

Differenzielle Hemmung extra- und intrazellulärer Cyclophiline durch Cyclosporinderivate**

Miroslav Malešević, Jan Kühling, Frank Erdmann, Molly A. Balsley, Michael I. Bukrinsky, Stephanie L. Constant und Gunter Fischer*

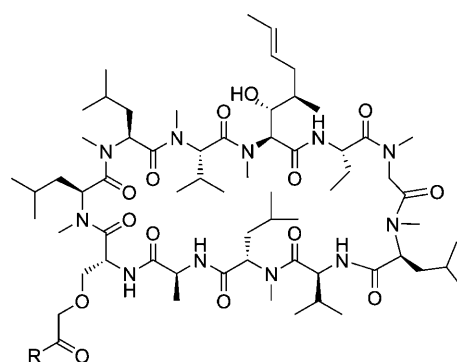
Eine der Herausforderungen bei der pharmakologischen Hemmung von Enzymen ist die Gewährleistung der Isoenzym- und Ortsselektivität der eingesetzten Inhibitoren. Cyclosporin A (CsA) verkörpert einen in diesem Sinne nicht-selektiven, aber hochpotenten Inhibitor für Cyclophiline (Cyp) aus der Enzymklasse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen, EC 5.2.1.8), der weder zwischen extra- und intrazellulären Cyclophilinen noch zwischen verschiedenen menschlichen Cyclophilin-Isoformen unterscheiden kann. Die Selektivität von CsA unter physiologischen Bedingungen, nach dessen Aufnahme in die Zelle, wird zusätzlich durch zwei differente funktionelle Auswirkungen begrenzt. CsA alleine bewirkt 1) die Blockade der katalysierten Konformationsänderungen von Prolylbindungen in Peptiden und Proteinen, und 2) der CypA/CsA-Komplex bindet unter Blockierung der Proteindephosphorylierungsaktivität an die Proteinphosphatase 2B (Calcineurin, CaN).^[1,2] Die CaN-Inhibierung wird als Ursache für die therapeutische, immunsuppressive Wirkung von CsA in der Transplantationsmedizin und bei Autoimmunkrankheiten angesehen.^[3] Im Organismus wird appliziertes CsA bei 37°C schnell von der Zelle aufgenommen und liegt dort^[4,5] hauptsächlich als intrazellulärer Cyclophilin/CsA-Komplex vor.^[6] Im menschlichen Blut ist Cyclophilin A (CypA) mit 0.19 µM die in der höchsten Konzentration vorkommende PPIase.^[7] Wahrscheinlich bildet diese Isoform den hauptsächlichen intrazellulären Bindepartner von CsA im Organismus.

Hier stellen wir eine Strategie zur differenziellen Hemmung von extrazellulären und intrazellulären Cyclophilinen vor. Dabei gehen wir von der hochpotenten PPIase-inhibitorischen Grundstruktur des CsA aus, das an Aminosäurerest 8 mit zwei molekularen Zusatzfunktionen ausgerüstet wurde. Diese Substitutionen dienen dazu, das CsA-Derivat im Zellverband fluoreszenzspektroskopisch zu lokalisieren

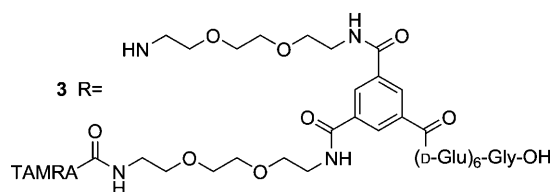
und dessen inhibitorische Wirkung auf Cyclophiline im extrazellulären Raum zu beschränken.

Wir konzentrierten uns bei der Suche nach einem effizienten, nicht zellgängigen CypA-Inhibitor auf eine Modifizierung der Seitenkette von [D-Ser⁸]-CsA. Neben dem [D-Ser⁸]-CsA-Kopf sollten zwei zusätzliche funktionelle Module nach kovalenter Verknüpfung über eine trifunktionelle Zentraleinheit unabhängig voneinander wirken können, wobei eines der Zusatzmodule als Fluoreszenzsonde und das andere als Permeationsblocker fungieren sollte. Als Positivkontrolle diente das Derivat **1**, für das fluoreszenzspektroskopisch eine hohe Zellgängigkeit nachweisbar war. Unser Ansatz für ein nicht zellgängiges Analogon von **1** beruht auf der Hypothese, dass selbst große, räumlich voneinander getrennte funktionelle Reste in der Seitenkette von [D-Ser⁸]-CsA die hochaffine Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum von CypA unbeeinflusst lassen, weil diese Position im Cyclosporin-Ring zwischen der CypA- und der CaN-Bindedomäne lokalisiert ist.^[8]

Die Zentraleinheit von **3** ist ein Trimesinsäuretriamid, dessen Seitenketten mit 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin (5(6)-carboxy-TAMRA) als Fluoreszenzsonde und einem [D-Ser⁸]-CsA-Derivat funktionalisiert wurden. Um die Affinität des Cyclosporinteils für die Phospholipidmembran zu kompensieren, wurde ein stark negativ geladener Peptidrest



- 1** R=NH(CH₂)₅NHC(=O)TAMRA
2 R=(D-Glu)₆-Gly-OH



[*] Dr. M. Malešević, J. Kühling, Dr. F. Erdmann, Prof. Dr. G. Fischer
 Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
 Weinbergweg 22, 06120 Halle (Deutschland)
 E-Mail: fischer@enzyme-halle.mpg.de

Dr. M. A. Balsley, Prof. Dr. M. I. Bukrinsky, Prof. Dr. S. L. Constant
 The George Washington University, Department of Microbiology,
 Immunology and Tropical Medicine
 2300 Eye Street NW, Washington, DC 20037 (USA)

[**] Dieses Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 610) und den National Institutes of Health (AI067254) unterstützt. Die Autoren danken Dr. Helton Santiago für technische Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200904529> zu finden.

(H-(D-Glu)₆-Gly-OH) N-terminal als Amid an den verbliebenen dritten Carboxylatarm der Trimesinsäure gekuppelt. Während kovalent angeknüpfte (Oligo-Glu)-Reste die Permeationsfähigkeit von Peptiden erhöhen,^[9,10] bietet die hohe Lipophilie des CsA im Zusammenhang mit dessen speziellem Transportmechanismus eine aussichtsreiche Basis für ein nicht zellgängiges Molekül.

Hier berichten wir über die Synthese und die funktionelle Charakterisierung der nicht zellgängigen Verbindung **3**. Insbesondere zeigen wir, dass **3** die über extrazelluläres CypA vermittelte Chemotaxis von Concanavalin(ConA)-aktivierten Maus-CD4⁺-T-Zellen inhibieren kann. Gleichzeitig hat **3** die für das nach Applikation intrazellulär lokalisierte [D-Ser⁸]-CsA typische immunsuppressive Wirkung verloren.

Die Synthese von **1** beruht auf der Verknüpfung von [O-(NH₂(CH₂)₅NHC(O))CH₂-D-Ser⁸]-CsA^[8] mit durch HATU aktiviertem 5(6)-Carboxy-TAMRA. Zur Synthese von **3** wurde zuerst mithilfe von Standardverfahren der Festphasenpeptidchemie ein [H-(D-Glu(OtBu))₆-Gly]-Wang-Harz aufgebaut. Dann wurde ein orthogonal Trt- und Fmoc-geschütztes Trimesinsäurederivat^[11] mit PyBOP aktiviert und an das Peptid gekuppelt. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde entfernt, und 5(6)-Carboxy-TAMRA wurde angefügt. Danach wurde der Baustein vom Harz abgespalten, gereinigt und schließlich mit [O-Carboxymethyl-D-Serin⁸]-CsA^[12] zu **3** verknüpft.

Im PPIase-Aktivitätstest inhibierte **3** reversibel hCypA und hCypB mit K_i-Werten von (1.8 ± 0.6) bzw. (1.3 ± 0.5) nM. Auch **1** erzielte mit K_i-Werten von (4.3 ± 0.5) bzw. (12.0 ± 2.8) nM (Abbildung S1) eine wirksame Hemmung der PPIase-Aktivität. Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen erhielten wir für CsA selbst K_i-Werte von (8.4 ± 2.5) bzw. (6.9 ± 2.1) nM. Zur Kontrolle haben wir eine Verbindung untersucht, die den [Ser⁸]-CsA-Teil von **3** nicht enthielt. Wie erwartet zeigte diese Verbindung in einer Konzentration von 1.0 μM keinen Einfluss auf die PPIase-Aktivität der Cyclophilinen. Sowohl CypA/**1**- als auch CypA/**3**-Komplexe inhibierten in vitro die CaN-Aktivität in einem RII-Phosphopeptid-Dephosphorylierungsexperiment mit IC₅₀-Werten von (0.8 ± 0.1) bzw. (26.2 ± 1.2) μM (Abbildung S2).

Zusammengenommen führten diese Ergebnisse zu der Vermutung, dass **1** und **3** durch ihre hohe Affinität zu Cyclophilinen intrazellulär lokalisiert sein könnten. Tatsächlich bestätigte eine Untersuchung mit konfokaler Laser-Rastermikroskopie, dass in Jurkat-Zellen, deren Nährmedium 500 nM **1** enthielt, ein starkes TAMRA-Fluoreszenzsignal innerhalb, nicht aber außerhalb der Zellen auftrat. Eine solche Signalverteilung ist für ein zellgängiges Derivat zu erwarten, das sich intrazellulär als CypA/**1**-Komplex im Zytosol anreichert (Abbildung 1b). Bei der Untersuchung mit dem gleichen experimentellen Ansatz verblieb **3** dagegen vollständig außerhalb der Zellen, ohne Zeichen einer intrazellulären Lokalisierung (Abbildung 1e). Eine Studie mit **1** und CypA-defizienten Zellen zeigte erwartungsgemäß eine schwächere intrazelluläre Anreicherung, während **3** auch in diesem Fall nicht in das Zellinnere eindringen konnte (Abbildung 2). Bei Untersuchungen der gleichen Transportprozesse mithilfe von Durchflusszytometrie ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Fluoreszenz von unbehandelten und mit **3**

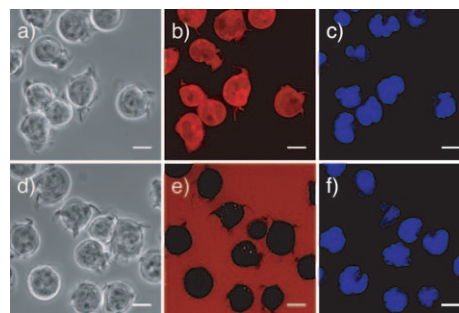


Abbildung 1. Jurkat-Zellen wurden 3 h mit 500 nM **1** (a–c) oder **3** (d–f) in einem Brutschrank mit 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C inkubiert und mit konfokaler Laserrastermikroskopie (b, c, e, f) und Durchlichtmikroskopie (a, d) untersucht. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (c, f). Maßstab 10 μm.

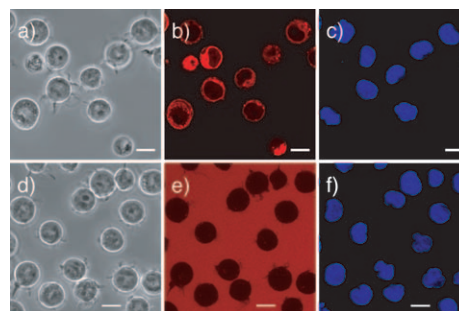


Abbildung 2. Humane CypA-/Jurkat-Zellen wurden 3 h mit 500 nM **1** (a–c) oder **3** (d–f) in einem Brutschrank mit 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C inkubiert und mit konfokaler Laserrastermikroskopie (b, c, e, f) und Durchlichtmikroskopie (a, d) untersucht. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (c, f). Maßstab 10 μm.

behandelten Jurkat-Zellen, wodurch das Aufnahmevermögen für **3** auf < 1 % der Konzentration im Medium eingeschränkt werden kann (Abbildung S3).

Um zu prüfen, ob der positiv geladene Rhodamin-Rest entscheidend für die Inhibition der Zellaufnahme von **3** ist, haben wir **2** synthetisiert; bei diesem Derivat ist die terminale Aminogruppe von (D-Glu)₆-Gly-OH direkt an die Carboxygruppe von [O-Carboxymethyl-D-Ser⁸]-CsA gebunden. Diese Verbindung wies mit einem K_i-Wert von (1.3 ± 0.2) nM ebenfalls eine hohe Affinität zu CypA auf. Die Zellaufnahme wurde in einem Konkurrenzexperiment bestimmt, bei dem zuvor mit **1** gesättigte Jurkat-Zellen untersucht wurden. Selbst bei 100-fachem Überschuss relativ zu **1** verdrängte **2** das Derivat **1** nicht aus dem Zytosol. Damit wurde gezeigt, dass die fehlende Zellgängigkeit von **2** und **3** auf die Gegenwart des stark negativ geladenen Rests zurückzuführen ist und nicht auf dessen Wechselwirkung mit dem positiv geladenen TAMRA.

Um die Immunsuppression durch **3** zu untersuchen, haben wir die Proliferation humaner Lymphozyten in einer MLR (mixed lymphocyte reaction;^[13] Abbildung 3a) und an ConA-stimulierten Maus-Milzlymphozyten^[14] (Abbildung 3b) untersucht. Während **1** immunsuppressiv wirkte, zeigte **3** keine Proliferationshemmung in Konzentrationen bis 10.0 μM. Nicht zellgängige CsA-Derivate wurden bisher durch Ver-

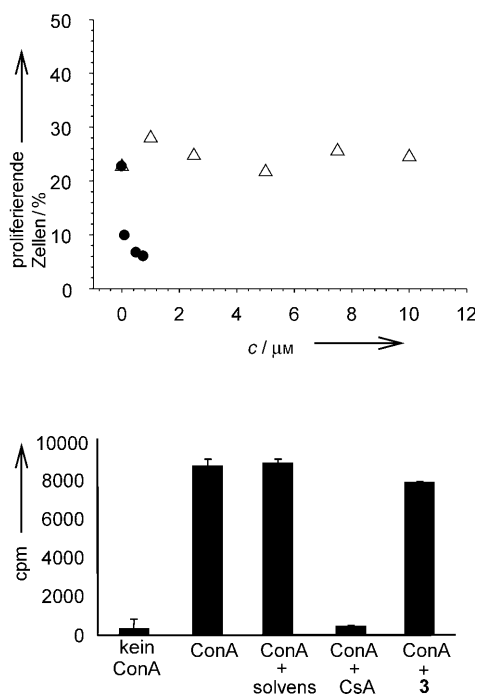


Abbildung 3. a) MLR mit menschlichen PBMCs. Mit Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester (CFSE) markierte menschliche PBMCs von gesunden Blutspendern (5×10^5 Responder-Zellen) wurden mit **3** (Dreiecke) oder **1** (Kreise) inkubiert und mit allogenen PBMCs eines anderen Individuums (Stimulator-Zellen), die mit γ -Strahlung behandelt worden waren, stimuliert. Nach 5 Tagen in Kultur wurden die Proben am Durchflusszytometer analysiert. b) Proliferation ConA-stimulierter Milzlymphozyten. Maus-Milz-Zellen wurden 48 h aktiviert: in reinem Medium (kein ConA), mit ConA ohne Wirkstoff, mit ConA und Lösungsmittel (1 % Ethanol), $2.0 \mu\text{M}$ CsA, $2.0 \mu\text{M}$ **3**. ^3H -Thymidin wurde für die letzten 6 h Inkubation zugegeben. Die Einbaugeschwindigkeit von ^3H -Thymidin (Impulse pro Minute, cpm) ist proportional der Replikationsgeschwindigkeit und stellt den Mittelwert \pm Standardabweichung aus 6 Experimenten dar.

netzung von CsA mit Makromolekülen wie Aminodextran-Kügelchen oder Ovalbumin hergestellt.^[15] Obwohl mit diesen Konstrukten eine Inhibierung der IL-2-Produktion in Phorbol-ester-aktivierten EL-4-Zellen und in ConA-aktivierten, T-Zell-angereicherten Maus-Milzzellen beobachtbar war, ist die Interpretation der Daten durch die mögliche Freisetzung niedermolekularer, zellgängiger Cyclosporine aus den makromolekularen Wirkstoffen erschwert.

Um die Stabilität von **3** bei Inkubation mit Maus- und fötalem Kälberserum zu bestimmen, wurden HPLC-Profile zeitabhängig gemessen (Abbildung S4). Die nach 48 h Inkubation bei 37°C nahezu unveränderten Profile belegen die Stabilität gegen chemischen und enzymatischen Abbau, was ausschließt, dass bei Langzeitinkubationen durch eine Fragmentierung von **3** eine Immunsuppression zu erwarten ist. Diese Stabilität unter physiologischen Bedingungen ist in Einklang mit dem fehlenden Einfluss der Verbindung auf die Proliferation von Lymphozyten (Abbildung 3).

Extrazelluläre Cyclophiline sind in die Neuroprotektion,^[16] die Differenzierung von Epithelzellen^[17] und in die Funktion verschiedener Signalrezeptoren eingebunden. Bei der Migration von Blutzellen greifen sie am extrazellulären

Teil des Rezeptorproteins CD147 an.^[18] Um zu prüfen, inwieweit **3** die Migration von Leukozyten hemmen kann, wurden Maus-CD4⁺-T-Zellen wie beschrieben^[14] aufgereinigt und in Gegenwart von **3** mit CypA stimuliert. In Abbildung 4 ist dargestellt, dass **3** die CypA-vermittelte Chemotaxis fast auf den Basalwert absenken kann. Die Spezifität im Wirkungsmechanismus von **3** ergibt sich daraus, dass die RANTES-induzierte Leukozytenmigration nicht beeinflusst wird.

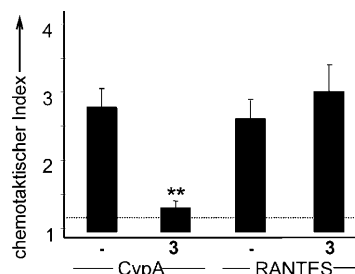


Abbildung 4. Maus-Milzzellen wurden über Nacht mit ConA behandelt. Aktivierte CD4⁺-T-Zellen wurden dann durch MACS-Trennung isoliert und in einer Boyden-Kammer bezüglich ihren chemotaktischen Eigenschaften untersucht. Die Zellmigration wurde entweder mit CypA (100 ng mL^{-1}) oder RANTES (1 ng mL^{-1}) jeweils mit und ohne $2.0 \mu\text{M}$ **3** induziert. Die Ergebnisse stellen den mittleren chemotaktischen Index (Mittelwert \pm Standardabweichung) für jeweils 5–6 unabhängige Experimente dar. Oberhalb der gepunkteten Linie (> 1.2) ist der gemessene Einfluss auf den chemotaktischen Index signifikant. ** = statistische Differenz mit $p < 0.01$ nach Student-t-Test.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass ein wirksamer, nicht zellgängiger Hemmstoff für Cyclophiline in Form eines seitenkettenmodifizierten [D-Ser⁸]-CsA-Derivats synthetisiert werden kann. Ein Trimesinsäuretriamid stellt die zentrale Vernüpfungseinheit dar, an der ein D-Glutaminsäure-Hexamer und 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin als Fluoreszenzsonde kovalent gebunden sind. Anders als bisher klinisch verwendete oder dafür ins Auge gefasste Cyclosporine reichern sich diese spezifisch extrazellulären Inhibitoren nicht als Komplexpartner der teilweise in hohen Konzentrationen vorhandenen intrazellulären Cyclophiline in der Zelle an. Dadurch können diese Inhibitoren bei der Beschreibung der Rolle von extrazellulären Cyclophilinen insbesondere bei chronischen Entzündungsprozessen auf molekularer Ebene hilfreich sein.

Eingegangen am 13. August 2009

Online veröffentlicht am 2. Dezember 2009

Stichwörter: Cyclophilin · Cyclosporin · Immunsuppression · Zellgängigkeit

[1] P. Wang, J. Heitman, *Genome Biol.* **2005**, 6, 226.

[2] G. Fischer, T. Aumüller, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2004**, 148, 105.

[3] L. Mascarell, P. Truffa-Bachi, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, 3, 205.

[4] U. Schramm, G. Fricker, R. Wenger, D. S. Miller, *Am. J. Physiol.* **1995**, 268, 46.

- [5] P. F. Augustijns, S. C. Brown, D. H. Willard, T. G. Consler, P. P. Annaert, R. W. Hendren, T. P. Bradshaw, *Biochemistry* **2000**, 39, 7621.
- [6] N. Shibata, H. Shimakawa, T. Minouchi, A. Yamaji, *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, 16, 702.
- [7] F. Allain, C. Boutillon, C. Mariller, G. Spik, *J. Immunol. Methods* **1995**, 178, 113.
- [8] Y. X. Zhang, F. Erdmann, R. Baumgrass, M. Schutkowski, G. Fischer, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 4842.
- [9] M. Behe, G. Kluge, W. Becker, M. Gotthardt, T. M. Behr, *J. Nucl. Med.* **2005**, 46, 1012.
- [10] M. Chittchang, A. K. Mitra, T. P. Johnston, *Pharm. Res.* **2007**, 24, 502.
- [11] M. Malesevic, C. Lücke, G. Jahreis, *Peptides 2004, Proceedings of the Third International and Twenty-Eighth European Peptide Symposium*, Kenes International, Israel, **2005**, S. 391.
- [12] M. K. Eberle, P. Hiestand, A.-M. Jutzi-Eme, F. Nuninger, H. R. Zihlmann, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1853.
- [13] Y. Tanaka, H. Ohdan, T. Onoe, H. Mitsuta, H. Tashiro, T. Itamoto, T. Asahara, *Transplantation* **2005**, 79, 1262.
- [14] W. M. Gwinn, J. M. Damsker, R. Falahati, I. Okwumabua, A. Kelly-Welch, A. D. Keegan, C. Vanpouille, J. J. Lee, L. A. Dent, D. Leitenberg, M. Bukrinsky, S. L. Constant, *J. Immunol.* **2006**, 177, 4870.
- [15] N. A. Cacalano, B. X. Chen, W. L. Cleveland, B. F. Erlanger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 4353.
- [16] S. Boulos, B. P. Meloni, P. G. Arthur, B. Majda, C. Bojarski, N. W. Knuckey, *Neurobiol. Dis.* **2007**, 25, 54.
- [17] H. Peng, S. Vijayakumar, C. Schiene-Fischer, H. Li, J. M. Purkerson, M. Malesevic, J. Liebscher, Q. Al-Awqati, G. J. Schwartz, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 6465.
- [18] V. Yurchenko, S. Constant, M. Bukrinsky, *Immunology* **2006**, 117, 301.