Peptidsubstrat für ungeladene und geladene Seitenketten Xaa, so unterscheiden sich die Werte für das Verhältnis  $k_{\text{cat}}/K_m$  um weniger als das Zwanzigfache<sup>[97, 115, 162, 163]</sup>. In bezug auf Yaa sind die Differenzen etwas geringer, und für die  $P_1$ -Position haben die Werte für  $k_{\text{cat}}$  eine etwas größere Variationsbreite als für  $k_{\text{cat}}/K_m$ <sup>[266]</sup>. Der Succinylrest im Standardsubstrat kann, ohne daß sich die Konstante  $k_{\text{cat}}/K_m$  verändert, durch Glutaryl ersetzt oder mit minimalen Auswirkungen ganz entfernt werden. Auch die  $P_2$ -Position hat noch Auswirkungen auf die Spezifitätskonstante<sup>[97]</sup>.

Bisher konnten nur die dreidimensionalen Strukturen von Substrat-Cyp18cy-Komplexen aufgeklärt werden<sup>[18, 19, 23]</sup>. Für das Dipeptid Ala-Pro und ein Tetrapeptid-Substrat, dessen *cis/trans*-Isomerisierung gut katalysiert werden kann, ist jeweils nur das *cis*-Isomer (Winkel an der Peptidbindung  $\omega = -3^\circ \text{C}$ ) als gebundene Vorzugskonformation nachweisbar. Bei der Bindung des Dipeptids an das Enzym ändert sich die Enzymkonforma-

tion im Vergleich zu der in freiem Cyp18cy nicht merklich. Da Ala-Pro aber keine Substrat-, sondern nur schwache Inhibitoreigenschaften aufweist, kann die Komplexbildung mit längeren Polypeptidketten doch noch zu einem größeren Ligandeneinfluß auf die Enzymstruktur führen. Unsere kinetischen Untersuchungen an humanem Calcitonin<sup>1-32</sup> belegen, daß die Komplexbildung mit Cyp18cy regiospezifisch verläuft. Die Isomerisierung von mittelständigen Phe-<sup>23</sup>Pro-Bindungen wird sehr gut katalysiert, die von der endständigen Ala-<sup>32</sup>ProNH<sub>2</sub>-Gruppe ist jedoch nicht beschleunigbar<sup>[58]</sup>.

Einige langsame Prozesse bei Proteinfaltungsreaktionen sind durch Cyclophiline katalysierbar<sup>[62, 64-66]</sup>, wodurch man sie zweifelsfrei als *cis/trans*-Isomerisierungen identifizieren kann. Während der Rückfaltung eines Proteins wirken PPIasen eindeutig als Katalysatoren, denn die Faltung hängt nicht – wie in der Regel bei Chaperonen – von der Zugabe des Faltungshelfers in stöchiometrischen Mengen oder vom Zusatz weiterer niedermolekularer Hilfsstoffe ab<sup>[137]</sup>. Im speziellen Fall der rekombinanten Kohlendensäureanhydrase wurde unter Rückfaltungsbedingungen bei der Einwirkung von Cyp18cy (Schwein) sowohl eine Faltungsbeschleunigung als auch eine Erhöhung der Faltungsausbeute beobachtet<sup>[138]</sup>. Da der Ausbeuteeffekt unabhängig von der Enzymkatalyse zu sein scheint, wird dieser PPIase eine zusätzliche Chaperonwirkung zugeschrieben. Signifikante Erhöhungen der Rückfaltungsausbeute kommen auch unspezifisch durch die Schutzwirkung von stöchiometrischen Mengen an Fremdprotein vor<sup>[265]</sup>. Die katalytischen Effekte durch PPIasen sind stets durch CsA blockierbar, während das ähnlich hydrophobe, aber nicht inhibitorisch wirkende Cyclosporin H die Katalyse von Rückfaltungsprozessen nicht beeinflusst.

Wie bei der Katalyse von *cis/trans*-Isomerisierungen durch PPIasen, die mit einer isomerspezifischen Proteolyse verknüpft sind (siehe Abschnitt 4), ist bei der PPIase-katalysierten Rückfaltung von Proteinen die *cis* → *trans*- oder die *trans* → *cis*-Isomerisierung an eine irreversible Reaktion gekoppelt, und zwar an die unter nativen Bedingungen quasi-irreversible Bildung einer dreidimensionalen Proteinstruktur. Es ließ sich experimentell bereits nachweisen, daß während der Proteinfaltung beide Isomerisierungsrichtungen katalysiert werden können<sup>[62, 139]</sup>. Die katalytische Effizienz von Cyclophilinen ist unter den Bedingungen  $[S] \ll K_m$  bei makromolekularen Substraten wenigstens zehnfach geringer als bei kurzkettigen Substraten. Dies ist sicherlich auch durch die verlängerten Diffusionszeiten bei großen Molekülen bedingt.

Die kinetische Analyse der PPIase-katalysierten Rückfaltung von Proteinen über den qualitativen Befund hinaus, daß die Reaktion beschleunigt wird, gestaltet sich infolge der vielen strukturell nicht charakterisierten Substratzustände sehr kompliziert. Bei der bisher am besten untersuchten Rückfaltung, die der entfalteten RNase T1<sup>[25]</sup>, ist die *trans*-Tyr-<sup>39</sup>Pro-Einheit, anders als *trans*-Ser-<sup>55</sup>Pro, für den Katalysator aus sterischen Gründen unzugänglich. Die aus dieser Unzugänglichkeit resultierende Bildung von intermediären Strukturen, die bereits die *cis*-Ser-<sup>55</sup>-Pro-Einheit der nativen Struktur enthalten, ist keine Eigenschaft der vollständig entfalteten Kette, sondern entwickelt sich erst im Laufe der Frühphase des Rückfaltungsprozesses. Die frühzeitige Bildung von nativen Strukturelementen mag auch der Grund sein, warum manche Reaktionsschritte, an denen *cis/trans*-Isomerisierungen beteiligt sind, bei der Rückfal-

lung von Proteinen durch Cyp18cy nicht katalysiert werden können<sup>[67]</sup>. Setzt man bei der Rückfaltung dieses Modellproteins cytosolische Cyclophiline aus unterschiedlichen Organismen ein, findet man einen Zusammenhang zwischen der katalytischen Aktivität all dieser Enzyme gegenüber einem Tetrapeptid-Substrat und den zwei langsamen, beschleunigbaren Prozessen bei der Bildung der nativen Struktur von RNase T1<sup>[16]</sup>. Bis auf *E. coli* Cyp18cy, das die sehr langsame *cis*-Tyr-<sup>39</sup>Pro-Isomerisierung vergleichsweise gut katalysiert, erkennen fünf andere, phylogenetisch wenig verwandte Cyclophiline die Nebenbindungsstellen der RNase-T1-Polypeptidkette gleich gut und haben vergleichbare sterische Anforderung an das Substrat. Dieses Ergebnis ist als evolutionäre Konservierung der katalysierten Proteinfaltung interpretiert worden.

Für Modelle zur De-novo-Bildung der Proteine in der Zelle ist es wichtig zu wissen, daß die oxidative Rückfaltung von reduzierter RNase T1 (zwei Disulfidbrücken im nativen Zustand) in Gegenwart der beiden Faltungsenzyme Protein-disulfid-isomerase und *E. coli* Cyp18cy synergistisch beschleunigt wird<sup>[140]</sup>. Aus Gründen der mikroskopischen Reversibilität zu fordern, aber experimentell nicht leicht zu untersuchen, ist die durch PPIasen katalysierte Proteinfaltung. Dies gelang Mücke und Schmid, jedoch mit reduzierter und *S*-carboxymethylierter RNase T1, da dieses Protein bereits durch einen Konzentrationsprung von einer 0.2 zu einer 3 M NaCl-Lösung entfaltet werden kann. Die überraschend einfache Kinetik des Entfaltungsprozesses zeigt eine nichtlineare von der *E. coli*-Cyp18cy-Konzentration abhängige katalytische Beschleunigung<sup>[63]</sup>.

Die unter physiologischen Aspekten äußerst interessante Katalyse der Isomerenumwandlung in nativen Proteinen wurde bisher kaum untersucht. Bekannt ist, daß 50 µM Cyp18cy (Schwein) keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung an der Gly-<sup>43</sup>Pro-Bindung von nativem Calbindin D<sub>9k</sub> hat<sup>[61]</sup>.

Quantitativ interpretierbare Daten, die von katalysierten In-vivo-Faltungsprozessen erhalten wurden, stehen noch weitgehend aus. Neben den positiven, qualitativen Befunden einer durch CsA bewirkten Verzögerung des Aufbaus der dreidimensionalen Struktur von Transferrin im endoplasmatischen Retikulum<sup>[141]</sup>, der etwas verbesserten Proteinausbeute in Coexpressionsexperimenten<sup>[142]</sup> und der Wirkung von Gendeleitionen<sup>[143]</sup> liegt als einziger bekannter, kinetischer Wert der Faktor 1.4 für die durch CsA verlangsamte Geschwindigkeit der Tripelhelixbildung im Procollagen von Fibroblasten vor<sup>[144]</sup>. Auch hier wird als Sonde die Inhibierung der PPIase-Aktivität durch CsA verwendet. Der relativ geringe kinetische Effekt bedingt trotzdem eine beträchtlich veränderte Zusammensetzung des Reaktionsprodukts, weil die posttranslationalen Modifikationen auf die durch die Enzyminhibierung veränderte Zeitdauer der Faltung stark ansprechen.

## 5.2. Inhibitoren

Alle Cyclophiline binden CsA mit Assoziationskonstanten im Bereich von nM bis einige µM (Tabelle 1). Ihre Enzymaktivität wird kompetitiv inhibiert; ein Befund, der aber bisher nur für das sehr gut inhibierbare humane Cyp18cy verifiziert wurde. Vergleicht man die Literaturdaten zur CsA-Cyp18cy-Wechsel-

wirkung, so fällt auf, daß sich die gemessenen Bindungskonstanten um mehr als den Faktor 100 unterscheiden. Dies deutet auf die Abhängigkeit der Assoziationskonstanten von der Proteinkonzentration hin, die entweder in der Oligomerisierung von freiem Cyp18cy oder in der bereits im Kristallverband nachgewiesenen Bildung eines decameren Komplexes<sup>[145]</sup> zu suchen ist.

Die Spezifität der Bindung und der Inhibierung wird durch die minimale Affinität von D-<sup>11</sup>MeVal-Cyclosporin (CsH) zu Cyclophilinen dokumentiert. Weitere Basisstrukturen von reversiblen Cyclophilinhibitoren sind gegenwärtig nicht bekannt. Eine Vielzahl geprüfter prolinhaltiger Oligopeptide, die sich als kompetitive Substrate anbieten, hemmen die Testreaktion mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilid nicht gravierend, wenn man beide Komponenten in Konzentrationen kleiner 1 mM einsetzt<sup>[146]</sup>.

Unter pharmakologischen Gesichtspunkten sehr interessant ist der Befund von D. Rich et al., daß die Bindung von CsA an Cyp18cy relativ langsam und unter den Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung ist sowie in (mindestens) zwei kinetisch relevante Prozesse aufgeteilt werden kann. Zudem hängen Parameter für die Bindung an das Enzym von der Art des Lösungsmittels ab, in dem Cyclosporin A vor dem Reaktionsbeginn gelöst wurde<sup>[51, 147, 148]</sup>. Die Zeitabhängigkeit der Inhibitionskonstanten (mit einer scheinbaren Halbwertszeit von 29 s für die mittlere Reaktionsphase) zeigt sich in den veränderten Werten:  $K_i = 61 \text{ nM}$  wurde unmittelbar nach Zugabe von CsA zu Cyp18cy bestimmt,  $K_i = 2.5 \text{ nM}$  nach 30 min Reaktionszeit (Abb. 11). Auch die Reaktion mit der reifen Form von Cyp22mito (Ratte) weist mehrere unterschiedlich schnelle Teilschritte auf. Die Halbwertszeit ist hier deutlich länger und liefert den Hinweis auf eine enzymabhängige Konformationsänderung bei der Bildung der stabileren CsA-CsA-Komplexe.

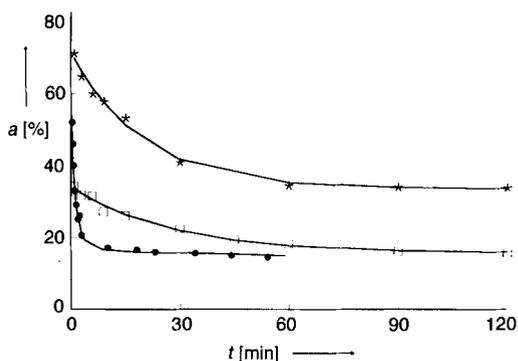


Abb. 11. Zeitabhängigkeit der Restaktivität  $a$  [%] bei der Reaktion von CsA (●) mit Cyp18cy sowie FK506 (\*) bzw. Rapamycin (□) mit FKBP12cy bei 10 °C bzw. 15 °C (Rapamycin). CsA (10 nM im Ansatz) und Cyp18cy (1.5 nM); FK506 (26 nM im Ansatz); Rapamycin (34 nM im Ansatz), FKBP12 jeweils 40 nM. Alle Stammlösungen der Effektoren in EtOH/H<sub>2</sub>O 50/50 Vol.-% [263].

Die Ursache dieses „Gedächtnisses“ von CsA für seine Vorgeschichte ist hauptsächlich in der konformativen Heterogenität von CsA in Lösung zu suchen<sup>[149]</sup>. Das inhibitorisch wirksame CsA mit *trans*-Konformation an der <sup>9</sup>MeLeu-<sup>10</sup>MeLeu-Bindung<sup>[21, 150]</sup> liegt in manchen Lösungsmitteln in geringen Konzentrationen (Tetrahydrofuran), in anderen fast zu 100% vor (Tetrahydrofuran/LiCl<sup>[151]</sup>), so daß von dieser Konzentration der  $K_i$ -Wert zu Beginn der Reaktion, der sich aus der gesamten eingesetzten CsA-Menge errechnet, abhängt. CsA scheint aber

kein Suizidinhibitor zu sein, da nach den bisherigen Erkenntnissen Cyp18cy die *cis* → *trans*-Konformationsänderung in CsA nicht katalysiert. Manche CsA-Derivate erreichen erst nach Stunden die Einstellung des endgültigen Gleichgewichts, in dem der Ligand optimal an sein Wirtspolypeptid adaptiert ist. Verwendet man Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel, verlangsamt sich die Einstellung des Gleichgewichts noch mehr. Trotzdem erhält man selbst unter diesen für quantitative Aussagen ungünstigen Umständen eine für 96 CsA-Derivate näherungsweise lineare Abhängigkeit zwischen der Bindung der Derivate an Cyp18cy (Rind) und der Fähigkeit zur Unterdrückung der T-Zell-Proliferation<sup>[152]</sup>. Zwei Derivate (off diagonal analogues<sup>[153]</sup>) zeigten allerdings besonders große Abweichungen von dieser Korrelation, so daß ernste Zweifel am unmittelbaren Zusammenhang zwischen der Inhibierung der katalytischen Wirkung von Cyp18cy und der Immunsuppression durch CsA-Derivate aufkamen. <sup>6</sup>MeAla-CsA inhibiert die Katalyse vorzüglich ( $K_i = 9 \text{ nM}$ <sup>[154]</sup>) und zeigt trotz der an sich minimal veränderten Struktur gegenüber der von CsA nur 1% von dessen immunsuppressiver Wirkung<sup>[155]</sup>. Dagegen bringt <sup>1</sup>MeBm<sub>2</sub>t-Cyclosporin bei schlechter Bindung ( $K_i = 2240 \text{ nM}$ ; Cyp18cy (Rind)<sup>[153]</sup>) noch 12% der immunsuppressiven CsA-Wirkung auf die Aktivierung des IL-2-Transkriptionsfaktors NF-AT zustande<sup>[154, 156]</sup>.

Makromolekulare CsA-Derivate, hergestellt aus Aminodextran (Molmasse ca. 70 kDa) oder Serumalbumin durch kovalente Verknüpfung von CsA über die Seitenkette des (4*R*)-4-[*trans*-Butenyl]4,*N*-dimethyl-L-threonin-Rests, inhibieren Cyp18cy nur etwa zehnmal schlechter als CsA. Mit diesen CsA-Derivaten kann die IL-2-Ausschüttung in EL-4-Lymphocyten mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 60 nM gehemmt werden (ca. 4% der CsA-Aktivität unter gleichen Bedingungen). Sogar die Kupplung des Aminodextran-CsA-Derivats an Agaroseperlen verhindert, vorausgesetzt der Kontakt der Zelloberfläche mit den Perlen wird hergestellt, nicht die immunsuppressive Wirkung<sup>[157]</sup>. Dies spricht für einen (zusätzlichen?) Rezeptor für Cyclosporin A auf der Oberfläche von T-Zellen. Mit dem gegenwärtig diskutierten Modell für die Wirkung von CsA (siehe Abschnitt 9) ist übrigens auch eine Eigenschaft von <sup>6</sup>MeAla-CsA unvereinbar – dieses Derivat ist in Phorbolster/Ionomycin-aktivierten T-Zell-Proliferationstest kein CsA-Antagonist<sup>[153]</sup>.

Die dreidimensionale Struktur des humanen CsA-Cyp18cy-Komplexes wurde durch NMR-Spektroskopie<sup>[158]</sup> und Röntgenstrukturanalyse<sup>[145]</sup> aufgeklärt. Die Struktur von Cyp18cy wird durch die Komplexbildung kaum beeinflusst<sup>[24, 159]</sup>, während CsA seine Konformation im Komplex gegenüber der in unpolaren, nichtwäßrigen Lösungen<sup>[160]</sup> oder der im Kristallverband<sup>[161]</sup> drastisch ändert; beispielsweise sind im Komplex keine intramolekularen Wasserstoffbrückenverbindungen mehr vorhanden. Die CsA-Reste 1–3 und 9–11 (siehe Abb. 5) stellen den Kontakt zur Cyclophilinoberfläche her, das den Liganden in einer hydrophoben Tasche, die aus den Seitenketten der Aminosäuren <sup>121</sup>Trp, <sup>60</sup>Phe, <sup>57</sup>Ile, <sup>122</sup>Leu, <sup>113</sup>Phe, <sup>126</sup>His, <sup>101</sup>Ala, <sup>103</sup>Ala und <sup>73</sup>Thr aufgebaut ist, bindet. Wie aus der Intensitätszunahme der Fluoreszenz bei der Komplexbildung und aus Mutageneseexperimenten<sup>[163, 164]</sup> schon vorher bekannt war, ist die Aminosäure <sup>121</sup>Trp eine entscheidende Determinante für eine besonders feste Bindung von CsA an das Cyclophilin.

Die Bindungsregion selbst besteht aus vier antiparallel angeordneten Einheiten mit Faltblattstruktur und ist identisch mit



nosäuren aber ebenfalls gemeinsam in einer Furche im Bereich der Bindungsstelle von FK506 angeordnet (Abb. 12).

Die Stabilität von humanem FKBP12 ist beträchtlich ( $T_m \approx 68^\circ\text{C}$ ) und im Komplex mit Peptidomakroliden<sup>[198]</sup> noch ausgeprägter; es läßt sich nach der durch Harnstoff vermittelten Entfaltung ( $c_m \approx 4.3\text{ M}$ ), im Gegensatz zu Cyclophilinen, auch wieder bis zur vollen Enzymaktivität in die native Form zurückfallen<sup>[199]</sup>.

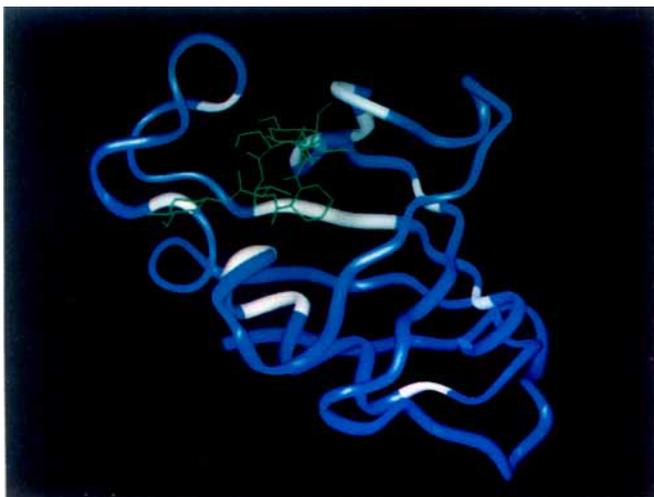


Abb. 12. Dreidimensionales Modell des FK506-FKBP12-Komplexes [20]. Das FK506-Molekül ist grün eingezeichnet, hochkonservierte Aminosäuren in FKBP-Sequenzen sind durch die weißen Bereiche symbolisiert.

Wie Cyclophiline sind FKBP12cy in humanem Gewebe weit verbreitet und weisen besonders hohe Konzentrationen in einigen Hirnregionen auf<sup>[200]</sup>. Die Konzentration von FKBP12cy im Cytosol von Lymphocyten-Zellen ist für ein Enzym außergewöhnlich hoch ( $c \approx 20\ \mu\text{M}$ <sup>[197, 201]</sup>). Die subzelluläre Verteilung ist jedoch nicht stabil, sondern vom Funktionszustand der Zelle abhängig, wobei, analog zu Cyp18cy, dem Zellkern nahe Bereiche bevorzugt werden<sup>[202]</sup>. Eine weitere unerwartete Gemeinsamkeit zwischen Cyp18cy und FKBP12cy ist ihre chemotaktische Aktivität gegenüber Neutrophilen, die für FKBP12cy bis weit unterhalb des nanomolaren Bereichs nachweisbar ist<sup>[203]</sup>. CsA und FK506, nicht aber die PPIase-Inhibitoren <sup>6</sup>MeAla-CsA und Rapamycin, blockieren die chemotaktische Aktivität ihrer jeweiligen Bindungspartner und weisen damit auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signaltransduktion als eigentlichen Ort der biologischen Wirkung hin. Mit dem Ergebnis, daß FKBP12cy extrazellulär wirksam ist, harmoniert der Befund, der eine das Hepatocytenwachstum stimulierende Aktivität in einer Dosis von  $1\ \mu\text{g}$  pro kg Gewebe bei der Leberperfusion beschreibt<sup>[204]</sup>. Die Inhibierung der chemotaktischen Wirkung der PPIasen wird alternativ zum IL-2-Modell auch zur Erklärung der Immunsuppression durch CsA und FK506 herangezogen<sup>[205]</sup>.

Das Hefeanalogon von FKBP12cy wird durch ein nicht-essentielles Gen codiert, dessen Eliminierung oder bereits schon der Tyr89Asp-Austausch im Enzym<sup>[206]</sup> die fungizide Wirkung von Rapamycin aufhebt<sup>[168, 170, 207]</sup>. Im Wildtyp der Hefe blockiert Rapamycin das Wachstum durch die irreversible Fixierung der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. FK506 wirkt gegen-

über Rapamycin antagonistisch. Wahrscheinlich inhibiert der Rapamycin-FKBP12cy-Komplex eine Phosphatidylinositol-3-kinase<sup>[171, 208]</sup>.

Wie auch für das zweite in *Saccharomyces cerevisiae* (FKBP14mem) gefundene FKBP übersteigt die katalytische Aktivität diese Hefe-PPIasen die der übrigen FKBP um fast das 100fache (Tabelle 2). Die Signalsequenz von FKBP14mem dirigiert dieses Enzym vorwiegend in die mikrosomalen Fraktionen<sup>[180]</sup>. Auch hier prägt die Deletion des Gens unter den Hefezellen bei Normalbedingungen keinen Phänotyp aus. Läßt man jedoch durch eine Tunicamycinbehandlung den Gehalt an unglycosylierten, ungefalteten Precursorproteinen im endoplasmatischen Reticulum ansteigen, wird FKBP14mem verstärkt exprimiert<sup>[209]</sup>.

Das verwandte humane FKBP16sec ist das hauptsächlich vorkommende FKBP in Mastzellen<sup>[210]</sup> und als ein FKBP16-Homologes, das der Blattzellen von Pflanzen<sup>[110]</sup>. In Jurkat-Zellen macht es aber nur ca. 2% der FKBP12cy-Menge aus<sup>[173]</sup>. Besonders interessant erscheint FKBP25, weil es ein eindeutiges Lokalisierungssignal für den Zellkern trägt und DNA-Bindungseigenschaften über ein Helix-Turn-Helix-Motiv aufweist<sup>[174, 177, 211]</sup>.

Ein weiterer Berührungspunkt mit der Biochemie der Cyclophiline ergibt sich aus der für beide Familien nachweisbaren Beteiligung am Aufbau der Steroidrezeptoren. Als integraler Bestandteil des heterooligomeren, nichtaktivierten Glucocorticoidrezeptors (ca. 300 kDa) ist ein Hitzeschockprotein (52 kDa) mit zwei Homologiebereichen in bezug auf FKBP nachweisbar<sup>[194]</sup>. Der N-terminalen Domäne mit einer 49proz. Identität gegenüber humanem FKBP12cy ist eine weitere FKBP-ähnliche Domäne, deren Funktion nicht ganz geklärt ist, sowie eine Calmodulin-bindende Region angeheftet<sup>[212]</sup>. Das im nativen Zustand wahrscheinlich dimere, am Cytoskelett lokalisierte FKBP52 bindet an das für FK506 verwendete Säulenmaterial bei der Affinitätschromatographie<sup>[193]</sup>. Es ist PPIase-aktiv und wird durch Peptidomakrolide inhibiert<sup>[213]</sup>. Nach anfänglich vergeblichen Versuchen konnte eine beträchtliche Wirkung von FK506 auf die eigentliche Funktion des Rezeptors, nämlich die Erhöhung der Transkriptionsgeschwindigkeit spezifischer Gene, beobachtet werden. Man muß dazu bei einer verminderten Steroidinduktion arbeiten, um den Einfluß prüfen zu können<sup>[214]</sup>.

Im C-terminalen Bereich ist FKBP52 zu 34% identisch mit der entsprechenden 140 Aminosäuren umfassenden Region von Cyp41cy, der PPIase-Komponente des nichtaktivierten Östrogenrezeptors<sup>[90, 91]</sup>.

Pathogene Bakterien scheinen besonders dafür prädestiniert, membranständige FKBP auszuprägen (siehe Schema 2<sup>[215]</sup>). *Legionella pneumophila*, der Erreger der Legionärskrankheit, ist ein intrazellulär phagocytierender Parasit von Lungenmakrophagen und Monocyten<sup>[216]</sup>. Das Mip-Protein (FKBP25mem) gilt als Pathogenitätsfaktor an der Oberfläche der *Legionellen* (ca. 100fache Reduktion in FKBP25mem-negativen Mutanten<sup>[217]</sup>). Für die N-terminale Extension am FKBP-homologen Kern des reifen Proteins kann man beträchtliche helikale Anteile vorhersagen, die zur Membranverankerung beitragen könnten. Die PPIase-Aktivität läßt sich mit FK506 inhibieren<sup>[185]</sup>, und das aktive Enzym liegt wahrscheinlich als Dimer vor<sup>[218]</sup>. Die Infektiosität des Bakteriums wird durch FK506 reduziert. Die Angriffspunkte von FKBP auf molekularer Ebene während der

Pathogenese lassen sich allerdings noch nicht schlüssig lokalisieren<sup>[215]</sup>.

### 6.1. Katalytische Eigenschaften

Die katalytisch aktive Konzentration von FKBP wird bisher durch die Titration mit FK506 oder mit Rapamycin anhand der Intensitätsabnahme der Proteinfluoreszenz<sup>[219]</sup> oder durch die Austitration der Aktivität bei hohen Inhibitorkonzentrationen näherungsweise ermittelt. Im Gegensatz zu den Cyclophilinen haben FKBP eine ausgeprägte Spezifität gegenüber der Aminosäure in P<sub>1</sub>-Position der Substratkette<sup>[162, 180, 185, 190]</sup>. Besonders hohe  $k_{\text{cat}}/K_m$ -Werte liefern Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten in dieser Position, während Glycin und geladene Aminosäuren zu kaum katalysierbaren Peptiden führen. Man kann sogar einen linearen Zusammenhang zwischen dem  $k_{\text{cat}}/K_m$ -Wert (humanes FKBP12cy) und dem hydrophoben Kapazitätsfaktor  $R'$  der Aminosäureseitenkette herstellen<sup>[146]</sup>. Eine solche Spezifitätsverteilung macht biologisch nur dann Sinn, wenn der Zelle, ähnlich wie im Falle der Proteasen, verschiedene Enzyme mit unterschiedlicher Spezifität für die Nebenbindungsstellen zur Verfügung stehen. Dafür gibt es bei den FKBP bisher noch keine Anzeichen, da alle bisher untersuchten Enzyme ein ziemlich gleichförmiges Katalysemuster zeigen (Abb. 13). Im

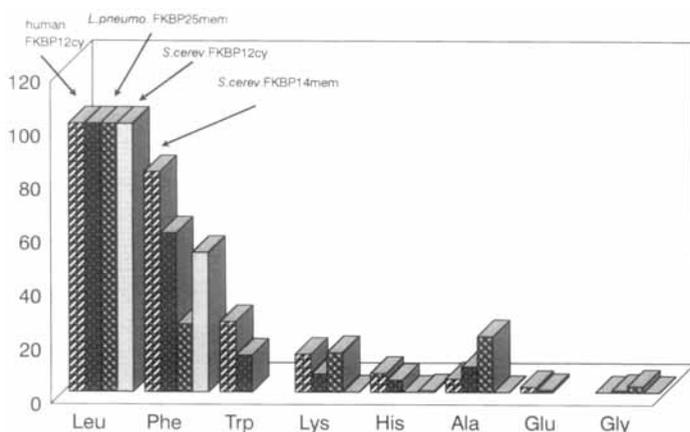


Abb. 13. Relative Substratspezifität  $k_{\text{cat}}/K_m$  [%] (auf der Ordinate aufgetragen) verschiedener FKBP's für Substrate des Typs Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-nitroanilid mit Xaa = Leu (100%)<sup>[162, 180, 185]</sup>.

optimalen Substrat Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-4-nitroanilid für FKBP12cy ist der gegenüber Cyp18cy etwa um den Faktor 10 niedrigere  $k_{\text{cat}}/K_m$ -Wert auf die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  [ $597 \text{ s}^{-1}$ ] und weniger auf die Konstante  $K_m$  zurückzuführen<sup>[220]</sup>.

Trotz einer verminderten Effektivität gegenüber Cyclophilinen können auch FKBP die Faltung von Proteinen katalysieren<sup>[182]</sup>, obwohl bisher sehr wenige Daten dazu vorliegen.

### 6.2. Inhibitoren

Rapamycin und FK506 binden immer stöchiometrisch (1:1 bei humanem FKBP12cy) und teilweise außerordentlich fest an FKBP, wobei sie deren PPIase-Aktivität reversibel inhibieren (Tabelle 2). Die Geschwindigkeit der Inhibition ist zeitabhän-

gig, und somit der Verlauf dieser Reaktion mit der CsA-Cyp-Komplexbildung vergleichbar (siehe Abb. 11). Als Ursache für den langsamen, nach einer Reaktion 1. Ordnung auswertbaren Prozeß, ist die Nachbildung des *trans*-Isomers des Inhibitors wahrscheinlich. Obgleich die immunsuppressiven Wirkungen von Rapamycin und von FK506 sich grundlegend unterscheiden, d. h. das Vorliegen eines gesonderten Rezeptors nahelegen, ist in Jurkat-Zellen ein spezifisch Rapamycin-bindendes Protein bisher nicht nachgewiesen worden<sup>[222]</sup>. Auch bei Rapamycin lassen sich Inhibition der PPIase-Aktivität und die rapamycin-spezifische Immunsuppression voneinander trennen<sup>[223]</sup>.

In einem durch eine Bis(carbamoyl)-4-xylylendiamin-Brücke über das C40-Atom von FK506 verbundenen FK506-Dimer (FK1012) haben beide FK506-Dimerhälften eine hohe Affinität gegenüber FKBP ( $K_1^1 = 0.06$ ,  $K_1^2 = 0.76 \text{ nM}$ ). Auf diese Weise können chimäre Proteine, bestehend aus einem FKBP-Teil und einem Effektor-Teil, in situ dimerisieren und dadurch von einer Oligomerisierung abhängige Signalkaskaden gestartet werden. Die Abschaltung gelingt durch Zugabe von monomerem FK506<sup>[224]</sup>.

Die Bildungsenthalpie für diese Komplexe und andere thermodynamische Daten sprechen für eine dominierende Beteiligung von hydrophoben Wechselwirkungen bei der Komplexbildung<sup>[225]</sup>. Das läßt sich auch aus der Struktur des FK506-FKBP-Komplexes ableiten, da alle Aminosäuren im Nahbereich des FK506-Reaktionszentrums hydrophobe Seitenketten aufweisen (Abb. 14).

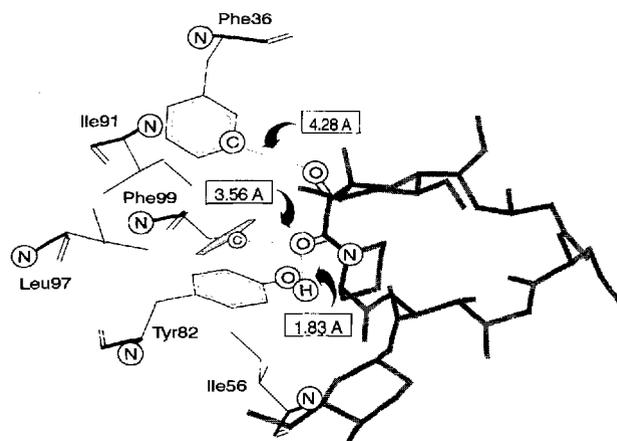


Abb. 14. Alle Aminosäuren, die im Umkreis von 5.5 Å um die Peptidcarbonylgruppe von FK506 (mit fetten grauen Linien dargestellter Molekülteil) im FK506-FKBP12-Komplex [20] ein Atom lokalisiert haben. Im Rückgrat der Polypeptidkette (fette schwarze Linien) sind die N-Atome eingezeichnet. Für einige besonders eng benachbarte Atome sind die Abstände angegeben. Es gelten die Abstände der durch die dünnen Linien miteinander verbundenen Atome.

Ähnlich wie bei den Cyclosporinen existiert für FK506-Derivate eine näherungsweise lineare Beziehung zwischen dem Parameter  $\lg \text{IC}_{50}$  für die Bindung an FKBP12 und der Blockierung der IL-2-Ausschüttung aus stimulierten Jurkat-Zellen. Zu den Off-diagonal-Verbindungen gehören Rapamycin und vor allem 506BD (Abb. 15), eine synthetische Verbindung, mit deren Hilfe zuerst die Diskrepanz zwischen der PPIase-Inhibition und der T-Zell-Wirkung gezeigt wurde<sup>[226]</sup>. Beide Verbindungen haben eine hohe Affinität gegenüber PPIasen und inhibieren deren Aktivität, ohne die IL-2-Produktion zu beeinflussen<sup>[227]</sup>. Diese

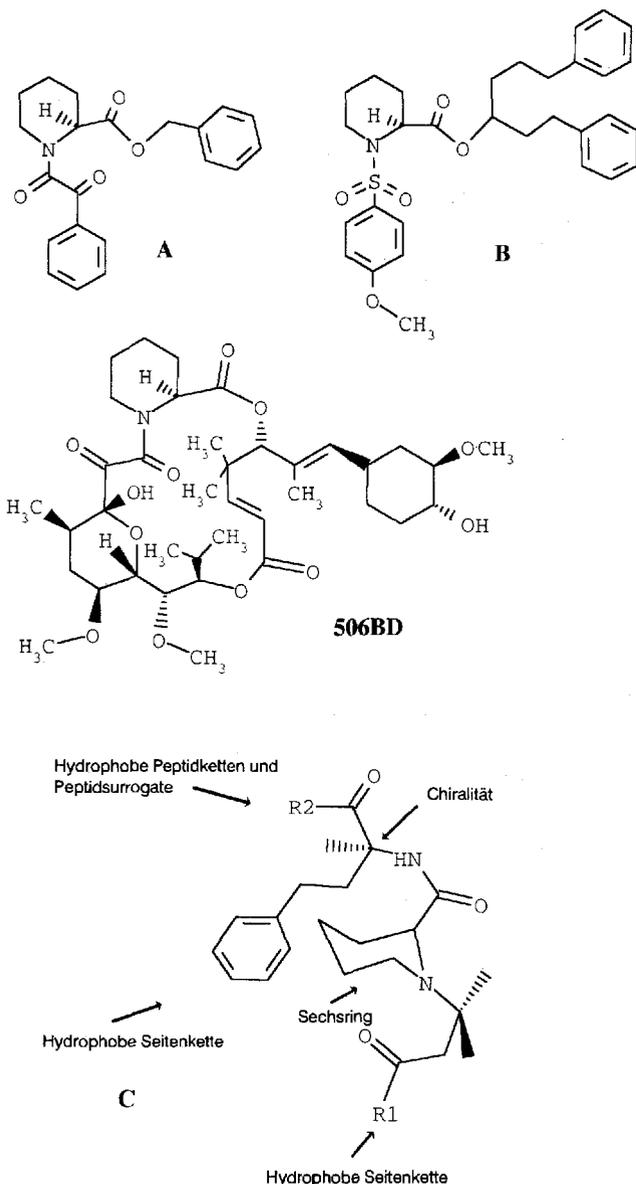


Abb. 15. Strukturen einiger synthetischer Inhibitoren von FKBP12cy.

Off-diagonal-Derivate dienen als empfindliche Sonden bei der Verifizierung des Calcineurinmodells der Immunsuppression.

Die  $\alpha$ -Dicarbonyleinheit in FK506 und Rapamycin weicht von der *s-trans*-Planarität ab. Die  $\alpha$ -Carbonylgruppe steht im Enzymkomplex ebenfalls senkrecht zur Ebene der Amidgruppe (siehe Abb. 12<sup>[20, 228]</sup>). Dies ist aber nicht eine Folge der makrocyclischen Struktur, denn lokale Spannungen bedingen schon in einfachen Brenztraubensäuredialkylamiden die Auslenkung aus der ansonsten planaren Dicarbonylebene<sup>[229]</sup>.

Eine Konformationsänderung an der Amidbindung von FK506 ist bei der Komplexbildung zu beobachten: Im kristallinen Zustand liegt die *cis*-Konformation, in wässrigen Lösungen ein Isomerengemisch und nach der Bindung an FKBP12cy die *trans*-Konformation vor. In Rapamycin überwiegt auch im freien Zustand die im Rapamycin-FKBP-Komplex auftretende Konformation, so daß die gegenüber dem Rapamycin-FK506-Komplex größere Komplexbildungskonstante erklärbar wird. Wie für eine Lösung von FK506 in Ethanol/Wasser gefunden wurde, ist FK506 im Gegensatz zu Rapamycin chemisch nicht stabil, son-

dern tautomerisiert langsam am Hemiketal-C10-Atom unter Racemisierung und Bildung der Ketostruktur am C10-Atom<sup>[230]</sup>.

Beide Makrolide werden als Übergangszustands-Analoga für die durch PPIasen katalysierten Umwandlungen angesehen, bei denen die  $\alpha$ -Carbonylgruppe bereits im Grundzustand die normalerweise im Übergangszustand der Isomerisierung vorliegende Anordnung bezüglich der Peptidbindung einnimmt<sup>[113]</sup>. Nach dem Einbau einer Peptidbindung anstelle der OH-Gruppe am C10-Atom von FK506 läßt die Inhibitorwirkung nach<sup>[231]</sup>, so daß FK506 wahrscheinlich nicht das Übergangszustands-analoge Surrogat eines die Dipeptideinheit Leu-Pro enthaltenden, natürlichen Substrats ist.

Die Konformationshomologie von FK506 zu  $\alpha$ -Ketosäureamiden erklärt, warum neue Inhibitor-moleküle zuerst an diese Peptidbindung-Carbonylgruppe-Grundstruktur angelehnt wurden. Verbindung A in Abbildung 15 ist ein Phenylglyoxyssäure-derivat, das trotz der im Vergleich zu FK506 einfachen Struktur mit  $K_i = 1.5 \mu\text{M}$ <sup>[232]</sup> eine beachtliche Inhibitorpotenz aufweist. Substanz B bringt mit der Sulfonamidgruppe eine Erweiterung der Strukturelemente, die die Wirkung hervorrufen ( $K_i = 5 \mu\text{M}$ <sup>[233]</sup>), während Verbindung C die von Hauske et al.<sup>[234]</sup> aus 56 Inhibitorstrukturen extrahierten Elemente für einen optimalen FKBP-Inhibitor zusammenfaßt.

## 7. Intrazelluläre Bindungsproteine für PPIasen

Proteine, die in der intakten Zelle oder in Zellhomogenaten spezifisch an PPIasen assoziiert sind, könnten Hinweise auf die biologische Funktion der Enzyme und auf natürliche Substrate liefern. Aus den hohen  $K_m$ -Werten von humanem Cyp18cy und von FKBP12 gegenüber Oligopeptiden und aus den prognostizierbaren, gleichfalls niedrigen Affinitäten der PPIasen für Proteinsubstrate läßt sich ableiten, daß Assoziate aus PPIasen und zellulären Substraten kaum akkumuliert sind. Es ist daher fraglich, ob die Lebensdauer von PPIasen-Komplexen mit guten Polypeptidsubstraten für einen analytischen Nachweis ausreicht. Die PPIase-Bindungspartner in stabilen heterooligomeren Komplexen können aber so gefunden werden.

Immobilisierte Proteine der Hitzeschockfamilie hsp90 binden in Abhängigkeit von der  $\text{Mg}^{2+}$ /ATP-Konzentration selektiv an humanes Cyp18cy, wobei die Bindung keine ATP-Hydrolyse erfordert und nicht durch CsA unterdrückbar ist. Umgekehrt werden auf einer Affi-Gel-Säule mit Cyp18cy als Liganden die Hitzeschockproteine hsp70 und hsp90 beim Chromatographieren zurückgehalten<sup>[235]</sup>. Eine Chromatographie mit dem PPIase-aktiven Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und Cyp23sec (Maus) als Affinitätsliganden, gebunden an Glutathion-Agarose als Träger, retardierte ein 77 kDa schweres Glycoprotein aus AC-6-Knochenmarkzellen mit einem für Zelloberflächenmoleküle typischen, an Cystein reichen Sequenzbereich<sup>[8, 236]</sup>.

Unerwartet kann, wie aus Quervernetzungsversuchen mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat hervorgeht, das prolinfreie Peptid CGYDVSTAQKIIAKL spezifisch mit Hefe Cyp17cy interagieren. Die Quervernetzung ist durch CsA unterdrückbar und mit der reversen Sequenz nicht zu beobachten<sup>[237]</sup>.

Eine elegante molekularbiologische Methode<sup>[238]</sup> kann Protein-Protein-Wechselwirkungen in einem Hefesystem über die Aktivierung der Transkription eines Reportergens *in vivo* nach-

weisen. Bei der Analyse der potentiellen Bindungspartner des gag-Polypeptids des HIV-1-Virus in einer durch humane cDNA codierten Proteinbibliothek wurden Cyp18cy und Cyp23sec als die einzigen spezifischen Bindungsproteine für Pr55<sup>gag</sup> ermittelt<sup>[239]</sup>. Gag-Proteine verwandter Virustypen binden nicht an Cyclophiline oder nur wie beim Affenvirus SIV-1 an Cyp23sec. Die Pr55<sup>gag</sup>-Cyp-Komplexierung ist mit isolierten Proteinen in vitro nachvollziehbar und auch für das p24-Fragment von Pr55<sup>gag</sup> festzustellen. Hier kann die Assoziation durch CsA zurückgedrängt werden. Welche Schlüsse für die Pathogenese einer HIV-1-Infektion aus diesen Befunden resultieren, ist noch völlig unklar. Immerhin kann die Applikation von CsA die HIV-1-Replikation und vor allem die Bildung vielkerniger Syncytien aus T-Zellen stören<sup>[240]</sup>.

Für FKBP wurden bisher weniger Bindungsproteine aufgefunden. FKBP12cy wird sehr spezifisch und fest an den Ryanodin-Rezeptor (565 kDa), den Ca<sup>2+</sup>-Kanal der Skelettmuskulatur, gebunden und mit ihm aufgereinigt. Man vermutet, daß FKBP12 an der cytoplasmatischen Seite des sarkoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist<sup>[241]</sup>.

## 8. Mechanismen der durch PPIasen katalysierten Umwandlungen

Die Geschwindigkeit der unkatysierten *cis/trans*-Isomerisierung der Prolylpeptidbindung hängt relativ wenig von den unmittelbar benachbarten Aminosäuren ab, beträchtlich aber vom

Faltungszustand<sup>[25]</sup> der Polypeptidkette. Für die Isomerisierungen von Polypeptidketten findet man in Relation zu denen von Oligopeptiden sowohl Geschwindigkeitserhöhung als auch -erniedrigung. Eine spezifisch intramolekulare Katalyse der Isomerisierung der Prolinbindung über die Argininseitenkette in Dihydrofolat-Reduktase wurde zwar vorgeschlagen<sup>[242]</sup>, ist jedoch schwierig von strukturellen Einflüssen zu trennen.

Außer bei extremen pH-Werten ist eine Säurekatalyse der Isomerisierung nicht feststellbar und auch auf eine nucleophile Beteiligung von OH<sup>-</sup>-Ionen kann man bisher nur indirekt schließen<sup>[243]</sup>. In nichtwässrigen Lösungsmitteln laufen diese Konformationsänderungen aufgrund der Destabilisierung des Grundzustands der Isomere und damit der verminderten Elektronendelokalisierung innerhalb der Amidbindung schneller als in Wasser ab<sup>[244]</sup>, wobei aus den bisherigen Ergebnissen für die Reaktionsbeschleunigung ein Faktor kleiner 100 resultiert.

Die für eine durch ein Enzym katalysierte *cis/trans*-Isomerisierung prinzipiell denkbaren molekularen Mechanismen wurden von uns sehr frühzeitig<sup>[245]</sup> diskutiert und sind in erweiterter Form in Abbildung 16 aufgeführt. Einige dieser Reaktionswege lassen ein Zwischenprodukt, in dem das Substrat kovalent gebunden ist, im Verlauf der Katalyse erwarten. Im wesentlichen Elementarschritt wird in allen Fällen der Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung geschwächt. Auf die beiden postulierten Mechanismen, die unter C-H-Bindungsspaltung ablaufen, erhielt man bei den bislang untersuchten PPIasen keine Hinweise. Die enzymgebundenen Nucleophile E-X<sup>-</sup> oder Elektrophile E-X<sup>+</sup> könnten auch für an das Enzym gebundene Wassermolekül

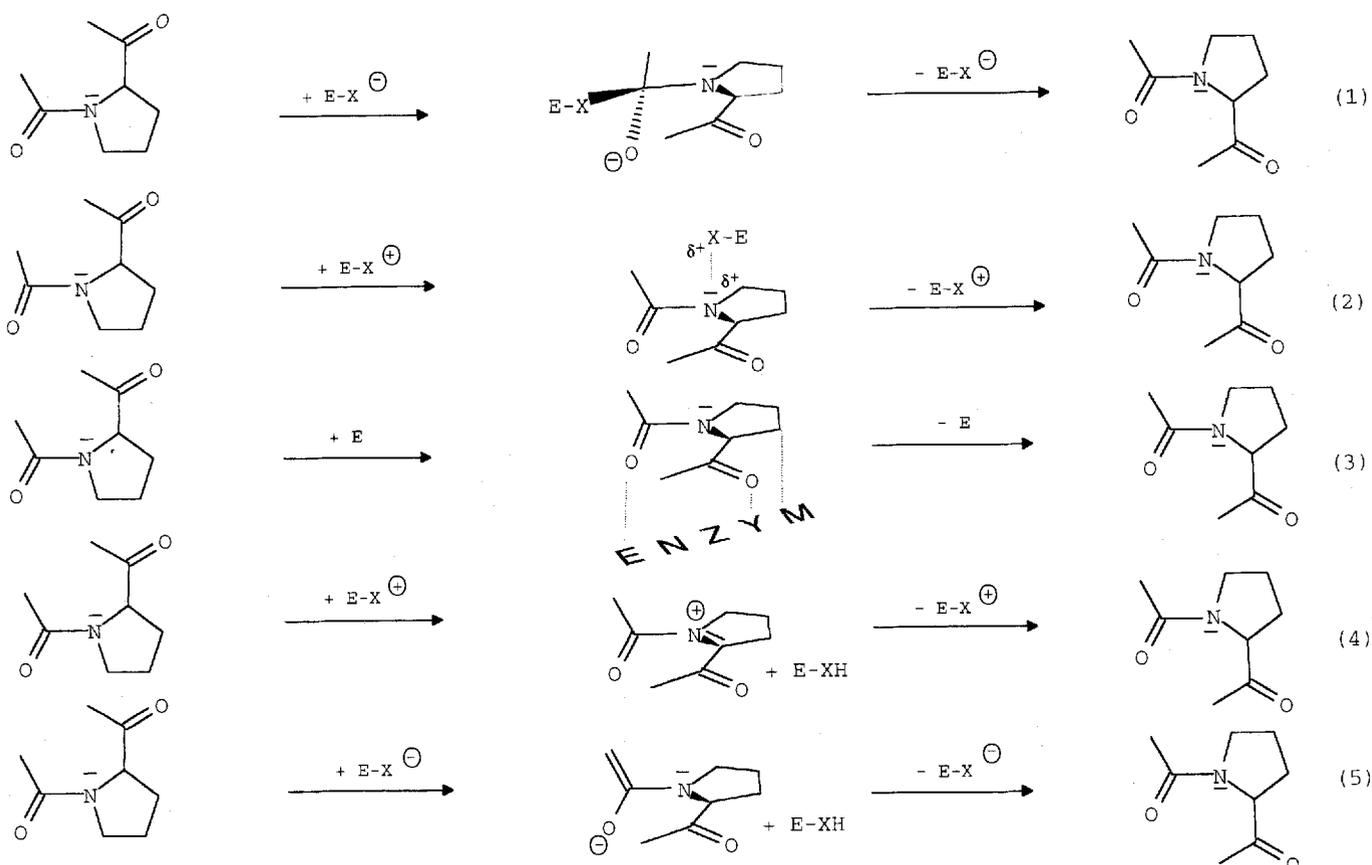


Abb. 16. Hypothetische Reaktionsmechanismen bei der PPIase-katalysierten *cis/trans*-Isomerisierung der Prolylpeptidbindung. E-X entspricht einer enzymgebundenen, reaktiven Gruppe. In allen Mechanismen bleibt das freie Elektronenpaar am Stickstoffatom, d.h. die Elektronen werden nicht mehr über die Amidbindung delokalisiert.

stehen, und in der Tat wird über eine Beteiligung von  $H_2O$  am Mechanismus der katalysierten Isomerisierung nachgedacht.

Die Interpretation der kinetischen Daten von PPIasen-katalysierten Umwandlungen wird durch die Gegenwart multipler Enzymformen<sup>[146]</sup> mit unterschiedlichem Verhalten erschwert. Die pH-Abhängigkeit der Reaktion von Cyp18cy mit Tetrapeptid-Substraten, deren katalytische Wirkung ( $k_{cat}/K_m$ ) bei niedrigen pH-Werten sinkt, kann durch die Übertragung eines Protons mit  $pK_a = 5.9$ <sup>[266]</sup> (Literaturwert 4.92<sup>[246]</sup>) beschrieben werden. Zusammen mit der niedrigen Aktivierungsenthalpie von  $\Delta H^\ddagger = 0.3\text{--}3 \text{ kcal mol}^{-1}$ <sup>[146, 246, 247]</sup> weisen diese Parameter auf einen ungewöhnlichen Katalysemechanismus hin.

Auf den ersten Blick sprechen sekundäre kinetische Isotopeneffekte mit Werten größer 1.0 für Xaa-Pro-Substrate mit einer  $C_2(D)H$ -Einheit im Xaa-Rest (gefunden bei beiden Enzymfamilien), Solvent-Deuterium-Isotopeneffekte ( $k_{cat}/K_m$ ) <sub>$H_2O$</sub>  ( $k_{cat}/K_m$ ) <sub>$D_2O$</sub>   $\approx 1.0$  sowie die weitgehende pH-Unabhängigkeit des  $k_{cat}/K_m$ -Werts für pH-Werte größer 7 für einen sehr einfachen Mechanismus mit einem vielleicht nichtkovalenten Übergangszustand (Gleichung (3) in Abb. 16). Bei diesem Mechanismus müßte die festere Bindung des Übergangszustands, der einen Winkel  $\omega \approx 90^\circ$  an der Prolylpeptidbindung aufweist, an das Enzym die festere Bindung der freien Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger$  bewirken (conformational twist mechanism)<sup>[146]</sup>. Der Transfer der Substrate aus dem wäßrigen Medium in hydrophobe Enzymbereiche setzt gleichzeitig den oben diskutierten, katalytischen Beitrag durch die verminderte Elektronendelokalisierung im Grundzustand frei.

Aus der chemischen Umgebung im (Ala-Pro)-Cyp18cy-Komplex läßt sich die in der Nähe des Isomerisierungszentrums lokalisierte Aminosäure <sup>126</sup>His als potentiell reaktive, katalytisch wirksame Seitenkette erkennen (Abb. 17). Nahezu parallel zum Peptidylrest Xaa in der Xaa-Pro-Einheit, aber umgekehrt bezüglich der Kettenpolarität angeordnet, befindet sich das Rück-

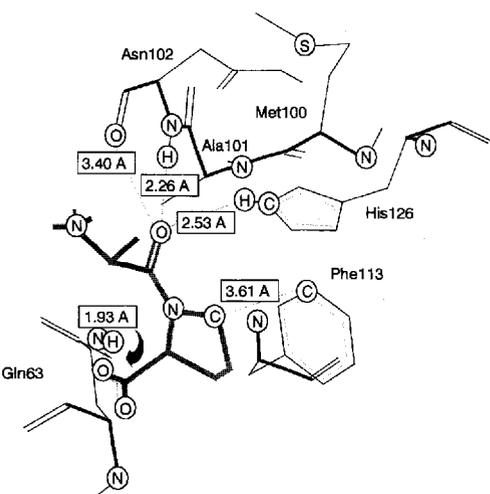


Abb. 17. Alle Aminosäurereste des cytosolischen Cyclophilins [19], die im Umkreis von 5.5 Å um das Sauerstoffatom der Peptidcarbonylgruppe des gebundenen Dipeptids Ala-Pro (mit fetten grauen Linien dargestellter Molckülteil) ein Atom lokalisiert haben. Für die verdeckte Amidgruppe der Seitenkette von <sup>63</sup>Gln ist der  $NH \cdots O$ -Abstand angegeben, der auf eine starke Wasserstoffbrückenbindung hindeutet. Weitere Informationen siehe Abb. 14.

gratsegment (<sup>102</sup>Asn bis <sup>100</sup>Met) des Proteins. Die der Peptidbindung benachbarte Carbonylgruppe der Ala-Pro-Einheit bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zur  $NH$ -Gruppe von <sup>102</sup>Asn; diese Funktion erfüllt die <sup>82</sup>Tyr-OH-Gruppe im FK506-FKBP-Komplex (siehe Abb. 14), in dem keine weiteren funktionellen Seitenketten in der Nähe des Isomerisierungszentrums sind. Durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette von <sup>63</sup>Gln und der Carboxygruppe von Ala-Pro, die in Polypeptidsubstraten fehlt, könnte sich dieser Dipeptidkomplex von Substrat-Cyp18-Komplexen hinsichtlich der Struktur unterscheiden. Im Tetrapeptidkomplex ist auch der <sup>55</sup>Arg-Rest im geeigneten Abstand für eine Wasserstoffbrückenbindung zu diesem Molekülteil zu finden<sup>[18]</sup>.

Durch ortsspezifische Mutagenese gelingt es bei Cyp18cy, die nucleophile Beteiligung von SH-Gruppen am Katalysemechanismus auszuschließen<sup>[248]</sup>, die man aus den Inhibitionsdaten und aus dem Nachweis eines im CsA-Cyp-Komplex vor SH-Modifizierungen geschützten Cysteinrest hätte ableiten können<sup>[5]</sup>. <sup>115</sup>Cys ist zwar noch in der Nähe des aktiven Zentrums angesiedelt, aber für einen nucleophilen Angriff viel zu weit von der Peptidylcarbonyleinheit des Substrats entfernt. Weiterhin lassen sich die Bindung von CsA und die enzymatische Aktivität durch Mutationsexperimente voneinander trennen, denn einer Abnahme der CsA-Bindungsfähigkeit im W121A-Mutantenenzym um mehr als das 100fache steht eine nur 11.4fache Verminderung der katalytischen Aktivität gegenüber. Selbst die nahezu inaktiven Enzyme H126Q, F60A und R55A können immer noch CsA binden; quantitative Daten liegen jedoch nicht vor<sup>[164]</sup>.

Bezieht man die qualitativen Ergebnisse zur In-vivo-Funktionsfähigkeit von Cyp26mem aus *Drosophila melanogaster* mit ein<sup>[127]</sup>, führen die Mutationen von Gly130Asp, Gly108Asp, Gly164Asp, Gly65Asp und Asn35Lys (Numerierung analog dem humanen Cyp18cy) zu Enzymen mit reduzierter Aktivität.

Im Vergleich zu Cyclophilinen liegen für FKBP wesentlich mehr quantitative Daten für punktmutierte Enzyme vor. Der Austausch der einzigen Cysteingruppe (Cys22Ala), der sukzessive Austausch aller fünf Serin- und der von zwei der insgesamt sieben Threonineinheiten (Thr75Ala, Thr96Ala) eliminiert potentielle Nucleophile und H-Brücken-Donoren. Bei keinem der resultierenden Enzyme konnte eine gravierende Veränderung der enzymatischen Aktivität oder der Bindungsfähigkeit gegenüber FK506 oder Rapamycin nachgewiesen werden<sup>[220]</sup>.

Trotzdem lassen sich auch bei dieser Proteinfamilie Mutantenenzyme finden, bei denen die Enzymaktivität von der Bindungsfähigkeit gegenüber FK506 getrennt werden kann. Bei der Phe36Tyr-Mutation in FKBP12cy<sup>[213]</sup> bleibt die Affinität zum Inhibitor erhalten, während die Enzymaktivität auf einen sehr kleinen Wert absinkt. Beim Asp37Val-Austausch im gleichen Enzym sind beide Prozesse fast vollständig entkoppelt; diesmal aber mit einem vergleichsweise großen Verlust an FK506-Affinität<sup>[249]</sup>. Eine Tendenz, die sich auch in *Legionella pneumophila* FKBP25mem für die Substitution Asp37Leu (Numerierung analog zu humanem FKBP12cy), dieser innerhalb der FKBP-Familie hochkonservierten Aminosäure, fast im gleichen Verhältnis bestätigt<sup>[218]</sup>. Unter den sich in der Nähe des aktiven Zentrums befindlichen Aminosäuren (siehe Abb. 17) sind, wiederum an *Legionella pneumophila* FKBP25mem geprüft, außer <sup>82</sup>Tyr noch <sup>36</sup>Phe und <sup>99</sup>Phe wichtig<sup>[218]</sup>. <sup>87</sup>His ist für die Katalyse entbehrlich<sup>[249]</sup>.

## 9. Immunsuppressor-PPIase-Komplexe und das Calcineurinmodell

Ein Verlust der PPIase-Aktivität der Rezeptoren Cyp18cy und FKBP12cy bei der Einwirkung von CsA bzw. FK506 genügt nicht, um die Blockierung der T-Zell-Aktivierung durch diese beiden Verbindungen zu erklären. So ist das zweite, in der Immunsuppression hochwirksame Peptidomakrolid, das Rapamycin, zwar ein besserer Inhibitor für FKBP12cy als FK506, seine Wirkung resultiert aber aus ganz anderen Prozessen auf molekularer Ebene. Anstelle der Blockierung der Transkription der früh in der Signaltransduktion erscheinenden Gene, wie es für die Inhibition mit CsA und FK506 gefunden wurde, beeinflusst Rapamycin die konstitutive Zellteilung und blockiert die  $G_1 \Rightarrow S$ -Phase<sup>[191, 250, 251]</sup>. Es scheint, daß ein Rapamycin-FKBP-Komplex den Aktivitätsanstieg der p70S6-Kinase blockiert, wenn der IL-2-Rezeptor oder CD28 stimuliert wird<sup>[251-253]</sup>. Diese Effekte sind nicht auf T-Zellen beschränkt<sup>[254]</sup>.

Weiterhin findet man eine Reihe von CsA- und FK506-Derivaten (die oben erwähnten off diagonal analogues), die zwar die PPIase-Aktivität durch ihre ausgeprägte Affinität unterdrücken, aber eine andere oder gar keine Wirkung in den In-vitro-IL-2-Transkriptionsmodellen und T-Zell-Aktivierungstests aufweisen<sup>[153, 226]</sup>. Die mit FK506 oder CsA gemeinsame Rezeptorbindungsstelle dieser Verbindungen läßt sich manchmal durch die antagonistische Wirkung der biologisch inaktiven Derivate in den Transkriptionstests nachweisen. Zusammen mit den Deletionsexperimenten der Gene von Cyp12cy und FKBP12cy in Hefe und *Neurospora crassa* wird klar, daß eine spezifische Bindung der immunsuppressiven Verbindungen an diese Rezeptoren eine notwendige, aber keine hinreichende Voraussetzung für die Unterdrückung der T-Zell-Antwort ist. Als die die immunsuppressive Wirkung auslösenden Komponenten haben sich die Ligand-PPIase-Komplexe selbst herauskristallisiert. Sie haben gegenüber anderen Zellbestandteilen neue, weder im freien Liganden noch im Protein vorhandene Eigenschaften.

Als gemeinsames Bindungsprotein für trägergebundene FK506-FKBP- und CsA-Cyp-Komplexe konnten S. L. Schreiber et al. und I. Weissman et al. durch Affinitätschromatographie Calcineurin/Calmodulin auffinden<sup>[7, 81]</sup>. Der Rapamycin-FKBP12cy-Komplex retardiert diese Proteine nicht. Diese heteromere Proteinphosphatase (Bestandteile: Calcineurin A, Calcineurin B, Calmodulin,  $Ca^{2+}$ ) wird in der Hydrolyseaktivität gegenüber Proteinphosphaten, jedoch nicht gegenüber 4-Nitrophenylphosphat, durch die Komplexe CsA-Cyp18cy und FK506-FKBP12cy mit einem  $K_i$ -Wert um 35 nM inhibiert. Auch einige off diagonal analogues aus der FK506- und der CsA-Reihe zeigen in einem Test zur quantitativen Bestimmung der Transkriptionsaktivität des IL-2-spezifischen Faktors NF-AT<sub>p</sub>, die erwartete Korrelation zwischen dem  $K_i$ -Wert für Calcineurin und den  $IC_{50}$ -Werten im Transkriptionsmodell<sup>[154]</sup>. Als zelluläres Zielmolekül für die Phosphataseaktivität von Calcineurin wurde die etwa 120 kDa schwere, cytosolische, phosphorylierte Komponente des multimeren Transkriptionsfaktors NF-AT<sup>[255]</sup> erkannt. Im Zellkern liegt NF-AT<sub>p</sub> dephosphoryliert vor. Bei fehlender Calcineurinaktivität geht man von einer Translokationssperre für NF-AT<sub>p</sub> aus, so daß der aktive Transkriptionskomplex am IL-2-Promoter, bestehend aus Proteinen der Jun- und Fos-Familie sowie dem

DNA-bindenden NF-AT, infolge der fehlenden cytosolischen Untereinheit nicht angeschaltet werden kann (Abb. 18)<sup>[256]</sup>. Die Calcineurininhibition ist eine spezielle Eigenschaft der cytosolischen FKBP12- und Cyp18cy-Komplexe. Die Ligandierung von FK506 an reifem FKBP16mem führt zu einer 200fach schlechteren Inhibition für die Phosphatase<sup>[192]</sup>.

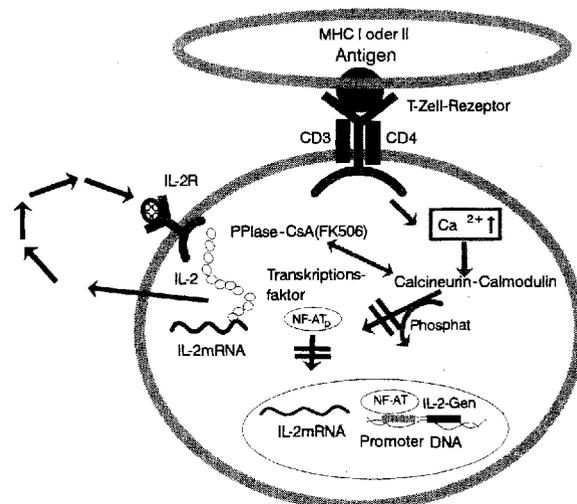


Abb. 18. Hypothetischer Mechanismus für die durch CsA oder FK506 bewirkte Unterdrückung der antigen- oder mitogenstimulierten, klonalen T-Zell-expansion. Die Inhibition der Calcineurinaktivität durch die CsA(FK506)-PPIase-Komplexe ist für die Unterbrechung der Signaltransduktion nach der T-Zell-Stimulierung verantwortlich. Der IL-2-Rezeptor triggert einen unabhängigen Signalweg. MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex.

Was ist nun die Ursache auf molekularer Ebene, die die PPIase-Effektor-Komplexe dazu befähigt, im Unterschied zu den freien Molekülen das Bindungsprotein Calcineurin zu inaktivieren? Aus der Struktur-Wirkungs-Analyse einer Anzahl von FK506-Derivaten, die zwar alle an FKBP12cy binden, aber trotzdem eine unterschiedliche Wirkung auf die IL-2-Ausschüttung haben, geht hervor, daß sehr subtile Effekte dafür verantwortlich sind. Aufgrund dieser Daten und der dreidimensionalen Struktur der Komplexe ist eine angenäherte Effektorregion der Wirkstoffe postuliert worden, die den Kontakt zu Calcineurin vermittelt. Sie umfaßt für CsA die Aminosäuren 5–8 und für FK506 die C-Kette der Atome C17–C32.

So ist beispielsweise C18-Hydroxyascomycin im Gegensatz zu Ascomycin selbst (Strukturformel siehe Legende von Abb. 5) im IL-2-Test inaktiv, jedoch ein starker Antagonist für die FK506- und Rapamycinwirkung<sup>[257]</sup>. Es läßt, wie erwartet, die Calcineurinaktivität unbeeinflusst. Von beiden Verbindungen wurden die dreidimensionalen Strukturen der Komplexe mit FKBP12 als zweiter Komponente bestimmt<sup>[258]</sup>. Ein Vergleich zeigt, daß die Strukturunterschiede zwischen den biologisch inaktiven und aktiven Komplexen [letztere sind die Komplexe FK506-(humanes FKBP12) und Ascomycin-(humanes FKBP12cy)] so minimal sind, daß der störende Einfluß der zusätzlichen OH-Gruppe von Hydroxyascomycin selbst auf den oligomeren Calcineurinkomplex (bei einer Bruttomolmasse des Komplexes von MW 110 kDa!<sup>[213]</sup>) diskutiert wird. Bietet man aber C18-Hydroxyascomycin im Inhibitionstest für Calcineurin als Komplex mit

Hefe FKBP12cy als zweite Komplexkomponente an, so wird die Phosphataseaktivität ähnlich stark inhibiert wie durch den FK506-(humanes FKBP12cy)-Komplex. Die auch für diesen Komplex vorliegende Struktur im Kristall<sup>[259]</sup> überrascht, da die Konformation des Peptidomakrolids für den inaktiven humanen und den aktiven Hefekomplex dieselbe ist. Zwischen Aktivität und Inaktivität des Wirkstoffkomplexes entscheiden demnach in diesem Fall die nichtkonservierten Aminosäuren in der Sequenz der beiden FKBP. Ähnlich komplizierte Beziehungen gelten für die Komplexe der CsA-Derivate mit Cyp18cy und Cyp23sec<sup>[156, 260]</sup>.

Die Wirkung der CsA- und der FK506-PPIase-Komplexe geht wahrscheinlich weit über die T-Zellen als Wirkungsort und über die relativ langsame Transkriptionsregulation hinaus. Die durch FK506 und CsA inhibierbare, über die Stimulierung des IgE-Rezeptors bewirkte schnelle Ausschüttung von Histamin ( $\tau_{1/2} \approx 10$  min!) durch eine Exocytose aus Mastzellen ist an das Vorliegen der PPIase-Komplexe gebunden<sup>[261]</sup>. In den Schließzellen höherer Pflanzen reguliert der als second messenger dienende, intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Spiegel den Einstrom von  $K^+$ -Ionen. Der  $K^+$ -Kanal wird bei höheren  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen blockiert, und diese Blockade wird durch extern zugesetzte CsA-Cyp18cy- oder FK506-FKBP12cy-Komplexe aufgehoben. Die Deblokierung gelingt bei Cyclosporin A durch dessen alleinige Applikation, bei FK506 reicht dessen Zugabe nicht aus. Dies ist darin begründet, daß die Hauptkomponente der zelleigenen FKBP (ein FKBP16-Homologes) einen FK506-Komplex liefert, der gegenüber Calcineurin inaktiv ist<sup>[119]</sup>.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß ein zweites prolinspezifisches Enzym, die Dipeptidyl-Peptidase IV als CD26 die antigen-induzierte Signaltransduktion in T-Zellen spezifisch beeinflusst. Die Blockierung der proteolytischen Aktivität durch Inhibition<sup>[262]</sup> führt, wie für CsA und FK506 gefunden, ebenfalls zu einer Verminderung der IL-2-Sekretion.

## 10. Ausblick

Seit der Entdeckung der ersten Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase ist die Zahl der sequenzierten Enzyme schon beachtlich groß geworden. Viele dieser PPIasen wirken in einer noch nicht genügend erforschten Art und Weise bei zellulären Regelsystemen mit und könnten auch für die Wechselwirkungen der Zellen untereinander wichtig sein. Um hier Einblick in die Abläufe auf molekularer Ebene zu bekommen, muß man In-vivo-Effektoren oder -Substrate identifizieren und die Auswirkungen der *cis/trans*-Isomerisierungen auf die Eigenschaften einer Polypeptidkette erforschen. Natürlich erwarten wir einen weiteren Anstieg in der Zahl der aufgeklärten PPIase-Sequenzen und vielleicht, hervorgehend aus neuen Aktivitätstests, auch neue PPIase-Familien. Daneben eröffnen diese Proteine dem Enzymologen die faszinierende Möglichkeit, den Mechanismus der enzymkatalysierten einfachsten chemischen „Reaktion“, der Drehung um eine Bindung, zu untersuchen. Die PPIasen sind die ersten bekannten Enzyme, die auf die Katalyse von Konformationsänderungen spezialisiert sind. Wahrscheinlich sind sie spezifisch für prolinhaltige Polypeptide. Es ist interessant darüber nachzudenken, ob in der Zelle Bedarf für weitere Konformasen mit ganz anderen Zielmolekülen besteht.

*Großer Dank gilt meinen früheren und jetzigen Mitarbeitern, die von den ersten Untersuchungen bei der Entdeckung dieser Enzyme, Dr. Holger Bang und Dr. Carla Mecht †, bis zum Aufbau unserer Arbeitsgruppe, Dr. habil. Gerhard Küllertz, Dr. Jens Rahfeld und Dr. Mike Schukowski, begeistert und fleißig an unserem Beitrag zu den dargestellten Forschungen gearbeitet haben. Ohne die Flut von Ideen und die freudige Mitarbeit der Doktoranden und Diplomanden wären die vorgestellten Experimente nicht durchzuführen gewesen. Die Zusammenarbeit mit den Gruppen von Franz X. Schmid (Bayreuth), Jörg Hacker (Würzburg), Klaus Kühn (Martinsried), Kurt Lang (Penzberg) und Sture Forsen (Lund) hat uns erst den Zugang zu der Vielfalt an Methoden ermöglicht, die zur Untersuchung der Enzyme notwendig sind. Ich danke Prof. Hengming Ke für die Koordinaten der Cyclophilin- und Cyclophilin-(Ala-Pro)-Struktur, die zur Anfertigung der Abbildung 10 und Abbildung 17 verwendet wurden. Für die finanzielle Unterstützung gilt unserer besonderer Dank der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Volkswagen-Stiftung, der Boehringer-Ingelheim-Stiftung und dem Fonds der Chemischen Industrie.*

Eingegangen am 6. September 1993 [A 22]

- [1] G. Fischer, H. Bang, C. Mech, *Biomed. Biochim. Acta* **1984**, *43*, 1101.
- [2] H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeguchi, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 259; H. Tomoda, S. Omura, *ibid.* **1990**, *43*, 1207.
- [3] R. E. Handschumacher, M. W. Harding, J. Rice, R. J. Drugge, D. W. Speicher, *Science* **1984**, *226*, 544.
- [4] N. Takahashi, T. Hayano, M. Suzuki, *Nature* **1989**, *337*, 473.
- [5] G. Fischer, B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber, F. X. Schmid, *Nature* **1989**, *337*, 476.
- [6] J. J. Siekierka, S. H. Hung, M. Poc, C. S. Lin, N. H. Sigal, *Nature* **1989**, *341*, 755; M. W. Harding, A. Galat, D. E. Uehling, S. L. Schreiber, *ibid.* **1989**, *341*, 758.
- [7] J. Friedman, I. Weissman, *Cell* **1991**, *66*, 799.
- [8] J. Liu, J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, *66*, 807.
- [9] M. K. Rosen, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 413; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 384.
- [10] J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan, *Biochemistry* **1975**, *14*, 4953; B. T. Nall, *Comments Mol. Cell. Biophys.* **1985**, *3*, 123; F. X. Schmid, *Methods Enzymol.* **1986**, *131*, 70; P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 459; M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **1981**, *145*, 251; J. Engel, D. J. Prockop, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1991**, *20*, 137.
- [11] D. B. Wetlauffer, *Biopolymers* **1985**, *24*, 251; R. Jaenicke, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1987**, *49*, 117; R. Jaenicke, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 385; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 395; M. J. Gething, J. Sambrook, *Nature* **1992**, *355*, 33; P. Bruckner, E. F. Eikenberry, D. J. Prockop, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *118*, 607.
- [12] D. Oestrich, J. Tittor, E. Bamberg, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1992**, *24*, 181.
- [13] M. K. Rosen, R. F. Standaert, A. Galat, M. Nakatsuka, S. L. Schreiber, *Science* **1990**, *248*, 863.
- [14] M. J. Bossard, P. L. Koser, M. Brandt, D. J. Bergsma, M. A. Levy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *176*, 1142.
- [15] Mit der Aufklärung von zunehmend mehr Isoenzymen der PPIasen sind für einige der Enzyme Bezeichnungen vorhanden, die zu Verwechslungen führen und mißverständlich sind. Zur eindeutigen Kennzeichnung der Cyclophiline und FKBP wurde folgende Bezeichnungsweise gewählt: Cyp bzw. FBKP steht für die beiden Familien der PPIasen. Die aus der Nucleotidsequenz erhaltene Aminosäuresequenz des vollständigen Präproteins wird, nach Rundung auf ganzzahlige Molekulargewichte (kDa), hinter der Abkürzung Cyp bzw. FKBP ergänzt. Falls eindeutige Ergebnisse zur Lokalisierung vorliegen, wird noch cy (cytosolisch), mit (mitochondrial), sec (sekretorisch), mem (membranegebunden) dem Molekulargewicht nachgestellt. Der Organismus, aus dem das Protein stammt, wird (falls notwendig) vor oder nach dem Enzymkürzel vermerkt. Die Konkordanzliste zu einigen differierenden Bezeichnungen aus der Literatur ist in den Fußnoten zu Schema 1 (Cyp) und Schema 2 (FKBP) aufgeführt.
- [16] E. R. Schönbrunner, S. Mayer, M. Tropschug, G. Fischer, N. Takahashi, F. X. Schmid, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3630.
- [17] R. E. London, D. G. Davis, R. J. Vavrek, J. M. Stewart, R. E. Handschumacher, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10298.
- [18] J. Kallen, M. D. Walkinshaw, *FEBS Lett.* **1992**, *300*, 286.
- [19] H. Ke, D. Mayrose, W. Cao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3324.

- [20] G. D. Van Duyne, R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber, J. Clardy, *Science* **1991**, *252*, 839.
- [21] C. Weber, G. Wider, B. von Freyberg, R. Traber, W. Braun, H. Widmer, K. Wüthrich, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6563.
- [22] H. Akagi, A. Reynolds, M. Hjelm, *J. Int. Med. Res.* **1991**, *19*, 1.
- [23] J. Kallen, C. Spitzfaden, M. G. Zurini, G. Wider, H. Widmer, K. Wüthrich, M. D. Walkinshaw, *Nature* **1991**, *353*, 276.
- [24] H. M. Ke, *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 539.
- [25] F. X. Schmid, L. Mayr, M. Mücke, R. Schönbrunner, *Adv. Protein Chem.* **1993**, *44*, 25.
- [26] G. Wiederrecht, L. Brizuola, K. Elliston, N. H. Sigal, J. J. Siekierka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1029.
- [27] A. I. Denesyuk, M. Vihinen, J. Lundell, V. P. Zayvalov, T. Korpela, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192*, 912.
- [28] L. B. Peddada, J. D. McPherson, R. Law, J. J. Wasmuth, P. Youderian, R. J. Deans, *Cytogenet. Cell Genet.* **1992**, *60*, 219.
- [29] H. A. Young, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, S. Simek, M. J. Lerman, B. Zbar, G. Glenn, J. R. Ortaldo, S. K. Anderson, *Genomics* **1993**, *16*, 548.
- [30] A. G. Dilella, A. Hawkins, R. J. Craig, S. L. Schreiber, C. A. Griffin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *189*, 819.
- [31] B. Haendler, E. Hofer, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *190*, 477.
- [32] R. F. Standaert, A. Galat, G. L. Verdine, S. L. Schreiber, *Nature* **1990**, *346*, 671.
- [33] N. H. Sigal, F. J. Dumont, *Annu. Rev. Immunol.* **1992**, *10*, 519.
- [34] J. Y. Chang, S. N. Sehgal, C. C. Bansbach, *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 218.
- [35] C. Yousry, J. Kanitakis, *Pathol. Biol.* **1991**, *39*, 293.
- [36] P. A. Nelson, A. Kawamura, Y. Akseband, D. A. Peattie, R. A. Aldape, M. W. Harding, *Transplant. Proc.* **1991**, *23*, 2867; S. C. Wang, A. Zeevi, M. L. Jordan, R. L. Simmons, D. J. Twardy, *ibid.* **1991**, *23*, 2920; M. J. Tocci, D. A. Matkovich, K. A. Collier, P. Kwok, F. Dumont, S. Lin, S. Degudicibus, J. J. Siekierka, J. Chin, N. I. Hutchinson, *J. Immunol.* **1989**, *143*, 718.
- [37] E. A. Emmel, C. L. Verweij, D. B. Durand, K. M. Higgins, E. Lacy, G. R. Crabtree, *Science* **1989**, *246*, 1617; P. S. Mattila, K. S. Ullman, S. Fiering, E. A. Emmel, M. McCutcheon, G. R. Crabtree, L. A. Herzenberg, *EMBO J.* **1990**, *9*, 4425.
- [38] P. M. Colombani, A. Robb, A. D. Hess, *Science* **1985**, *228*, 337; P. S. Bernstein, W. C. Law, R. R. Rando, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 16848; E. W. Palaszynski, J. G. Donnelly, S. J. Soldin, *Clin. Biochem.* **1991**, *24*, 63.
- [39] K. Ziegler, M. Frimmer, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *855*, 147.
- [40] M. L. Moss, R. E. Palmer, P. Kuzmic, B. E. Dunlap, W. Henzel, J. L. Kofron, W. S. Mellon, C. A. Royer, D. H. Rich, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22054.
- [41] B. M. J. Foxwell, G. Woerly, H. Husi, A. Mackie, V. F. J. Quesniaux, P. C. Hiestand, R. M. Wenger, B. Ryffel, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1138*, 115; B. Ryffel, G. Woerly, V. F. J. Quesniaux, H. Husi, B. M. J. Foxwell, *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 953.
- [42] K. Ziegler, M. Frimmer, G. Fritsch, H. Koepsell, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 3270.
- [43] H. Bang, K. Brune, C. Nager, U. Feige, *Experientia* **1993**, *49*, 533.
- [44] J. G. Donnelly, R. L. Russell, E. W. Palaszynski, K. R. Copeland, R. W. Yates-coff, M. M. Chan, S. J. Soldin, *Clin. Biochem.* **1991**, *24*, 71; J. G. Donnelly, Y. J. Chen, R. W. Yatescoff, K. R. Copeland, E. W. Palaszynski, S. J. Soldin, *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 122.
- [45] B. M. Foxwell, A. Mackie, V. Ling, B. Ryffel, *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36*, 543; T. Saeki, K. Ueda, Y. Tanigawara, R. Hori, T. Komano, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6077.
- [46] N. Takeguchi, K. Ichimura, M. Koike, W. Matsui, T. Kashiwagura, K. Kawahara, *Transplantation* **1993**, *55*, 646; R. J. Arceci, K. Stieglitz, B. E. Bierer, *Blood* **1992**, *80*, 1528.
- [47] W. R. Melander, C. Horvath, *J. Chromatogr.* **1982**, *234*, 269; J. C. Gesquiere, E. Diesis, M. T. Cung, A. Tatar, *ibid.* **1989**, *478*, 121; E. Watson, W. C. Kenney, *ibid.* **1992**, *606*, 165.
- [48] L. N. Lin, J. F. Brandts, *Biochemistry* **1979**, *18*, 43, 5037; *ibid.* **1983**, *22*, 4480; *ibid.* **1985**, *24*, 6533.
- [49] G. Fischer, H. Bang, E. Berger, A. Schellenberger, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *791*, 87.
- [50] G. Fischer, J. Heins, A. Barth, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *742*, 452.
- [51] J. L. Kofron, P. Kuzmic, V. Kishore, E. Colon Bonilla, D. H. Rich, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6127.
- [52] C. Garciaecheverria, J. L. Kofron, P. Kuzmic, V. Kishore, D. H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2758.
- [53] C. Garciaecheverria, J. L. Kofron, P. Kuzmic, D. H. Rich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *191*, 70.
- [54] J. R. Garel, O. Siffert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *89*, 591.
- [55] V. L. Hsu, R. E. Handschumacher, I. M. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6745.
- [56] R. M. Justice, Jr., A. D. Kline, J. P. Sluka, W. D. Roeder, G. H. Rodgers, N. Roehm, J. S. Mynderse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *171*, 445.
- [57] D. Hübner, T. Drakenberg, S. Forsen, G. Fischer, *FEBS Lett.* **1991**, *284*, 79.
- [58] D. Kern, T. Drakenberg, M. Wikstrom, S. Forsen, H. Bang, G. Fischer, *FEBS Lett.* **1993**, *323*, 198.
- [59] F. X. Schmid in *Protein Folding* (Hrsg.: T. E. Creighton), Freeman, New York, **1992**, S. 197.
- [60] L. N. Lin, J. F. Brandts, *Biochemistry* **1987**, *26*, 3537.
- [61] J. Korde, T. Drakenberg, S. Forsen, E. Thulin, *FEBS Lett.* **1990**, *263*, 27.
- [62] K. Lang, F. X. Schmid, G. Fischer, *Nature* **1987**, *329*, 268.
- [63] M. Mücke, F. X. Schmid, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7848.
- [64] K. Lang, F. X. Schmid, *Nature* **1988**, *331*, 453.
- [65] H. P. Bächinger, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17144.
- [66] C. Fransson, P. O. Freskgard, H. Herberstson, A. Johansson, P. Jonasson, L. G. Martensson, M. Svensson, B. H. Jonsson, U. Carlsson, *FEBS Lett.* **1992**, *296*, 90.
- [67] L. N. Lin, H. Hasumi, J. F. Brandts, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *956*, 256.
- [68] T. Kiefhaber, R. Quaas, U. Hahn, F. X. Schmid, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3053.
- [69] B. Haendler, R. Hofer, Warbinek, E. Hofer, *EMBO J.* **1987**, *6*, 947.
- [70] M. W. Harding, R. E. Handschumacher, D. W. Speicher, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8547.
- [71] P. E. Danielson, S. Forss Petter, M. A. Brow, L. Calavetta, J. Douglass, R. J. Milner, J. G. Sutcliffe, *DNA* **1988**, *7*, 261.
- [72] D. J. Bergsma, D. Sylvester, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 200.
- [73] K. W. Hasel, J. G. Sutcliffe, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 4019.
- [74] P. Caroni, A. Rothenfluh, E. McGlynn, C. Schneider, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 10739.
- [75] C. S. Gasser, D. A. Gunning, K. A. Budelier, S. M. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9519.
- [76] J. Marivet, P. Frendo, G. Burkard, *Plant Sci. Limerick Irel.* **1992**, *84*, 171.
- [77] D. Bartling, A. Heese, E. W. Weiler, *Plant Mol. Biol.* **1992**, *19*, 529.
- [78] M. A. Stamnes, B. H. Shieh, L. Chuman, G. L. Harris, C. S. Zuker, *Cell* **1991**, *65*, 219.
- [79] K. Barisic, S. Mollner, A. A. Noegel, G. Gerisch, J. E. Segall, *Dev. Genet. N. Y.* **1991**, *12*, 50.
- [80] P. L. Koser, G. P. Livi, M. A. Levy, M. Rosenberg, D. J. Bergsma, *Gene* **1990**, *96*, 189.
- [81] R. de Martin, L. Philipson, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 4917.
- [82] K. Dietmeier, M. Tropschug, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 373.
- [83] B. Haendler, R. Keller, P. C. Hiestand, H. P. Kocher, G. Wegmann, N. R. Movva, *Gene* **1989**, *83*, 39.
- [84] M. W. Lightowers, A. Haralambous, M. D. Rickard, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, *36*, 287.
- [85] V. P. Argaet, G. F. Mitchell, *J. Parasitol.* **1992**, *78*, 660.
- [86] M. Tropschug, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 190.
- [87] M. Tropschug, I. B. Barthelmeß, W. Neupert, *Nature* **1989**, *342*, 953.
- [88] B. H. Shieh, M. A. Stamnes, S. Seavello, G. L. Harris, C. S. Zuker, *Nature* **1989**, *338*, 67.
- [89] S. Schneuwly, R. D. Shortridge, D. C. Larrivee, T. Ono, M. Ozaki, W. L. Pak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5390.
- [90] L. J. Kieffer, T. W. Seng, W. Li, D. G. Osterman, R. E. Handschumacher, R. M. Bayney, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12303.
- [91] T. Ratajczak, A. Carrello, P. J. Mark, B. J. Warner, R. J. Simpson, R. L. Moritz, A. K. House, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13187.
- [92] G. Spik, B. Haendler, O. Delmas, C. Mariller, M. Chamoux, P. Maes, A. Tartar, J. Montreuil, K. Stedman, H. P. Kocher, R. Kellert, P. C. Hiestand, N. R. Movva, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 10735.
- [93] E. R. Price, L. D. Zydowsky, M. J. Jin, C. H. Baker, F. D. McKeon, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1903.
- [94] N. Iwai, T. Inagami, *Kidney Int.* **1990**, *37*, 1460.
- [95] K. W. Hasel, J. R. Glass, M. Godbout, J. G. Sutcliffe, *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 3484.
- [96] S. Arber, K. H. Krause, P. Caroni, *J. Cell Biol.* **1992**, *116*, 113.
- [97] D. J. Bergsma, C. Eder, M. Gross, H. Kersten, D. Sylvester, E. Appelbaum, D. Cusimano, G. P. Livi, M. M. McLaughlin, K. Kasyan, T. G. Porter, C. Silverman, D. Dunnington, A. Hand, W. P. Pritchett, M. J. Bossard, M. Brandt, M. A. Levy, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23204.
- [98] S. K. Anderson, S. Gallinger, J. Roder, J. Frey, H. A. Young, J. R. Ortaldo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 542.
- [99] M. M. McLaughlin, M. J. Bossard, P. L. Koser, R. Cafferkey, R. A. Morris, L. M. Miles, J. Strickler, D. J. Bergsma, M. A. Levy, G. P. Livi, *Gene* **1992**, *111*, 85.
- [100] E. S. Davis, A. Becker, J. Heitman, M. N. Hall, M. B. Brennan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 11169.
- [101] P. L. Koser, D. Sylvester, G. P. Livi, D. J. Bergsma, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 1643.
- [102] L. Franco, A. Jimenez, J. Demolder, F. Molemans, W. Fiers, R. Contreras, *Yeast* **1991**, *7*, 971.
- [103] A. Pahl, M. Uhlein, H. Bang, W. Schlumbohm, U. Keller, *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 3551.
- [104] T. Hayano, N. Takahashi, S. Kato, N. Maki, M. Suzuki, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3041.
- [105] J. Liu, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4028.
- [106] M. A. Levy, M. Brandt, G. P. Livi, D. J. Bergsma, *Transplant. Proc.* **1991**, *23*, 319.

- [107] T. F. Holzman, D. A. Egan, R. Edalji, R. L. Simmer, R. Helfrich, A. Taylor, N. S. Burres, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2474.
- [108] L. J. Kieffer, T. Thalhammer, R. E. Handschumacher, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 5503.
- [109] T. Thalhammer, L. J. Kieffer, T. Jiang, R. E. Handschumacher, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *206*, 31.
- [110] S. Luan, W. W. Li, F. Rusnak, S. M. Assmann, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2202.
- [111] L. D. Zydowsky, S. I. Ho, C. H. Baker, K. McIntyre, C. T. Walsh, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 961.
- [112] H. Hasumi, T. Nishikawa, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1161*, 161.
- [113] M. Tropschug, D. W. Nicholson, F. U. Hartl, H. Kohler, N. Pfanner, E. Wachter, W. Neupert, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 14433.
- [114] I. Tanida, M. Yanagida, N. Maki, S. Yagi, F. Namiyama, T. Kobayashi, T. Hayano, N. Takahashi, M. Suzuki, *Transplant. Proc.* **1991**, *23*, 2856.
- [115] L. A. Compton, J. M. Davis, J. R. Macdonald, H. P. Bächinger, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *206*, 927.
- [116] M. Herrler, H. Bang, K. Brune, G. Fischer, M. A. Marahiel, *FEBS Lett.* **1992**, *309*, 231.
- [117] P. J. Casey, *J. Lipid Res.* **1992**, *33*, 1731.
- [118] M. L. McDonald, T. Ardito, W. H. Marks, M. Kashgarian, M. I. Lorber, *Transplantation* **1992**, *53*, 460.
- [119] M. J. Mihatsch, G. Thiel, B. Ryffel, *Toxicol. Lett.* **1989**, *46*, 125; J. B. Kopp, P. E. Klotman, *J. Am. Soc. Nephrol.* **1990**, *1*, 162.
- [120] B. Ryffel, B. M. Foxwell, A. Gee, B. Greiner, G. Woerly, M. J. Mihatsch, *Transplantation* **1988**, *46* (2 Supplementbände), 90 S.
- [121] B. Ryffel, G. Woerly, B. Greiner, B. Haendler, M. J. Mihatsch, B. M. Foxwell, *Immunology* **1991**, *72*, 399.
- [122] R. P. Lad, M. A. Smith, D. C. Hilt, *Mol. Brain Res.* **1991**, *9*, 239.
- [123] W. H. Marks, M. W. Harding, R. Handschumacher, C. Marks, M. I. Lorber, *Transplantation* **1991**, *52*, 340.
- [124] A. J. Koletsky, M. W. Harding, R. E. Handschumacher, *J. Immunol.* **1986**, *137*, 1054.
- [125] A. H. Sarris, M. W. Harding, T. R. Jiang, D. Aftab, R. E. Handschumacher, *Transplantation* **1992**, *54*, 904.
- [126] N. J. Colley, E. K. Baker, M. A. Starnes, C. S. Zuker, *Cell* **1991**, *67*, 255.
- [127] B. Ondek, R. W. Hardy, E. K. Baker, M. A. Starnes, B. H. Shieh, C. S. Zuker, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16460.
- [128] B. Sherry, N. Yarlett, A. Strupp, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3511.
- [129] T. R. Davis, L. Tabatabai, K. Bruns, R. T. Hamilton, M. Nilsen-Hamilton, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1095*, 145.
- [130] S. Bose, R. B. Freedman, *Biochem. Soc. Trans.* **1992**, *20*, 256S.
- [131] C. J. Brandl, C. M. Deber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 917; K. A. Williams, C. M. Deber, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8919.
- [132] O. McGuinness, N. Yafei, A. Costi, M. Crompton, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 671; E. J. Griffiths, A. P. Halestrap, *Biochem. J.* **1991**, *274*, 611.
- [133] M. Schweizer, J. Schlegel, D. Baumgartner, C. Richter, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 641.
- [134] K. Sykes, M. J. Gething, J. Sambrook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5853.
- [135] A. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, New York, **1985**, S. 152.
- [136] J. M. Davis, B. A. Boswell, H. P. Bächinger, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8956.
- [137] G. Fischer, F. X. Schmid, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2205.
- [138] P. O. Frøskgaard, N. Bergenhem, B. H. Jonsson, M. Svensson, U. Carlsson, *Science* **1992**, *258*, 466.
- [139] S. E. Jackson, A. R. Fersht, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10436.
- [140] E. R. Schönbrunner, F. X. Schmid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4510.
- [141] H. F. Lodish, N. Kong, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14835.
- [142] A. Knappik, C. Krebber, A. Plückthun, *Biotechnology* **1993**, *11*, 77.
- [143] M. A. Starnes, S. L. Rutherford, C. S. Zuker, *Trends Cell Biol.* **1992**, *2*, 272.
- [144] B. Steinmann, P. Bruckner, A. Superti-Furga, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1299.
- [145] G. Pflugl, J. Kallen, T. Schirmer, J. N. Jansonius, M. G. M. Zurini, M. D. Walkinshaw, *Nature* **1993**, *361*, 91.
- [146] R. K. Harrison, R. L. Stein, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3464.
- [147] J. L. Kofron, P. Kuzmic, V. Kishore, G. Gemmecker, S. W. Fesik, D. H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2670.
- [148] P. Kuzmic, M. L. Moss, J. L. Kofron, D. H. Rich, *Anal. Biochem.* **1992**, *205*, 65.
- [149] H. Kessler, M. Gehrke, J. Lautz, M. Kock, D. Seebach, A. Thaler, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 169; J. Lautz, H. Kessler, W. F. van Gunsteren, H. P. Weber, R. M. Wenger, *Biopolymers* **1990**, *29*, 1669.
- [150] 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; S. W. Fesik, P. Neri, R. Meadows, E. T. Olejniczak, G. Gemmecker, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3165; O. Vix, B. Rees, J. C. Thierry, D. Altschuh, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1993**, *15*, 339.
- [151] M. Kock, H. Kessler, D. Seebach, A. Thaler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2676.
- [152] V. F. Quesniaux, M. H. Schreier, R. M. Wenger, P. C. Hiestand, M. W. Harding, M. H. Van Regenmortel, *Transplantation* **1988**, *46* (2 Supplementbände), 23S.
- [153] N. H. Sigal, F. Dumont, P. Durette, J. J. Siekierka, L. Peterson, D. H. Rich, B. E. Dunlap, M. J. Staruch, M. R. Melino, S. I. Koprak, D. Williams, B. Witzel, J. M. Pisano, *J. Exp. Med.* **1991**, *173*, 619.
- [154] J. Liu, M. W. Albers, T. J. Wandless, S. Luan, D. G. Alberg, P. J. Belshaw, P. Cohen, C. Mackintosh, C. B. Klee, S. L. Schreiber, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3896.
- [155] 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, J. A. Schmidt, N. H. Sigal, M. J. Staruch, B. E. Witzel, *Transplant. Proc.* **1988**, *20*, 51.
- [156] P. A. Nelson, Y. Akselband, A. Kawamura, M. Su, R. D. Tung, D. H. Rich, V. Kishore, S. L. Rosborough, M. T. Decenzo, D. J. Livingston, M. W. Harding, *J. Immunol.* **1993**, *150*, 2139.
- [157] N. A. Cacalano, B. C. Chen, W. L. Cleveland, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4353.
- [158] Y. Theriault, T. M. Logan, R. Meadows, L. P. Yu, E. T. Olejniczak, T. F. Holzman, R. L. Simmer, S. W. Fesik, *Nature* **1993**, *361*, 88.
- [159] H. M. Ke, L. D. Zydowsky, J. Liu, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 9483.
- [160] H. Kessler, M. Kock, T. Wein, M. Gehrke, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1818.
- [161] H.-R. Loosli, H. Kessler, H. Oschkinat, H. P. Weber, T. J. Petcher, A. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 682.
- [162] R. K. Harrison, R. L. Stein, *Biochemistry* **1990**, *29*, 3813.
- [163] J. Liu, C. M. Chen, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2306.
- [164] L. D. Zydowsky, F. A. Etzkorn, H. Y. Chang, S. B. Ferguson, L. A. Stolz, S. I. Ho, C. T. Walsh, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 1092.
- [165] C. Lee, K. Hoffmann, R. Zocher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *182*, 1282.
- [166] N. Maki, F. Sekiguchi, J. Nishimaki, K. Miwa, T. Hayano, N. Takahashi, M. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5440.
- [167] A. G. DiLella, R. J. Craig, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8512.
- [168] J. J. Siekierka, G. Wiederrecht, H. Greulich, D. Boulton, S. H. Hung, J. Cryan, P. J. Hodges, N. H. Sigal, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 21011.
- [169] P. A. Nelson, J. A. Lippke, M. A. Murcko, S. L. Rosborough, D. A. Peattie, *Gene* **1991**, *109*, 255.
- [170] Y. Koltin, L. Faucette, D. J. Bergsma, M. A. Levy, R. Cafferkey, P. L. Koser, R. K. Johnson, G. P. Livi, *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 1718.
- [171] J. Heitman, N. R. Movva, M. N. Hall, *Science* **1991**, *253*, 905.
- [172] A. Ferrara, R. Cafferkey, G. P. Livi, *Gene* **1992**, *113*, 125.
- [173] Y. J. Jin, M. W. Albers, W. S. Lane, B. E. Bierer, S. L. Schreiber, S. J. Burakoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6677.
- [174] Y. J. Jin, S. J. Burakoff, B. E. Bierer, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10942.
- [175] G. Wiederrecht, M. M. Martin, N. H. Sigal, J. J. Siekierka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *185*, 298.
- [176] D. T. Hung, S. L. Schreiber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *184*, 733.
- [177] A. Galat, W. S. Lane, R. F. Standaert, S. L. Schreiber, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2427.
- [178] D. A. Peattie, M. W. Harding, M. A. Fleming, M. T. Decenzo, J. A. Lippke, D. J. Livingston, M. Benasutti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10974.
- [179] M. C. Lebeau, N. Massol, J. Herrick, L. E. Faber, J. M. Renoir, C. Radanyi, E. E. Baulieu, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 4281.
- [180] J. B. Nielsen, F. Foot, J. J. Siekierka, M. J. Hsu, N. Ramadan, N. Morin, A. Shafice, A. M. Dahl, L. Bruzuela, G. Chretien, K. A. Bostian, S. A. Parent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7471.
- [181] A. Pahl, U. Keller, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 5888.
- [182] M. Tropschug, E. Wachter, S. Mayer, E. R. Schönbrunner, F. X. Schmid, *Nature* **1990**, *346*, 674.
- [183] B. A. Shampson, E. C. Gotschlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 1164.
- [184] A. G. Lundemose, D. A. Rouch, S. Birkelund, G. Christiansen, J. H. Pearce, *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 2539.
- [185] G. Fischer, H. Bang, B. Ludwig, K. Mann, J. Hacker, *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 1375.
- [186] N. C. Engleberg, C. Carter, D. R. Weber, N. P. Cianciotto, B. I. Eisenstein, *Infect. Immun.* **1989**, *57*, 1263.
- [187] J. M. Bangsberg, N. P. Cianciotto, P. Hindersson, *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 3836.
- [188] J. Kato, L. Chu, K. Kitano, J. D. DeVault, K. Kimbara, A. M. Chakrabarty, T. K. Misra, *Gene* **1989**, *84*, 31.
- [189] L. Isaki, R. Beers, H. C. Wu, *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 6512.
- [190] M. W. Albers, C. T. Walsh, S. L. Schreiber, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4984.
- [191] 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.
- [192] M. K. Rosen, D. Yang, P. K. Martin, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 821.

- [193] P. K. K. Tai, M. W. Albers, H. Chang, L. E. Faber, S. L. Schreiber, *Science* **1992**, 256, 1315.
- [194] A. W. Yem, A. G. Tomasselli, R. L. Heinrikson, H. Zurcher Neely, V. A. Ruff, R. A. Johnson, M. R. Deibel, Jr., *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 2868.
- [195] A. G. Lundemose, J. E. Kay, J. H. Pearce, *Mol. Microbiol.* **1993**, 7, 777.
- [196] R. Edalji, T. J. Pilotmatias, S. D. Pratt, D. A. Egan, J. M. Severin, E. G. Gubbins, A. M. Petros, S. W. Fesik, N. S. Burres, T. F. Holzman, *J. Protein Chem.* **1992**, 11, 213.
- [197] J. J. Siekierka, G. Wiederrecht, J. Cryan, S. H. Y. Hung, M. Comisky, N. H. Sigal, *Transplant. Proc.* **1991**, 23, 2720.
- [198] D. Marquisomer, G. Sanyal, D. B. Volkin, A. I. Marcy, H. K. Chan, J. A. Ryan, C. R. Middaugh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 179, 741.
- [199] D. A. Egan, T. M. Logan, H. Liang, E. Matayoshi, S. W. Fesik, T. F. Holzman, *Biochemistry* **1993**, 32, 1920.
- [200] J. P. Steiner, T. M. Dawson, M. Fotuhi, C. E. Glatt, A. M. Snowman, N. Cohen, S. H. Snyder, *Nature* **1992**, 358, 584; M. Asami, T. Kuno, H. Mukai, C. Tanaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 192, 1388.
- [201] N. H. Sigal, J. J. Siekierka, F. J. Dumont, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, 40, 2201.
- [202] M. Kobayashi, K. Ohtsuka, K. Tamura, K. Ohara, S. Fujihira, Y. Hirano, C. Kusunoki, M. Hayashi, S. Satoh, N. Katayama, T. Tsutsumi, K. Nakamura, M. Niwa, M. Kohsaka, *Transplant. Proc.* **1993**, 25, 655.
- [203] Q. Xu, M. C. Leiva, S. A. Fischkoff, R. E. Handschumacher, C. R. Lyttle, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 11968; M. C. Leiva, C. R. Lyttle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 186, 1178.
- [204] T. E. Starzl, S. L. Schreiber, M. W. Albers, K. A. Porter, C. S. Foglieni, A. Francavilla, *Transplantation* **1991**, 52, 751.
- [205] B. F. Erlanger, *Immunol. Today* **1993**, 14, 369.
- [206] P. L. Koser, W. K. Eng, M. J. Bossard, M. M. McLaughlin, R. Cafferkey, G. M. Sathe, L. Faucette, M. A. Levy, R. K. Johnson, D. J. Bergsma, G. P. Livi, *Gene* **1993**, 129, 159.
- [207] J. Heitman, N. R. Movva, P. C. Hiestand, M. N. Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 1948.
- [208] J. Kunz, R. Henriquez, U. Schneider, M. Deuterreinhard, N. R. Movva, M. N. Hall, *Cell* **1993**, 73, 585.
- [209] J. A. Partaleadis, V. Berlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 5450.
- [210] T. Hultsch, M. W. Albers, S. L. Schreiber, R. J. Hohman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 6229.
- [211] S. Riviere, A. Menez, A. Galat, *FEBS Lett.* **1993**, 315, 247.
- [212] I. Callebaut, J. M. Renoir, M. C. Lebeau, N. Massol, A. Burny, E. E. Baulieu, J. P. Mornon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 6270; N. Massol, M. C. Lebeau, J. M. Renoir, L. E. Faber, E. E. Baulieu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 187, 1330.
- [213] G. Wiederrecht, S. Hung, H. K. Chan, A. Marcy, M. Martin, J. Calaycay, D. Boulton, N. Sigal, R. L. Kincaid, J. J. Siekierka, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 21753; V. A. Ruff, A. W. Yem, P. L. Munns, L. D. Adams, I. M. Reardon, M. R. Deibel, K. L. Leach, *ibid.* **1992**, 267, 21285.
- [214] Y. M. Ning, E. R. Sanchez, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 6073.
- [215] J. Hacker, G. Fischer, *Mol. Microbiol.* **1993**, 10, 445.
- [216] R. Marre, J. Hacker, *BioEngineering* **1992**, 1, 60.
- [217] N. P. Cianciotto, B. I. Eisenstein, C. H. Mody, G. B. Toews, N. C. Engleberg, *Infect. Immun.* **1989**, 57, 1255.
- [218] B. Ludwig, J. Rahfeld, B. Schmidt, E. Wintermeyer, G. Fischer, J. Hacker, *FEMS Lett.*, im Druck.
- [219] J. M. Moore, D. A. Peattie, M. J. Fitzgibbon, J. A. Thomson, *Nature* **1991**, 351, 248.
- [220] S. T. Park, R. A. Aldape, O. Futer, M. T. Decenzo, D. J. Livingston, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 3316.
- [221] S. W. Michnick, M. K. Rosen, T. J. Wandless, M. Karplus, S. L. Schreiber, *Science* **1991**, 252, 836.
- [222] J. G. Donnelly, S. J. Soldin, *Transplant. Proc.* **1991**, 23, 2886.
- [223] T. D. Ocain, D. Longhi, R. J. Steffan, R. G. Caccese, S. N. Sehgal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 192, 1340.
- [224] D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, 262, 1019.
- [225] P. R. Connelly, J. A. Thomson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 4781.
- [226] B. E. Bierer, P. K. Somers, T. J. Wandless, S. J. Burakoff, S. L. Schreiber, *Science* **1990**, 250, 556.
- [227] R. V. Bundick, D. K. Donald, R. P. Eady, R. Hutchinson, R. W. Keogh, J. A. Schmidt, E. Wells, *Transplantation* **1992**, 53, 1150.
- [228] G. D. van Duyn, R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber, J. Clardy, *J. Mol. Biol.* **1993**, 229, 105.
- [229] G. Fischer, G. Oehme, A. Schellenberger, *Tetrahedron* **1971**, 27, 5683.
- [230] Y. Namiki, N. Kihara, S. Koda, K. Hane, T. Yasuda, *J. Antibiot.* **1993**, 46, 1149.
- [231] D. K. Donald, M. E. Cooper, M. Furber, E. Wells, R. Hutchinson, F. M. Black, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1375.
- [232] D. M. Armistead, J. S. Boger, J. O. Saunders, R. D. Tung US-B 92/00278.
- [233] J. P. Duffy US-B 92/21313.
- [234] J. R. Hauske, P. Dorff, S. Julin, J. Dibrino, R. Spencer, R. Williams, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 4284.
- [235] K. Nadeau, A. Das, C. T. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 1479.
- [236] J. Friedman, M. Trahey, I. Weissman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 6815.
- [237] J. A. McNew, K. Sykes, J. M. Goodman, *Mol. Biol. Cell* **1993**, 4, 223.
- [238] S. Fields, O. Song, *Nature* **1992**, 340, 245.
- [239] J. Luban, K. L. Bossolt, E. K. Franke, G. V. Kalpana, S. P. Goff, *Cell* **1993**, 73, 1067.
- [240] M. A. Wainberg, A. Dascal, N. Blain, L. Fitz Gibbon, F. Boulterice, K. Numazaki, M. Tremblay, *Blood* **1988**, 72, 1904; A. Karpas, M. Lowdell, S. K. Jacobson, F. Hill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 8351.
- [241] J. H. Collins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 178, 1288; T. Jayaraman, A. M. Brillantes, A. P. Timerman, S. Fleischer, H. Erdjumbentbramage, P. Tempst, A. R. Marks, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 9474; A. P. Timerman, E. Ogubumni, E. Freund, G. Wiederrecht, A. R. Marks, S. Fleischer, *ibid.* **1993**, 268, 22992.
- [242] F. L. Texter, D. B. Spencer, R. Rosenstein, C. R. Matthews, *Biochemistry* **1992**, 31, 5687.
- [243] J. T. Gerig, *Biopolymers* **1971**, 10, 2435.
- [244] A. Radzicka, S. A. Acheson, R. Wolfenden, *Bioorg. Chem.* **1992**, 20, 382; E. S. Eberhardt, S. N. Loh, A. P. Hinck, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5437.
- [245] G. Fischer, E. Berger, H. Bang, *FEBS Lett.* **1989**, 250, 267.
- [246] R. K. Harrison, R. L. Stein, *Biochemistry* **1990**, 29, 1684.
- [247] G. Fischer, *Nova Acta Leopold.* **1989**, 61, 35.
- [248] J. Liu, M. W. Albers, C. M. Chen, S. L. Schreiber, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 2304.
- [249] R. A. Aldape, O. Futer, M. T. Decenzo, B. P. Jarrett, M. A. Murcko, D. J. Livingston, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 16029.
- [250] R. E. Morris, *Immunol. Today* **1991**, 12, 137.
- [251] J. Chung, C. J. Kuo, G. R. Crabtree, J. Blenis, *Cell* **1992**, 69, 1227.
- [252] C. J. Kuo, J. K. Chung, D. F. Fiorentino, W. M. Flanagan, J. Blenis, G. R. Crabtree, *Nature* **1992**, 358, 70.
- [253] D. J. Price, J. R. Grove, V. Calvo, J. Avruch, B. E. Bierer, *Science* **1992**, 257, 973.
- [254] S. M. Hatfield, J. S. Mynderse, N. W. Roehm, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, 261, 970.
- [255] P. G. McCaffrey, C. Luo, T. K. Kerppola, J. Jain, T. Badalian, A. M. Ho, E. Burgeon, W. S. Lane, J. N. Lambert, T. Curran, G. L. Verdine, A. Rao, P. G. Hogan, *Science* **1993**, 262, 750.
- [256] P. G. McCaffrey, B. A. Perrino, T. R. Soderling, A. Rao, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 3747; J. Jain, P. G. McCaffrey, V. E. Valge-Archer, A. Rao, *Nature* **1992**, 356, 801.
- [257] F. J. Dumont, M. J. Staruch, S. L. Koprak, J. J. Siekierka, C. S. Lin, R. Harrison, T. Sewell, V. M. Kindt, T. R. Beattie, M. Wyratt, N. H. Sigal, *J. Exp. Med.* **1992**, 176, 751.
- [258] R. P. Meadows, D. G. Nettesheim, R. X. Xu, E. T. Olejniczak, A. M. Petros, T. F. Holzman, J. Severin, E. Gubbins, H. Smith, S. W. Fesik, *Biochemistry* **1993**, 32, 754; J. W. Becker, J. Rotonda, B. M. McKeever, H. K. Chan, A. I. Marcy, G. Wiederrecht, J. D. Hermes, J. P. Springer, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 11335.
- [259] J. Rotonda, J. J. Burbaum, H. K. Chan, A. I. Marcy, J. W. Becker, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 7607.
- [260] S. K. Swanson, T. Born, L. D. Zydowsky, H. Cho, H. Y. Chang, C. T. Walsh, F. Rusnak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3741; S. Elrouby, Y. Shi, G. H. Reem, *Clin. Exp. Immunol.* **1992**, 89, 136; V. L. Hsu, I. M. Armitage, *Biochemistry* **1992**, 31, 12778; M. K. Rosen, P. J. Belshaw, D. G. Alberg, S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 747.
- [261] R. E. Kaye, D. A. Fruman, B. E. Bierer, M. W. Albers, L. D. Zydowsky, S. I. Ho, Y. J. Jin, M. C. Castells, S. L. Schreiber, C. T. Walsh, S. J. Burakoff, K. F. Austen, H. R. Katz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 8542.
- [262] G. R. Flentke, E. Munoz, B. T. Huber, A. G. Plaut, C. A. Kettner, W. W. Bachovchin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 1556; T. Kubota, G. R. Flentke, W. W. Bachovchin, B. D. Stollar, *Clin. Exp. Immunol.* **1992**, 89, 192.
- [263] T. Zarndt, B. Janowski, K. Lang, G. Fischer, unveröffentlicht.
- [264] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27, 157.
- [265] H. Lilie, K. Lang, R. Rudolph, J. Buchner, *Protein Sci.* **1993**, 2, 1490.
- [266] S. Wöllner, G. Fischer, unveröffentlicht.