

# Thèse

présentée à

L'Université des Sciences et Technologies de Lille

pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université**

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

par

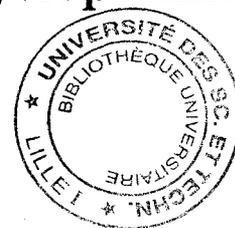
**Christophe Mariller**



## Etude de la cyclophiline B :

Purification et caractérisation de la cyclophiline B du  
lait de Femme

Détermination du site d'interaction de la cyclophiline B  
avec son récepteur lymphocytaire



Soutenance le 15 Décembre 1995 devant la commission d'examen :

- Président** : Professeur André VERBERT
- Rapporteurs** : Docteur Bernard HAENDLER  
Professeur Bernard RYFFEL
- Examineurs** : Professeur Gunter FISCHER  
Professeur Pierre DEGAND  
Professeur Geneviève SPIK



**Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à :**

Madame le Professeur Geneviève SPIK pour m'avoir accueilli au sein de son groupe

Monsieur le Professeur André VERBERT pour avoir accepté de présider cette thèse

Monsieur le docteur Bernard HAENDLER pour toute l'aide qu'il a su m'apporter dans ce travail

Monsieur le Professeur Bernard RYFFEL pour l'intérêt porté à ces travaux

Monsieur le Professeur Pierre DEGAND pour son enthousiasme convaincant sur le rôle de la cyclophiline B

Monsieur le Professeur FISCHER pour avoir accepté de juger ce manuscrit

Monsieur le Professeur jean MONTREUIL pour m'avoir « orienter » vers le Laboratoire de Chimie Biologique

Fabrice ALLAIN et Agnès DENYS qui ont aussi participé à l'envol de la cyclophiline B.

I. Introduction	110
II. Résultats	110
« Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form »	111
III. Conclusion	133
<b>SITE D'INTERACTION DE LA CYCLOPHILINE B AVEC LE RÉCEPTEUR</b>	
LYMPHOCYTAIRE .....	134
I. Introduction	134
II. Résultats	134
« Involvement of the N-terminal part of cyclophilin B in the interaction with its receptor on Jurkat T-cells »	136
III. Conclusion	159
CONCLUSION GENERALE .....	163
APPENDICE TECHNIQUE.....	170
I. Purification de la cyclophiline B à partir du lait de Femme	170
II. Production de la cyclophiline B recombinante et des cyclophilines B mutantes	171
A. Cultures des bactéries transformées	171
B. Purification de la cyclophiline B recombinante	171
III. Analyse des protéines	172
A. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS	172
B. Electrotransfert sur membrane de cellulose	172
C. Détection des protéines transférées par immunorévélation	173
D. Détection de la cyclophiline B par la méthode ELISA	173
BIBLIOGRAPHIE .....	174

4. L'ouverture du pore de la membrane interne de la mitochondrie	80
5. La protéine Gag du HIV de type 1	81
6. Les protéines qui interagissent avec la cyclophiline B	82
a) La « calcium-signal modulating cyclophilin ligand » (CAML)	82
b) Le récepteur lymphocytaire	83
<b>C. Autres activités</b>	84
1. Cyclophiline B et activité mitogène	84
2. Intervention d'une cyclophiline dans le phénomène d'apoptose	84
3. Le chimiotactisme des cyclophilines	84
<b>II. Activités biologiques des « FK506-Binding Proteins »</b>	85
<b>A. Interaction avec d'autres protéines</b>	86
1. Le FKBP12	85
2. Le FKBP25	86
3. Les FKBP52 et FKBP54	86
<b>B. inhibition de la prolifération</b>	86
<b>CONCLUSION .....</b>	87
<b>TRAVAUX PERSONNELS.....</b>	88
<b>PURIFICATION DE LA CYCLOPHILINE B DU LAIT DE FEMME.....</b>	88
<b>I. Introduction</b>	88
<b>II. Travaux antérieurs</b>	88
<b>III. Purification de la cyclophiline B à partir du lait de Femme</b>	89
<b>« A novel secreted cyclophilin--like protein (SCYLP) »</b>	90
<b>IV. Protocole de purification de la cyclophiline B</b>	105
<b>V. Conclusion</b>	105
<b>ETUDE LA FORME SECRETEE DE LA CYCLOPHILINE B .....</b>	110

<b>LES PEPTIDYL PROLYL CIS-TRANS ISOMERASES ET</b>	
<b>L'IMMUNOSUPPRESSION.....</b>	<b>55</b>
<b>I. Pourquoi l'immunosuppression?</b>	<b>55</b>
<b>A. Bases moléculaires de la phase de sensibilisation</b>	<b>56</b>
<b>B. Migration des lymphocytes sensibilisés</b>	<b>61</b>
<b>C. Mécanismes effecteurs</b>	<b>61</b>
<b>D. Importance des traitements immunosuppresseurs</b>	<b>62</b>
<b>II. Les immunosuppresseurs impliquant des peptidyl prolyl cis-trans isomérases</b>	<b>64</b>
<b>A. La cyclosporine A et le FK506</b>	<b>64</b>
<b>B. La rapamycine</b>	<b>66</b>
<b>FONCTIONS DES PEPTIDYL PROLYL CIS-TRANS ISOMERASES.....</b>	<b>68</b>
<b>I. Activités des cyclophilines dans l'environnement cellulaire</b>	<b>68</b>
<b>A. Cyclophiline et calcineurine</b>	<b>68</b>
1. <i>Inhibition de la voie calcium-dépendante</i>	<b>68</b>
a) <i>La calcineurine : une cible pour les complexes immunosuppresseurs</i>	<b>68</b>
b) <i>Le complexe cyclophiline/cyclosporine/calcineurine à l'origine de l'immunosuppression</i>	<b>70</b>
c) <i>Organisation du complexe immunosuppresseur</i>	<b>71</b>
(1) <i>Identification du site d'interaction de la calcineurine</i>	
(2) <i>La cyclophiline et la cyclosporine forment une surface composite</i>	
d) <i>Les substrats de la calcineurine sensibles à l'immunosuppression</i>	<b>75</b>
2. <i>Les complexes immunophilines/calcineurine en absence d'immunosuppresseurs : un rôle pour ces immunophilines?</i>	<b>76</b>
<b>B. Interactions avec d'autres protéines</b>	<b>77</b>
1. <i>Un ligand pour la CyPC : la protéine CyCAP</i>	<b>77</b>
2. <i>Le complexe du récepteur aux stéroïdes</i>	<b>78</b>
3. <i>La maturation de la rhodopsine</i>	<b>79</b>

<b>C. Les Parvulines</b>	29
<b>II. Caractéristiques structurales des peptidyl prolyl cis-trans isomérasés et de leurs complexes</b>	30
<b>A. Structure des cyclophilines et du complexe cyclophiline/CsA</b>	30
1. Structure des cyclophilines	30
2. Structure du complexe cyclophiline/cyclosporine A	34
a) Structure de la cyclosporine A en solution	34
b) Interaction de la CsA avec la cyclophiline	35
<b>B. Structure des FKBP(s) et des complexes FKBP(s)/FK506 et FKBP(s)/rapamycine</b>	40
<b>III. L'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique</b>	41
<b>A. Importance des résidus de proline</b>	41
1. Structure de la proline	41
2. Rôle des résidus de proline dans les protéines	43
3. Importance des résidus de proline dans la mise en conformation des protéines	44
<b>B. Mécanisme d'action des peptidyl prolyl cis-trans isomérasés</b>	44
1. Mécanisme d'action des peptidyl prolyl cis-trans isomérasés	44
2. Spécificité des peptidyl prolyl cis-trans isomérasés	46
3. Paramètres cinétiques de la réaction de prolyl isomérisation	46
<b>C. Démonstration in vitro et in vivo de l'activité des peptidyl prolyl cis-trans isomérasés</b>	48
1. L'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique in vitro	48
2. Intervention des peptidyl prolyl cis-trans isomérasés in vivo	50
a) La mise en conformation des protéines dans l'environnement cellulaire	50
b) Intervention de l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique dans la mise en conformation in vivo des protéines	52

INTRODUCTION .....	6
GENERALITES.....	9
LA FAMILLE DES PEPTIDYL PROLYL CIS-TRANS ISOMERASES .....	10
<b>I. Les différentes peptidyl prolyl cis-trans isomérase</b>	10
<b>A. Les cyclophilines</b>	10
1. Les différentes cyclophilines	11
a) Les cyclophilines solubles	11
(1) La cyclophiline A	
(2) La cyclophiline B	
(3) La cyclophiline C	
(4) La cyclophiline D	
(5) La cyclophiline 40 ou ERBC	
(6) Les autres cyclophilines solubles	
(7) Analyse de la séquence des principales cyclophilines solubles	
b) Les cyclophilines membranaires	20
(1) La protéine « Natural Killer cell Tumor Recognition molecule » (NK-TR)	
(2) La protéine ninaA	
(3) La cyclophiline associée à la membrane interne de la mitochondrie	
(4) Les autres cyclophilines membranaires	
c) Les cyclophilines chez les organismes inférieurs	24
(1) Chez les eucaryotes inférieurs	
(2) Chez les procaryotes	
(3) Chez les plantes	
d) Conclusion	26
<b>B. Les «FK506-binding proteins»</b>	28
a) Le FKBP12	28
b) Le FKBP13	28
c) Le FKBP25	28
d) Le FKBP52 (p59)	29
e) Le FKBP54	29

# Introduction

---

Les cyclophilines constituent une famille de protéines ubiquitaires. Ce sont des enzymes possédant une activité très particulière. En effet, elles sont capables de catalyser l'isomérisation cis-trans des liaisons peptidiques impliquant un résidu de proline. Ces protéines comportent plusieurs isoformes présentant des localisations différentes mais possédant de fortes homologues structurales et fonctionnelles. L'intérêt qu'ont suscité les cyclophilines vient de leur capacité à fixer la cyclosporine A, un peptide immunosuppresseur couramment employé dans la prévention du rejet de greffe. Les cyclophilines participent ainsi aux mécanismes de l'immunosuppression. C'est le complexe que forme la cyclosporine A avec la cyclophiline A, la plus abondante des cyclophilines chez l'Homme, qui est probablement à l'origine de l'immunosuppression. En effet, ce complexe est capable d'inhiber l'activité phosphatasique de la calcineurine, un enzyme nécessaire à l'activation des lymphocytes T lors de la phase précoce de la réponse immunitaire. D'autre part, l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique des cyclophilines a montré *in vitro* et indirectement *in vivo* qu'elle pouvait accélérer la mise en conformation de certaines protéines.

Les travaux menés au laboratoire sur la recherche de protéines d'intérêt biologique dans le lait de Femme ont conduit à la caractérisation d'une cyclophiline. Cette cyclophiline a ensuite été identifiée comme étant la cyclophiline B qui, jusqu'à présent, avait été décrite comme résidente du réticulum endoplasmique. La présence de cyclophiline B a aussi été montrée dans un autre liquide biologique, le sang. Nous avons purifié la cyclophiline B à partir du lait de Femme pour déterminer les caractéristiques de cette forme sécrétée. Nous avons ainsi montré que la cyclophiline B extracellulaire ne possédait plus la séquence C-terminale AIAKE. L'extrémité C-terminale de la cyclophiline B avait déjà été décrite par d'autres auteurs comme provoquant la rétention de la cyclophiline B dans des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique.

La présence de cyclophiline B dans le sang suggérait qu'elle pouvait interagir avec des protéines membranaires de cellules présentes dans ce milieu. Il a ainsi été montré au laboratoire l'existence d'un récepteur de la cyclophiline B à la surface des lymphocytes T circulants ou provenant de lignées cellulaires. La suite de nos travaux a consisté en la caractérisation du site d'interaction de la cyclophiline B avec son récepteur à la surface des cellules lymphoblastiques Jurkat. Nous avons ainsi pu montrer que la cyclophiline B

interagit avec ce récepteur par l'intermédiaire de son extrémité N-terminale. Les résidus d'acides aminés directement impliqués dans le site d'interaction sont certainement dans l'environnement proche du résidu Arg<sup>18</sup> de la cyclophiline B.

L'ensemble de ces résultats et les autres travaux du laboratoire sur la cyclophiline B suggèrent que la cyclophiline B pourrait être une protéine sécrétée agissant sur des cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes T.

Nos travaux sont à l'origine des publications et communications qui suivent.

## Publications

- Spik G., Haendler B., Delmas O., Mariller C., Chamoux M., Maes P., Tartar A., Montreuil J., Stedman K., Kocher H., Hiestand P.C. & Movva R.  
A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP) (1991)  
*J. Biol. Chem* **266**, 10735-10739
- Teteart D., Soudan B., Lo-Guidice J-M., Richet C., Degand P., Boussard G., Mariller C. & Spik G.  
Combination of high-performance anion-exchange chromatography and electrospray mass spectrometry for analysis of the *in vitro* O-glycosylated mucin motif peptide  
*J. Chromatog.* **658**, 31-38
- Allain F., Boutillon C., Mariller C. & Spik G. (1995)  
Selective assay for CyPA and CyPB in human blood by using highly specific anti-peptide antibodies.  
*J. Immunol. Meth.* **178**, 113-120
- Mariller C., Allain F., Kouach M. & Spik G.  
Evidence that human milk Cyclophilin B is secreted as a truncated form  
*Biochim. Biophys. Acta* sous presse
- Mariller C., Haendler B., Allain F., Denys A. & Spik G.  
Involvement of the N-terminal part of cyclophilin B in the interaction with its receptor on Jurkat T-cells  
soumis à *Biochem. J.*

## Communications par affiche

- XVIII<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, Tours, Septembre 1991 « Isolement et étude d'une nouvelle protéine de la famille des cyclophilines : l'exocyclophiline »

Colloque d'Automne de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, 2-4 Septembre 1991 « Isolement et étude d'une nouvelle protéine de la famille des cyclophilines : l'exocyclophiline »

- Colloque de Printemps de la Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Regard sur les Protéines, 7-10 Juin 1994, Marseille. « Mise en évidence dans le lait de Femme d'une forme tronquée de la cyclophiline B »

XXI<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs en Biochimie et Biologie Moléculaire, 5-8 Juillet 1994, Reims. « Mise en évidence dans le lait de Femme d'une forme tronquée de la cyclophiline B »

- XXIII<sup>ème</sup> Congrès de la FEBS, 13-18 Août 1995, « Evidence that human milk Cyclophilin B is secreted as a truncated form »

Ces travaux font partie d'un contrat Biomed de la Communauté Economique Européenne (n° BMH1-CT93-1748) dont l'intitulé est :

« Optimizing of cyclosporin immunosuppression: Role of the cyclosporin receptor and CD28 activation pathway for activity and toxicity »

# Généralités

---

## INTRODUCTION AUX GENERALITES

La cyclosporine (CsA), introduite sur le marché en 1983 a transformé le devenir des transplantations d'organes. Elle constitue le chef de file d'une nouvelle famille de molécules à activité immunosuppressive. Outre la CsA, cette famille inclut deux macrolides immunosuppresseurs : le FK506 et la rapamycine. Leur mode d'action nécessite qu'ils se lient spécifiquement à des protéines intracellulaires : les immunophilines. Ces protéines se trouvent alors impliquées dans le contrôle des voies de transduction conduisant à l'activation des lymphocytes T.

Ces immunophilines sont les cyclophilines (CyP) et les « FK506-binding proteins » (FKBP). Ce sont des protéines ubiquitaires très conservées au cours de l'évolution. Chacune de ces familles de protéines se décline en de nombreuses isoformes avec de fortes homologies de séquence mais des localisations et des fonctions divergentes.

Parallèlement à leur rôle dans l'immunosuppression, les cyclophilines et les FKBP sont capables de catalyser l'isomérisation des liaisons peptidiques impliquant des résidus de proline [Fischer *et al.* (1984); Harding *et al.* (1989)]. Avec les parvulines récemment décrites, elles constituent la famille des **peptidyl prolyl cis-trans isomérases**. L'activité enzymatique de ces protéines n'est pas impliquée dans les phénomènes d'immunosuppression, c'est la formation de complexes spécifiques avec les immunosuppresseurs [CyP(s)/CsA ou FKBP(s)/FK506] qui est responsable de l'inhibition de l'activation des lymphocytes T. Cette approche a permis de caractériser la cible de ces complexes : la **calcineurine**, une protéine-phosphatase impliquée dans la transduction du signal d'activation [Liu *et al.* (1991)].

En dehors de l'immunosuppression, de nombreux rôles commencent à être décrits pour les cyclophilines et les FKBP. Dans la plupart des cas, le site catalytique de ces protéines semble impliqué. La CsA, le FK506 et la rapamycine restent donc des outils de choix pour déterminer les fonctions des peptidyl prolyl cis-trans isomérases dans la cellule.

Les pages suivantes décrivent les connaissances actuelles sur les cyclophilines et les mécanismes dans lesquels elles sont impliquées. Un parallèle est établi avec les FKBP. En effet, ces deux familles de protéines possèdent des caractéristiques communes notamment l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérisique. Elles présentent d'autre part des convergences fonctionnelles en particulier, l'inhibition de la calcineurine.

## LA FAMILLE DES PEPTIDYL PROLYL CIS-TRANS ISOMERASES

La conformation cis ou trans de la liaison peptidique comprenant un résidu de proline est un facteur important qui conditionne le repliement et la conformation des protéines. L'isomérisation entre les formes cis et trans de cette liaison prend toute son importance lorsque l'on sait que la proline est le seul acide aminé possédant une conformation cis relativement stable.

Cette particularité structurale est à l'origine de la découverte d'une activité enzymatique capable d'accélérer l'interconversion entre les formes cis et trans de la proline (activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique) [Fischer *et al.* (1984)]. Cet enzyme s'est avéré être la cyclophiline A (CyPA), connue pour être la principale cible identifiée du peptide immunosuppresseur, la CsA [Fischer *et al.* (1989); Takahashi *et al.* (1989)].

Le FK506 a permis la découverte de la deuxième famille de peptidyl prolyl cis-trans isomérase : les « FK506-binding proteins » ou FKBP [Siekerka *et al.* (1989)] qui sont structurellement différentes des cyclophilines.

Découvertes récemment, les **parvulines** (ou PpiC) représentent l'émergence d'une troisième famille distincte de peptidyl prolyl cis-trans isomérase [Rahfeld *et al.* (1994b)]. Cependant, elles ne sont pas encore associées à une molécule immunosuppressive comme le sont les cyclophilines ou les FKBP.

### I. Les différentes peptidyl prolyl cis-trans isomérase

#### A. Les cyclophilines

Les protéines de la famille des cyclophilines se répartissent en deux groupes :

- les cyclophilines solubles
- les cyclophilines membranaires

Plusieurs cyclophilines possèdent des séquences particulières qui leur assignent une localisation subcellulaire spécifique (ex : cyclophiline D) ou leur permettent de rejoindre la voie de sécrétion (ex : cyclophiline B).

## 1. Les différentes cyclophilines

### a) Les cyclophilines solubles

#### (1) La cyclophiline A

La cyclophiline A (CyPA) est une protéine constituant la principale cible intracellulaire de la CsA. Elle a été isolée du cytosol de thymocytes bovins [Handschumacher *et al.* (1984)]. La séquence de la CyPA a été réalisée par séquençage chimique dans le cas de la CyPA bovine [Harding *et al.* (1986)], et par isolement de l'ADNc à partir d'une banque de cellules lymphoblastiques pour la CyPA humaine [Haendler *et al.* (1987)].

Fischer *et al.* (1989) ainsi que Takahashi *et al.* (1989) ont ensuite montré l'analogie de séquence entre la CyPA et une protéine de 18 kDa. Cette protéine de 18 kDa a été purifiée à partir du rein de porc. Elle possède une activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique [Fischer *et al.* (1984)].

La CyPA humaine est donc une protéine de 165 résidus d'acides aminés, de masse moléculaire de 18 kDa, et possédant une activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique [Haendler *et al.* (1987)].

De nombreuses études ont démontré la localisation cytosolique de la CyPA [Handschumacher *et al.* (1984); Ryffel *et al.* (1991); McDonald *et al.* (1992); Sarris *et al.* (1992)]. Elle représente 0,1% à 0,4% des protéines totales du cytosol. Elle est présente sous deux isoformes de pI 8,6 (majeur) et 6,8 (mineur) [Harding *et al.* (1986)]. Cette localisation unique est à moduler par les observations complémentaires obtenues par microscopie électronique et immunofluorescence. Ainsi, il a été observé une association de la CyPA aux membranes des mitochondries, du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi [McDonald *et al.* (1992); Sarris *et al.* (1992)]. La CyPA semble également associée à la membrane nucléaire. Sa présence dans le noyau a été décrite par Ryffel *et al.* (1991). Montague *et al.* (1994) ont de plus mis en évidence une activité nucléasique de la CyPA. Cependant ces résultats restent relativement contradictoires. En effet, McDonald *et al.* (1992) ainsi que Azhderian *et al.* (1993) n'ont pas retrouvé de CyPA dans le noyau.

La présence de CyPA a également été montrée dans le plasma [Ryffel *et al.* (1991)]. Cette observation n'a pas été confirmée [Allain *et al.* (1995)]. Par contre, la stimulation des

macrophages murins par des lipopolysaccharides (LPS) provoque la sécrétion de la CyPA. Il est difficile d'expliquer cette sécrétion car la CyPA ne possède pas de séquence signal. Cependant d'autres protéines (FGFa et b, IL-1 $\beta$ ) ne possédant pas de peptide signal sont connues pour être sécrétées [Sherry *et al.* (1992)].

En dernier lieu, des autoanticorps anti-CyPA ont été mis en évidence dans le plasma dans le cas du lupus érythémateux et de la maladie de Lyme. Ils sont dirigés contre une forme dénaturée de la CyPA. Il n'est pas encore défini si l'apparition de ces autoanticorps est liée à une lyse cellulaire conséquence du processus auto-immun, à la sécrétion de CyPA ou encore à l'existence d'un épitope commun entre la CyPA et un agent infectieux [Harigai *et al.* (1992); Kratz *et al.* (1992)]. D'autre part, ces autoanticorps ne sont pas détectés dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose multiple.

La CyPA est présente dans tous les tissus et dans tous les types cellulaires testés. Sa répartition est homogène (1 à 2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéines). Elle est cependant plus abondante dans l'hippocampe, le cortex cérébral (surtout les neurones) et les cellules du sang (surtout les hématies) [Bergsma *et al.* (1991); Ryffel *et al.* (1991); Lad *et al.* (1992); Allain *et al.* (1994a)]. Le taux de CyPA peut subir des variations dues à divers événements notamment la prolifération et la différenciation cellulaire. En effet, les lignées érythroblastiques et myéloblastiques présentent un taux de CyPA sans cesse décroissant au cours de leur différenciation en hématies et en leucocytes polymorphonucléaires [Sarris *et al.* (1992)]. De même, le taux de CyPA augmente dans les fibroblastes de poumon (MRC-5) en prolifération et diminue quand ces cellules sont infectées par le virus SV40 [Celis *et al.* (1991)]. Les tissus cancéreux ont aussi une concentration en CyPA supérieure à celle des tissus sains (jusque trois fois plus dans le cas de cancer du colon) [Koletsky *et al.* (1986)]. L'activation des lymphocytes T par la concanavaleine A entraîne une augmentation de la concentration en CyPA. Cette augmentation n'est pas retrouvée en cas d'activation des lymphocytes T par la phytohémagglutinine ou les esters de phorbol [Haendler *et al.* (1987); Richards *et al.* (1992)]. Enfin, l'administration de CsA à des rats ou des souris se traduit par une nette augmentation du taux de CyPA dans les différents tissus au cours du traitement [McDonald *et al.* (1992); Sarris *et al.* (1992)].

## (2) La cyclophiline B

La cyclophiline B (CyPB) est la deuxième cyclophiline des mammifères caractérisée, montrant l'existence d'une famille de protéines aux caractéristiques communes. Son identification a été réalisée par clonage à partir d'une banque d'ADNc de rat. Ce clonage a permis la mise en évidence de la première cyclophiline d'eucaryote distincte de la CyPA [Iwai et Inagami (1990)].

L'identité de la CyPB a ensuite été clairement établie grâce à son clonage à partir de cellules lymphoblastiques Jurkat et son expression chez *Escherichia coli*. Il s'agit d'une protéine de 208 résidus d'acides aminés. Les 25 premiers résidus sont reconnus comme séquence signal lors de l'expression. La protéine mature a une masse moléculaire apparente de 21 kDa et un pI supérieur à 9,5. Son homologie de séquence avec la CyPA est de 58%. Elle atteint 80% pour la partie centrale des deux protéines. La CyPB se distingue de la CyPA par ses séquences N- et C-terminales spécifiques [Price *et al.* (1991)].

L'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique de la CyPB vis à vis de divers substrats synthétiques est 2 fois plus faible que celle de la CyPA. Cependant sa spécificité pour l'acide aminé situé en Ct de la proline est la même [Bergsma *et al.* (1991)]. La fixation de la CsA à la CyPB est 20 fois moins importante que pour la CyPA. L'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique de la CyPB est donc moins sensible à l'action de la CsA [Bergsma *et al.* (1991); Spik *et al.* (1991)].

L'ARN messenger de la CyPB est exprimé dans tous les tissus (sains et cancéreux) et dans tous les types cellulaires testés. Son niveau d'expression uniforme est cinq à dix fois moins élevé que celui de la CyPA [Bergsma *et al.* (1991); Hasel *et al.* (1991)]. La CyPB a également été purifiée à partir du cerveau de bœuf. Elle y est particulièrement abondante [Galat et Bouet (1994)].

Lors d'un fractionnement subcellulaire, la CyPB est retrouvée dans la fraction correspondant au réticulum endoplasmique. Ces observations sont en accord avec la présence d'un peptide signal [Hasel *et al.* (1991); Bose et Freedman (1994a); Bose *et al.* (1994b)]. L'utilisation d'anticorps anti-CyPB et de la microscopie de fluorescence a permis de préciser sa localisation subcellulaire. Le signal obtenu pour la CyPB est distinct de celui du réticulum endoplasmique. Il montre que la CyPB est colocalisée avec la calréticuline

(protéine fixant le  $\text{Ca}^{2+}$ ) dans des vésicules appelées calciosomes s'accumulant autour du noyau [Arber *et al.* (1992)]. La « calcium-signal modulating cyclophilin ligand » (CAML), ligand intracellulaire de la CyPB influant sur le flux calcique, présente la même distribution à l'intérieur de la cellule [Bram et Crabtree (1994)].

La présence de CyPB a également été recherchée dans d'autres structures subcellulaires où existe une forte accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans les plaquettes, la CyPB est colocalisée avec la calréticuline dans le réseau tubulaire dense, unique lieu de stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  décrit pour ces cellules. Dans les cellules des muscles striés, la CyPB est présente dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique avec la calséquestrine. Cependant, elle n'est pas limitée à cette seule structure. En ce qui concerne les cellules adhérentes, on observe une accumulation de la CyPB et de la calréticuline dans les pseudopodes [Arber *et al.* (1992)].

L'extrémité C-terminale de la CyPB semble être responsable du ciblage de la CyPB vers les calciosomes. On ne retrouve cependant pas dans cette extrémité la séquence KDEL connue pour assurer la rétention des protéines dans la voie de sécrétion [Munro et Pehlman (1987)]. Le remplacement de la séquence C-terminale de la nexine (habituellement sécrétée) par la séquence correspondante de la CyPB (VEKPFAIAKE) conduit à sa colocalisation avec la CyPB endogène [Arber *et al.* (1992)].

Il semble donc que la CyPB possède une localisation subcellulaire définie. Cependant l'existence d'une forme sécrétée a également été décrite. L'expression de la CyPB de poulet dans des cellules d'insectes montre que 50% de la CyPB nouvellement synthétisée est sécrétée après 90 min. Une autre partie reste associée à la voie de sécrétion [Caroni *et al.* (1991)]. La présence de CyPB dans le lait de Femme confirme l'existence d'une sécrétion de la CyPB [Spik *et al.* (1991)]. D'autre part, des anticorps dirigés contre l'extrémité C-terminale de la CyPB ont montré la présence de CyPB dans le plasma à une concentration de 150 ng/ml [Allain *et al.* (1995)]. La CyPB a aussi été décrite tout au long de la voie de sécrétion et associée à la face externe de la membrane cytoplasmique. La CsA provoque une sécrétion rapide de la CyPB. On ne retrouve plus de CyPB associée à la membrane plasmique. Ces observations décrivent la CyPB comme une protéine chaperonne accompagnant une protéine cible le long de la voie de sécrétion comme le fait ninaA avec la rhodopsine 1. La CsA agirait en tant que compétiteur de cette protéine [Price *et al.* (1994)].

### (3) La cyclophiline C

La cyclophiline C (CyPC) est la troisième cyclophiline à avoir été identifiée. Son clonage chez la souris, réalisé à partir de cellules de moelle osseuse, a montré qu'il s'agissait d'une protéine de 212 résidus d'acides aminés (MM=22,8 kDa) montrant un haut degré de conservation avec les CyP A et B humaines. La CyPC murine possède une expression tissu spécifique. Son ARN messager est présent dans :

- le rein (fort)
- les lymphocytes B et T
- la rate (faible)

Plus précisément pour le rein, l'expression de la CyPC semble plus particulièrement localisée au niveau du tubule proximal à la différence de la CyPA qui est exprimée dans tout le néphron [Otsuka *et al.* (1994)].

La séquence N-terminale de la CyPC contient des résidus d'acides aminés hydrophobes caractéristiques d'une séquence signal dirigeant la protéine vers le réticulum endoplasmique. Deux points précis pourraient expliquer cette localisation de la CyPC :

- la protéine CyCAP, ligand intracellulaire de la CyPC, est une protéine glycosylée empruntant la voie de sécrétion [Friedman *et al.* (1993)].
- la délétion de la partie N-terminale de la CyPC et sa transfection dans les cellules Jurkat lui permet, en présence de CsA, d'inhiber la calcineurine cytosolique. Cette activité n'est pas retrouvée lorsque l'on transfecte la CyPC possédant son extrémité N-terminale complète. La compartimentation de ces deux produits de transfection est aussi vérifiée par immunofluorescence [Bram *et al.* (1993)].

La CyPC humaine a été clonée à partir de cellules rénales. Il s'agit également d'une protéine de 212 résidus d'acides aminés possédant 90% d'homologies de séquence avec son homologue murin. La plus grande homologie avec les cyclophilines humaines est retrouvée avec la CyPB, soit 70% si l'on excepte la séquence signal. Contrairement à la CyPC murine, son expression n'est pas restreinte à certains tissus. Son ARN messager est détecté en faible quantité dans tous les tissus testés (rein, muscles lisses et squelettiques, pancréas, coeur, poumon, foie, cerveau).

Par contre, les cellules lymphoblastiques Jurkat n'expriment pas la CyPC. Comparée à la CyPA, la CyPC est exprimée à un taux plus faible. Les acides aminés connus pour être impliqués dans l'interaction CyP(s)/CsA sont conservés dans la CyPC et logiquement la CyPC fixe la CsA avec la même spécificité que les CyP A et B [Schneider *et al.* (1994)].

#### (4) La cyclophiline D

La cyclophiline D (CyPD), appelée dans un premier temps hCyP3, a été mise en évidence par criblage d'une banque d'ADNc de cellules lymphoblastiques Jurkat. Elle présente une séquence signal hydrophobe de 42 résidus d'acides aminés caractéristiques d'une localisation subcellulaire spécifique. Elle est d'ailleurs retrouvée associée aux organites intracellulaires lors d'un fractionnement cellulaire. Dans ce cas, sa masse moléculaire (18 kDa) est inférieure de 4 kDa à celle prédite à partir de l'ADNc (22 kDa). Ces observations suggèrent le clivage de la séquence signal. Cette cyclophiline est exprimée dans tous les tissus testés à des taux 50 à 100 fois inférieurs à ceux de la CyPA. Elle possède également une activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique et la même spécificité de substrat que la CyPA [Bergsma *et al.* (1991); Kay (1992)].

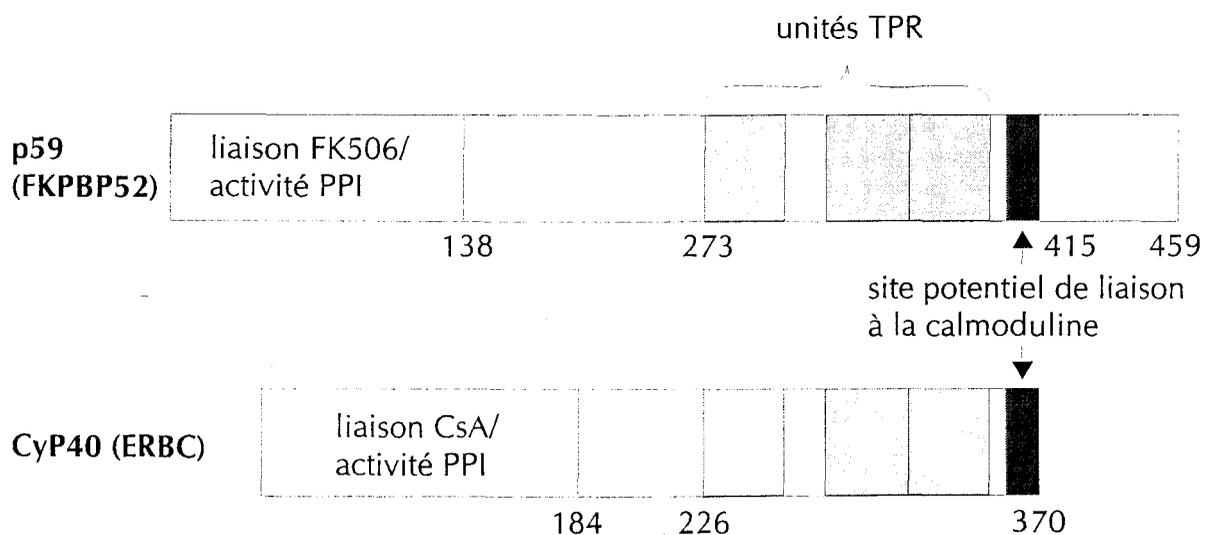
La cyclophiline D a été localisée dans la matrice mitochondriale d'hépatocytes de rat et de cellules de coeur de boeuf [Connern et Halestrap (1992); Inoue *et al.* (1993)]. Dans les deux cas, il s'agit d'une protéine de 19 kDa. Le séquençage de l'extrémité N-terminale montre une forte homologie de séquence avec la hCyP3. Ces deux CyPD présentent la séquence nucléotidique de la hCyP3 dépourvue des 30 premiers résidus d'acides aminés constituant le signal de translocation de la protéine vers la matrice mitochondriale.

#### (5) La cyclophiline 40 ou ERBC

Outre la CyPA, une deuxième cyclophiline cytosolique a été caractérisée : la cyclophiline 40 (CyP40). Elle comporte deux isoformes de pI 5,3 et 5,5 contrastant avec les pI basiques des deux isoformes de la CyPA. La CyP40 possède une activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique huit fois moins élevée que la CyPA vis à vis d'un substrat synthétique. D'autre part, son affinité pour la CsA est 16 fois plus faible. Cette affinité plus faible est liée à l'absence d'un résidu de tryptophane conservé dans les autres cyclophilines. Le remplacement du résidu His141 de la CyP40 par un résidu de tryptophane restaure totalement l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique de la CyP40 [Hoffman *et al.*

(1995)]. Par contre, le complexe CyP40/CsA se fixe de la même manière que le complexe CyPA/CsA à la calcineurine. Le domaine d'homologie de la CyP40 avec les autres cyclophilines est plus proche des cyclophilines végétales que des cyclophilines A ou B, suggérant une phylogénie différente [Kieffer *et al.* (1992), Kieffer *et al.* (1993)].

La séquence spécifique de la CyP40, c'est à dire sans homologie avec les autres cyclophilines lui confère son originalité. En effet, le domaine C-terminal de la CyP40 (position 220-369) présente plus de 30% d'homologie de séquence avec la protéine p59. La protéine p59 est un constituant du complexe du récepteur inactif aux hormones stéroïdes mais également une « FK506-binding protein » (FKBP52). Elle présente deux domaines homologues au FKBP12 et un troisième domaine comportant l'homologie de séquence avec la CyP40 [Peattie *et al.* (1992)]. La CyP40 a ensuite été identifiée au sein du complexe du récepteur inactif aux œstrogènes et nommée dans ce cas **ERBC** pour « estrogen receptor-binding protein ». Sa séquence a montré l'existence d'un domaine TPR (« tetracorticopeptide repeat ») et d'un site de liaison potentiel à la calmoduline (Figure 1, p. 17) [Ratajczak *et al.* (1993)].



**Figure 1 :** Domaines structuraux communs entre la CyP40 (ERBC) et la p59 (FKBP52) [Ratajczak *et al.* (1993)]

### (6) Les autres cyclophilines solubles

La stimulation de fibroblastes de souris (3T3) par le bFGF augmente la sécrétion de cinq protéines nommées SIPs (« superinductible proteins »). Le séquençage de fragments tryptique de la SIP24 montre de fortes homologies de séquence avec la CyPA (jusque 90%). Cette protéine est N-glycosylée et structurée par au moins un pont disulfure, ce qui lui confère les caractéristiques d'une protéine sécrétée [Davis *et al.* (1991)].

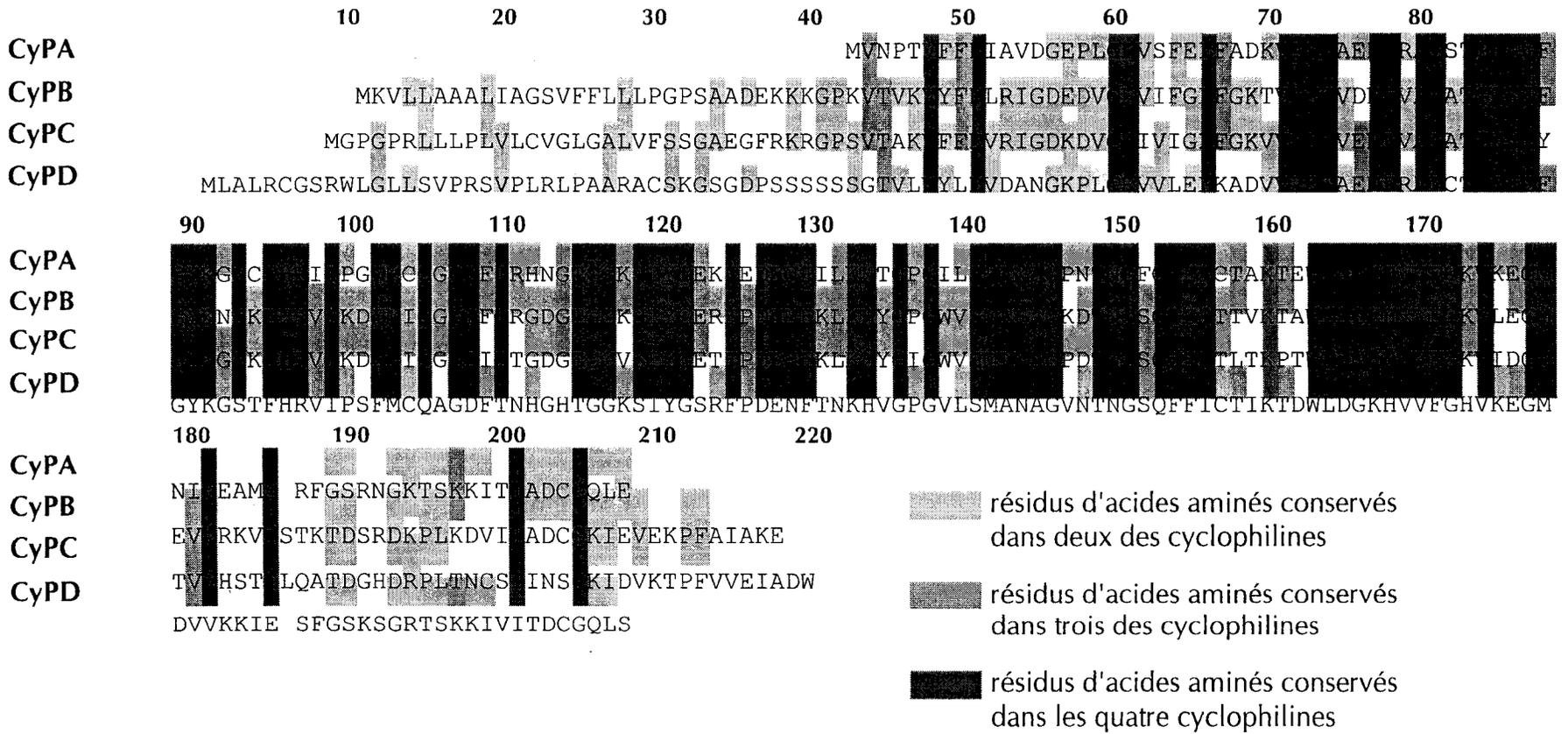
Une cyclophiline de 18 kDa possède une activité chimiotactile vis à vis des leucocytes. Elle a été isolée de l'utérus de Rat [Xu *et al.* (1992)] ou du milieu de culture de macrophages murins stimulés par un LPS [Sherry *et al.* (1992)]. Le séquençage de l'extrémité N-terminale de cette protéine tend à prouver qu'il pourrait s'agir de la CyPA. Dans le cas des macrophages murins, la question de sa sécrétion sans séquence signal reste posée.

La partie N-terminale et le site catalytique de la CyPA présentent respectivement 50% et 38% d'homologie de séquence avec le facteur d'élongation 2 (EF-2) [Gschwendt *et al.* (1988)]. Aucune similitude fonctionnelle n'a jamais été observée entre ces deux protéines.

### (7) Analyse de la séquence des principales cyclophilines solubles

Les principales cyclophilines solubles (CyP A, B, C et D) possèdent une taille comparable (17 à 23 kDa) et présentent de très fortes homologies de séquence (Figure 1, p. 19). Elles possèdent toutes les quatre un noyau cyclophiline extrêmement conservé (70% des résidus sont conservés dans les quatre cyclophilines dans la région 80-180 par rapport à la séquence de la CyPD). Les extrémités N- et C-terminales constituent les parties spécifiques de chacune de ces protéines. Les CyP B, C et D se caractérisent par la présence d'une séquence N-terminale les dirigeant vers un compartiment subcellulaire (réticulum endoplasmique ou mitochondrie). Les CyP B et C possèdent une extrémité C-terminale supplémentaire par rapport aux CyP A et D. Ce sont les deux cyclophilines présentant le plus d'homologies de séquence entre elles (70% d'homologie stricte). C'est leur partie C-terminale (région 144-184 de la CyPB) qui marque leur différence car l'homologie de séquence tombe à 35% dans cette région.

Figure 2: Alignement des séquences des principales cyclophilines solubles



*b) Les cyclophilines membranaires***(1) La protéine « Natural Killer cell Tumor Recognition molecule » (NK-TR)**

La recherche de molécules responsables de la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK (« Natural Killer ») a conduit à la caractérisation de deux protéines. L'une de ces protéines se distingue par la présence d'un domaine fortement homologue aux cyclophilines. Elle a été appelée NK-TR (« Natural Killer cell Tumor Recognition molecule ») en référence à son rôle présumé. Le NK-TR humain est une protéine membranaire de 1403 résidus d'acides aminés (MM=158 kDa), non glycosylée, possédant une structure multidomaine inhabituelle (Figure 3, p. 21). Il est ancré dans la membrane par un domaine transmembranaire N-terminal à plusieurs segments ressemblant à celui du CD20. On trouve ensuite un domaine possédant plus de 50% d'homologie de séquence avec les différentes cyclophilines connues. Le NK-TR présente également trois domaines hydrophiles chargés positivement (répétition de motifs sérine-arginine) se rapprochant des protéines de liaison aux acides nucléiques impliquées dans l'épissage de l'ARN messager [Anderson *et al.* (1993)].

Le NK-TR a été cloné chez la souris. Son domaine cyclophiline est intégralement conservé par rapport au NK-TR humain, soulignant son importance [Anderson *et al.* (1993)]. Le domaine cyclophiline du NK-TR conserve son activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique, cependant il est très peu sensible à l'action inhibitrice de la CsA [Rinfret *et al.* (1994)]. De plus, la localisation transmembranaire du NK-TR le rapproche plus du produit du gène *ninaA* de *Drosophila melanogaster* que des autres cyclophilines solubles.

La forme complète du NK-TR n'est que faiblement représentée (⊕5%) (Figure 3 (A), p. 21). En effet, l'expression du gène du NK-TR est contrôlée par épissage alternatif de l'ARN messager concerné. On observe ainsi la production d'une protéine tronquée de 210 résidus d'acides aminés ne comprenant que le domaine transmembranaire et les 2/3 du domaine cyclophiline ((Figure 3 (C), p. 21). La partie manquante du domaine cyclophiline renferme les acides aminés les plus conservés, connus pour être responsable de l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique. Un second type d'épissage conduit à la perte de 25 résidus d'acides aminés dans la partie riche en sérine du premier domaine chargé positivement ((Figure 3 (B), p. 21). Consécutivement à l'activation des cellules NK par l'IL-

2, on observe une baisse du taux d'épissage conduisant à la forme tronquée du NK-TR et une nette augmentation de la production de la forme complète du NK-TR. L'épissage menant à la délétion de 25 résidus d'acides aminés du NK-TR ne semble pas sensible à l'IL-2 [Rinfret et Anderson (1993)].

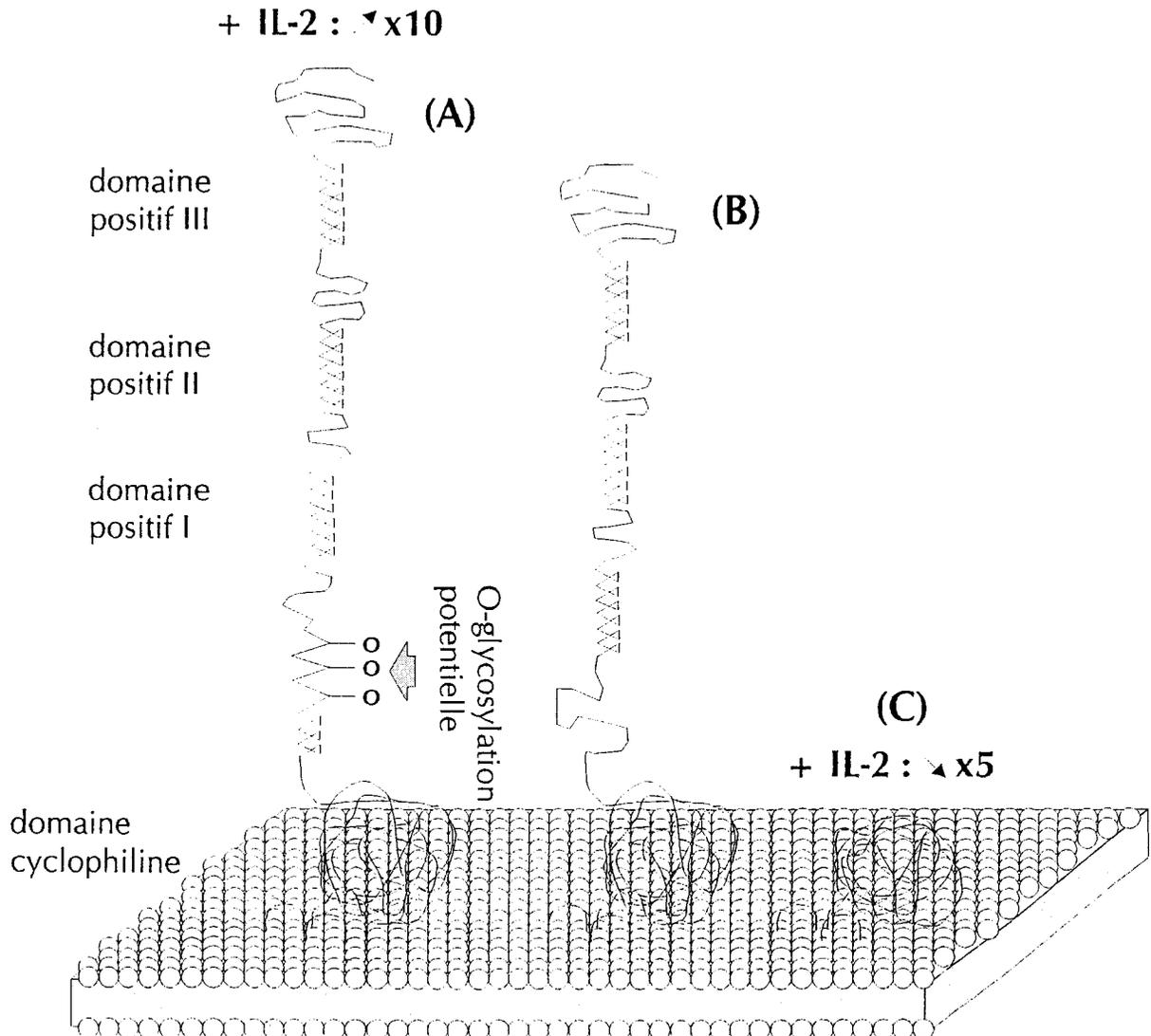


Figure 3 : Influence de l'épissage alternatif sur la production du NK-TR

## (2) La protéine ninaA

Les mutations affectant le gène *ninaA* de *Drosophila melanogaster* modifient considérablement le taux de rhodopsine dans les photorécepteurs R1-R6. Ce gène code pour une protéine de 237 résidus d'acides aminés présentant 42% d'homologie de séquence avec la CyPA [Schneuwly *et al.* (1989); Shieh *et al.* (1989)]. NinaA est surtout produite dans les

photorécepteurs R1-R6 bien que son expression soit également détectée dans d'autres types de photorécepteurs.

Il s'agit d'une protéine membranaire intégrale. Elle présente une séquence signal permettant sa translocation vers le réticulum endoplasmique et une séquence C-terminale hydrophobe conduisant à son ancrage dans la membrane. On obtient ainsi une protéine membranaire intégrale avec le domaine cyclophiline présenté dans la lumière du réticulum endoplasmique. Elle comporte également une courte queue cytoplasmique de 7 résidus d'acides aminés. Malgré le clivage du peptide signal, la translocation de *ninaA* s'accompagne d'un accroissement de sa masse moléculaire probablement dû à une N-glycosylation du résidu Asn68 [Stamnes *et al.* (1991)].

Les anticorps anti-*ninaA* reconnaissent une protéine de 30 kDa dans le cortex cérébral et la rétine de boeuf. Cette protéine, bien qu'associée aux membranes, ne possède pas d'ancrage transmembranaire [Stamnes *et al.* (1991)].

Les différentes mutations du gène *ninaA* affectent le taux de rhodopsine mais pas le taux de transcription du gène *ninaE* ou la stabilité de son ARN messager. *NinaA* est donc certainement impliquée dans un contrôle post-transcriptionnel du taux de rhodopsine en rapport avec ses caractéristiques de cyclophiline (mise en conformation et stabilité de la rhodopsine) [Schneuwly *et al.* (1989)].

### **(3) La cyclophiline associée à la membrane interne de la mitochondrie**

La membrane interne de la mitochondrie contient un pore  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant. La perméabilité de ce pore est bloquée par la CsA laissant à penser qu'une protéine proche des cyclophilines est impliquée dans son activité [Crompton *et al.* (1988)]. La mitochondrie possède deux classes de sites à haute affinité pour la CsA. La fermeture du pore est corrélée à la liaison de la CsA aux sites de plus faible affinité [McGuinness *et al.* (1990)]. La CsA se répartit entre la fraction soluble (matrice) et la fraction membranaire de la mitochondrie avec une modification de sa distribution en présence d'ADP [Andreeva et Crompton (1994)]. La CyPD pourrait être la cyclophiline contenue dans la matrice. Dans ce cas, il existe une cyclophiline distincte associée aux membranes mitochondriales et reliée à l'activité du pore.

La fixation de la CsA à cette protéine inhibée par le  $\text{Ca}^{2+}$  et potentialisée par l'ADP [Andreeva et Crompton (1991)] a servi de référence pour la purifier par photoaffinité. Une protéine de 22 kDa, distincte de la CyPD, a été isolée des membranes mitochondriales d'hépatocytes et de cellules de cœur de rat. Son activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique est semblable à celle des autres cyclophilines. Par contre, la fixation de la CsA est particulière. En effet, la fixation d'un dérivé photoactivable de la CsA à cette protéine est augmentée en présence d'ADP et diminuée par addition de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces caractéristiques correspondent à la protéine associée au pore de la membrane mitochondriale interne. Parallèlement est purifiée une protéine de 11 kDa, aux propriétés similaires. Il est probable qu'elle provienne d'une protéolyse de la protéine de 22 kDa [Andreeva *et al.* (1995)].

#### (4) Les autres cyclophilines membranaires

La fraction microsomale d'hépatocytes de rat contient une cyclophiline de 22 kDa possédant un glycanne avec un résidu galactosyl-N-galactosamine terminal. Elle présente deux isoformes de pI 9,3 et 9,6. Le séquençage de fragments tryptiques montre qu'elle est proche mais distincte de la CyPB [Thalhammer *et al.* (1992)].

Un complexe macromoléculaire CsA-aminodextran provoque uniquement l'agglutination des cellules du système immunitaire (lymphocytes B et T, thymocytes). Dans les lymphocytes T, la synthèse d'IL-2 après activation par les esters de phorbol est inhibée par la fixation du complexe suggérant la présence d'une protéine capable de fixer la CsA à la surface de ces cellules. Cette protéine pourrait être une cyclophiline membranaire [Cacalano *et al.* (1992)].

Le récepteur sigma ( $\sigma$ ) des hépatocytes de Rat est composé de trois protéines principales (28 kDa, 40 kDa et 65 kDa). Les 15 premiers résidus d'acides aminés de la protéine de 28 kDa sont identiques à la séquence N-terminale de la CyPA. L'affinité de cette protéine pour la WGA (« wheat germ agglutinin ») montre qu'elle est glycosylée. Comme la CyP40, cette cyclophiline intervient dans la constitution d'un récepteur complexe [Schuster *et al.* (1994)].

Les nucléoporines sont des protéines impliquées dans le transport de molécules solubles dans le noyau. La nucléoporine Nup358 possède un domaine C-terminal homologue aux cyclophilines. Son activité et son rôle n'ont pour l'instant pas été montrés [Wu *et al.* (1995)].

### c) Les cyclophilines chez les organismes inférieurs

Les cyclophilines constituent une famille de protéines homologues, ubiquitaires, que l'on retrouve également chez les eucaryotes inférieurs, les bactéries, les végétaux inférieurs et supérieurs. L'analyse de l'arbre phylogénique des cyclophilines montre un très grand degré de conservation entre :

- les cyclophilines de type A de mammifères
- les cyclophilines de levures et de champignons
- les cyclophilines de type B et les cyclophilines sécrétées

Les cyclophilines de bactéries comme *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* constituent les membres les plus éloignés de cette famille [Trandinh et al. (1992)].

#### (1) Chez les eucaryotes inférieurs

Le modèle le plus étudié est *Saccharomyces cerevisiae*. Il présente de nombreuses homologies avec les cyclophilines des mammifères. On dénombre pas moins de cinq cyclophilines chez cette levure :

- la CYP1 qui est l'homologue de la CyPA [Haendler et al. (1989)]. Elle peut former un complexe CYP1/CsA inhibiteur de la calcineurine de *Saccharomyces cerevisiae* [Foor et al. (1992)].
- les CYP2 et CYP4 possèdent une séquence signal dirigeant vers la voie de sécrétion [Koser et al. (1991); Tanida et al. (1991)]. La CYP2 est une protéine transmembranaire avec un domaine luminal homologue aux cyclophilines [Franco et al. (1991)].
- La CYP3 présente un signal spécifique de translocation dans la mitochondrie où elle affecte le métabolisme du lactate [Davis et al. (1992)].
- La CYPD possède la séquence C-terminale HDEL provoquant sa rétention dans le réticulum endoplasmique [Frigerio et Pehlman (1993)].

Une cyclophiline proche de la CYP1 est retrouvée chez *Schizomyces pombe* [De Martin et Philipson (1991)] et *Candida albicans* [Koser et al. (1991)].

## (2) Chez les procaryotes

Deux cyclophilines de masse moléculaire différente (18 kDa et 19 kDa) ont été caractérisées chez *Escherichia coli*. La première, nommée rotamase, possède une séquence signal de 24 résidus d'acides aminés. Elle est retrouvée dans le périplasma [Liu *et al.* (1990a)]. La seconde est exclusivement cytoplasmique [Hayano *et al.* (1991)]. L'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique de la rotamase est très peu sensible à la CsA. Ces deux cyclophilines sont les membres les plus éloignés de la famille des cyclophilines comme le souligne leur faible affinité pour la CsA [Liu *et al.* (1991)].

Par contre, d'autres bactéries Gram<sup>-</sup> (*Bacillus subtilis*) ou Gram<sup>+</sup> (plusieurs espèces de *Streptomyces*) possèdent une cyclophiline présentant plus de similitudes avec les cyclophilines eucaryotes qu'avec celles d'*Escherichia coli* [Herrler *et al.* (1992); Pahl *et al.* (1992); Herrler *et al.* (1994)]. Les cyclophilines sont également retrouvées au niveau des archéobactéries comme *Halobacterium cutirubrum* [Nagashima *et al.* (1994)] montrant bien leur conservation au cours de l'évolution.

## (3) Chez les plantes

Les cyclophilines sont présentes chez les végétaux inférieurs et supérieurs.

*Neurospora crassa* possède deux cyclophilines présentant des localisations différentes. Ces deux formes proviennent d'un gène unique dont l'ARN messager subit un épissage alternatif [Tropschug *et al.* (1988); Tropschug (1990)]. La cyclophiline isolée d'*Orponomyces* est proche des cyclophilines mammifères de type B. Elle présente une séquence signal ainsi qu'une séquence C-terminale KADL caractéristiques des protéines résidentes du réticulum endoplasmique [Chen *et al.* (1995)].

L'équivalent de la CyPA est identifié chez la tomate, le maïs et *Brassica napus*. L'expression de la CyPA de tomate permet de montrer qu'elle possède une activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique inhibée par la CsA [Gasser *et al.* (1990)].

Les cyclophilines retrouvées dans les plantes sont souvent associées aux organites responsables de la photosynthèse (chloroplastes). Dans la plante du pois, des cyclophilines sont détectées dans la matrice mitochondriale et dans les thylacoïdes des chloroplastes [Breiman *et al.* (1992)]. *Arabidopsis thaliana* possède également deux cyclophilines avec des

localisations subcellulaires différentes. La première (ROC1) est exclusivement cytosolique. Elle est présente dans toutes les parties de la plante. La seconde (ROC4) n'est exprimée que dans les chloroplastes des organes photosynthétiques [Lippuner *et al.* (1994)]. Les feuilles de la fève présentent aussi dans les chloroplastes une cyclophiline proche des CyP B et C. L'expression de cette protéine est régulée par la lumière. On retrouve le même phénomène pour les protéines chaperonnes des chloroplastes [Luan *et al.* (1994)]. Les conditions de stress sont également capables d'induire une synthèse accrue de cyclophilines dans le maïs, le haricot ou le riz comme elles le font pour les protéines chaperonnes [Marivet *et al.* (1992); Buchholz *et al.* (1994)].

#### d) Conclusion

En définitive, les cyclophilines constituent une famille de protéines ubiquitaires très conservées. Elles se caractérisent toutes par un noyau commun présentant une activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique et la capacité à fixer la CsA (**Figure 4**, p. 27). Les régions spécifiques de chaque cyclophiline sont à l'origine de la diversité de leur répartition subcellulaire. Cette localisation des différentes cyclophilines dans des compartiments définis est vraisemblablement un facteur déterminant pour leur mode d'action et le rôle qu'elles doivent jouer dans la cellule. Le problème reste que les cyclophilines A et B, même si elles ont une localisation principale, ont été décrites dans d'autres compartiments. La mise en évidence de rôles biologiques en relation avec ces différentes localisations permettraient de justifier de cette diversité.

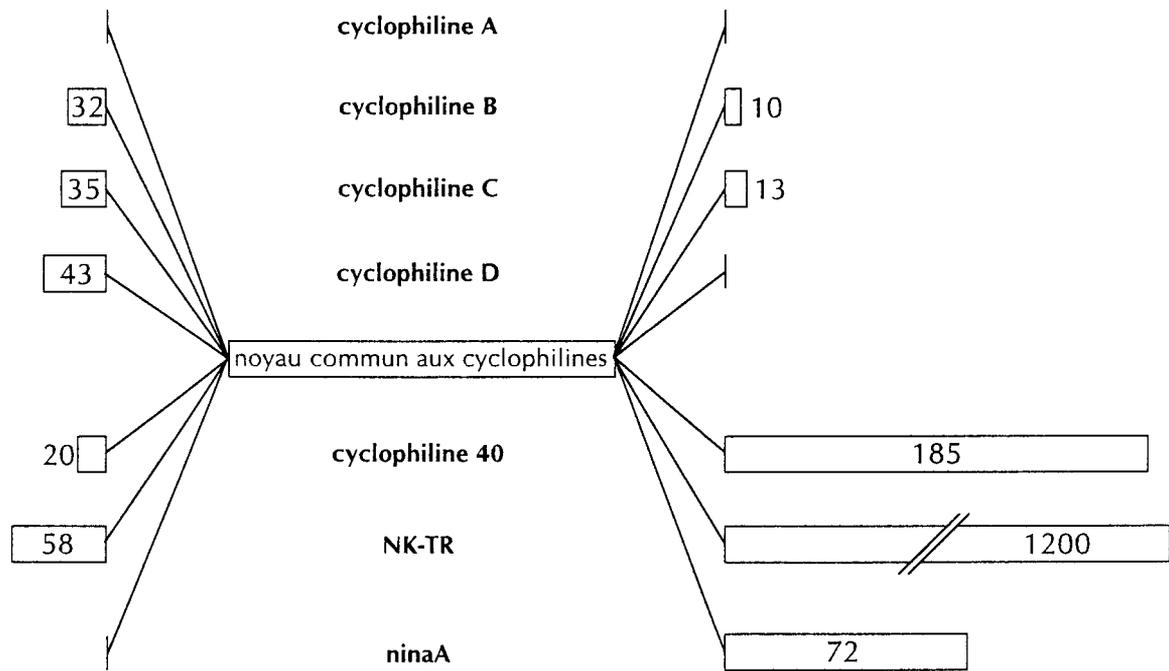


Figure 4 : Comparaison des structures des principales cyclophilines

Tableau 1 : Caractéristiques des principales cyclophilines

<i>cyclophilines</i>	$N_{aa}$	MM (kDa)	activité ppi	fixation de la CsA	localisation	référence
<i>solubles</i>						
CyPA	165	18	+++	+++	cytosol	Haendler <i>et al.</i> (1987)
CyPB	184	20,3	++	++(+)	voie de sécrétion	Price <i>et al.</i> (1991)
pCyPC	213	22,9	n.d.	++	RE	Schneider <i>et al.</i> (1994)
CyPD	164	18	+++	++	matrice mitochondriale	Bergsma <i>et al.</i> (1991)
CyP40	370	40,8	++	+	cytosol	Kieffer <i>et al.</i> (1993)
<i>membranaires</i>						
ninaA	237	26	n.d.	n.d.	membranaire du RE	Shieh <i>et al.</i> (1989)
NK-TR	1403	157,7	+	+	membrane cytoplasmique	Anderson <i>et al.</i> (1993)

## B. Les «FK506-binding proteins»

La découverte des FKBP est le résultat des recherches sur les cibles moléculaires du macrolide immunosuppresseur FK506. Comme les cyclophilines, les FKBP possèdent une activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique. Il n'existe cependant pas d'homologie structurale entre ces deux familles de protéines.

### a) Le FKBP12

La principale isoforme cytoplasmique des FKBP est le FKBP12. Elle a été mise en évidence dans les splénocytes [Harding *et al.* (1989)] et dans les cellules lymphoblastiques Jurkat [Siekerka *et al.* (1989)]. Son clonage et son séquençage montrent qu'il s'agit d'une protéine de 108 résidus d'acides aminés [Maki *et al.* (1990); Standaert *et al.* (1990); Lane *et al.* (1991)].

Le FKBP12 est exprimé dans tous les tissus et tous les types cellulaires. De même, il est retrouvé dans des espèces très différentes montrant ainsi sa grande conservation au cours de l'évolution. L'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique du FKBP12 est inhibée par le FK506 et la rapamycine.

### b) Le FKBP13

Le séquençage d'une protéine co-purifiée avec le FKBP12 a permis le clonage du FKBP13 [Jin *et al.* (1991)]. Les résidus d'acides aminés impliqués dans la fixation du FK506 et dans l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique sont conservés entre ces deux protéines. Cependant, le FKBP13 a une affinité vingt fois plus faible pour le FK506 que le FKBP12 [Bram *et al.* (1993)]. Le FKBP13 possède une séquence signal de 21 résidus d'acides aminés et une séquence C-terminale RTEL assurant sa rétention dans le réticulum endoplasmique [Jin *et al.* (1991); Nigam *et al.* (1993)].

### c) Le FKBP25

Le FKBP25 est une protéine de 215 résidus d'acides aminés. Son domaine C-terminal est homologue aux FKBP [Galat *et al.* (1992); Jin *et al.* (1992)]. Le domaine N-terminal est riche en hélice  $\alpha$  mais sa fonction n'est pas connue [Rivière *et al.* (1993)]. Le FKBP25 a été localisé dans le noyau. Il possède plusieurs NLS (« nuclear localization signals ») [Jin *et al.*

(1992); Rivière *et al.* (1993)]. Il est intéressant de noter que le FKBP25 possède une affinité pour la rapamycine nettement supérieure au FK506 [Galat *et al.* (1992)].

#### d) Le FKBP52 (p59)

Le FKBP52 est référencé sous plusieurs noms (p59, p56, hsp56 ou FKBP59) suivant son origine ou la fonction qui lui a été attribuée en premier lieu. Il a été identifié pour la première fois dans les lymphocytes T humains par chromatographie d'affinité sur FK506 [Fretz *et al.* (1991)]. Le FKBP52 ou p59 est un antigène des lymphocytes B obtenu par immunisation avec le complexe inactif du récepteur à la progestérone [Tai *et al.* (1992)]. En effet, la p59 fait partie du complexe des récepteurs inactifs aux stéroïdes en interagissant avec la hsp90 [Renoir *et al.* (1990)]. Le FKBP52 présente deux domaines homologues au FKBP12 et un troisième vraisemblablement impliqué dans l'interaction avec la hsp90. Il comporte également de nombreux motifs consensus pour la N-glycosylation, la phosphorylation et la liaison à la calmoduline pouvant refléter de nombreuses modifications posttranslationnelles de la protéine [Callebaut *et al.* (1992); Peattie *et al.* (1992)]. Seul le premier domaine « FKBP12 » est suffisamment conservé pour fixer le FK506 et présenter une activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique [Tai *et al.* (1992); Peattie *et al.* (1992)].

#### e) Le FKBP54

La purification du récepteur avien de la progestérone a montré son association à deux protéines p50 et p54, de la famille des FKBP. Si la protéine p50 est l'équivalent avien de la FKBP12, la protéine p54 a permis l'identification dans les cellules HeLa d'une FKBP54 distincte de la FKBP52. La FKBP54 se distingue par une affinité plus faible pour le FK506 en faible force ionique [Smith *et al.* (1993)].

### C. Les Parvulines

La parvuline ou (PpiC) est une peptidyl prolyl cis-trans isomérase isolée chez *Escherichia coli*. Elle ne possède aucune caractéristique commune avec les autres peptidyl prolyl cis-trans isomérase connues [Rahfeld *et al.* (1994b)]. Sa faible masse moléculaire (10,1 kDa) la distingue des cyclophilines et FKBP. De plus, son activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique n'est pas sensible à la CsA ou au FK506 aux concentrations affectant les autres

peptidyl prolyl cis-trans isomérase. Son activité est cependant similaire à celle des cyclophilines d'*Escherichia coli* vis à vis d'un substrat synthétique. Le séquençage de son extrémité N-terminale n'a pas permis d'établir d'homologies avec des protéines connues mais a conduit à la détermination de sa séquence nucléotidique [Rudd *et al.* (1995)]. Des identités de séquence significatives ont ainsi été observées avec plusieurs protéines procaryotes jouant un rôle dans le transport et la maturation des protéines, notamment la protéine chaperonne PrsA du périplasme d'*Escherichia coli*.

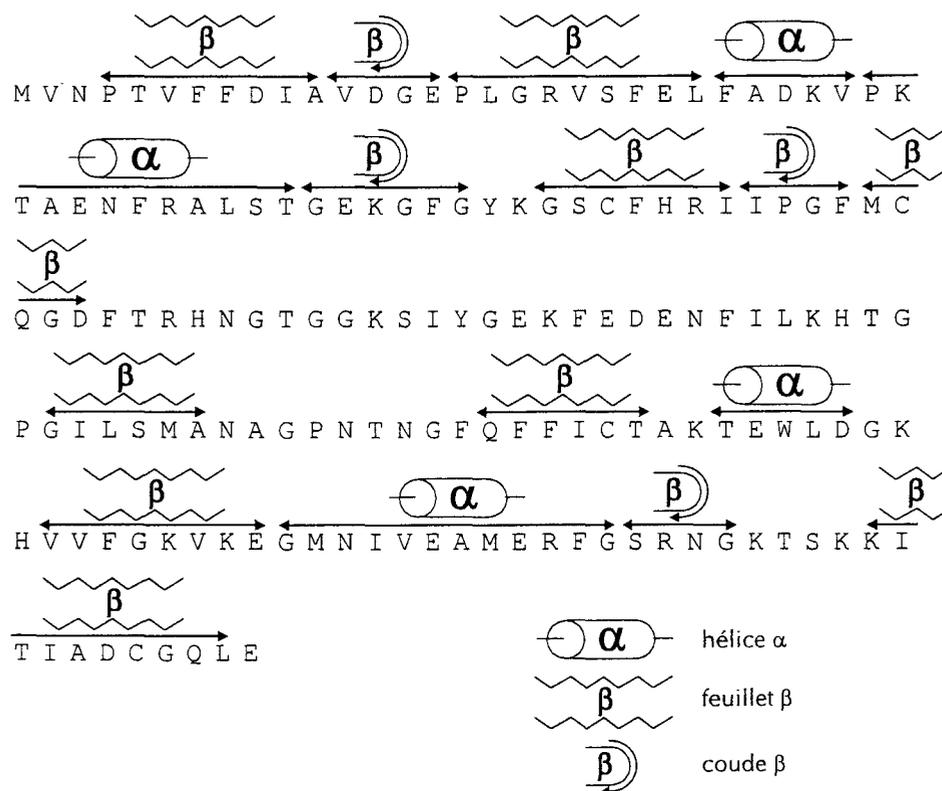
## II. Caractéristiques structurales des peptidyl prolyl cis-trans isomérase et de leurs complexes

La structure des peptidyl prolyl cis-trans isomérase et des complexes qu'elles forment avec leurs immunosuppresseurs respectifs est un sujet qui a été abondamment décrit. La taille modeste des cyclophilines et des FKBP's ainsi que de leurs complexes a permis l'utilisation conjointe de la diffraction des rayons X et de la résonance magnétique nucléaire pour résoudre leurs structures.

### A. Structure des cyclophilines et du complexe cyclophiline/CsA

#### 1. Structure des cyclophilines

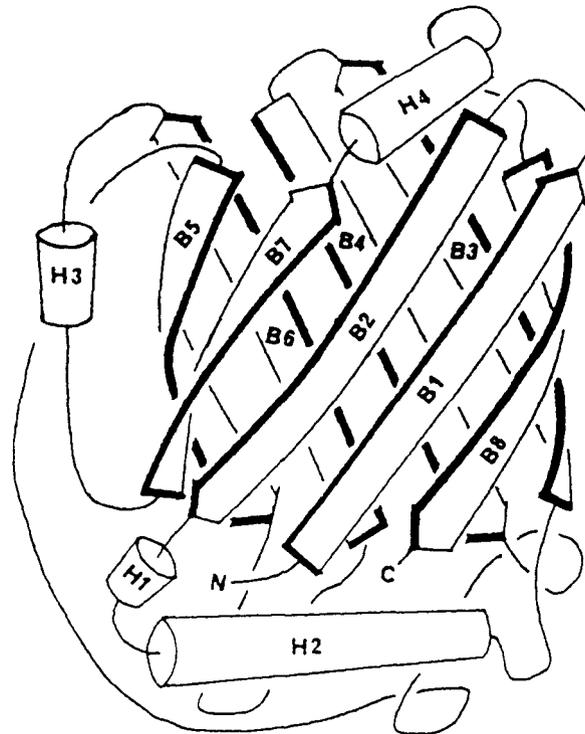
L'étude de la structure de la CyPA par diffraction des rayons X montre qu'il s'agit d'une protéine globulaire de 30-35 Å de diamètre. Elle forme un motif «  $\beta$ -barrel ». Ce type de structure est constitué de feuillets  $\beta$  parallèles ou antiparallèles enveloppant une surface cylindrique avec une zone hydrophobe interne [Chotiah et Janin (1982)]. La CyPA comprend quatre hélices  $\alpha$ , huit feuillets  $\beta$  et quatre coudes  $\beta$  représentant respectivement 21%, 36% et 10% des acides aminés totaux (Figure 5, p. 31). Les huit feuillets  $\beta$  sont antiparallèles et les deux hélices  $\alpha$  ferment le cylindre en haut et en bas (Figure 6, p. 32) [Ke *et al.* (1991)].



**Figure 5 :** Séquence et structure secondaire de la cyclophiline A [Ke (1992)]

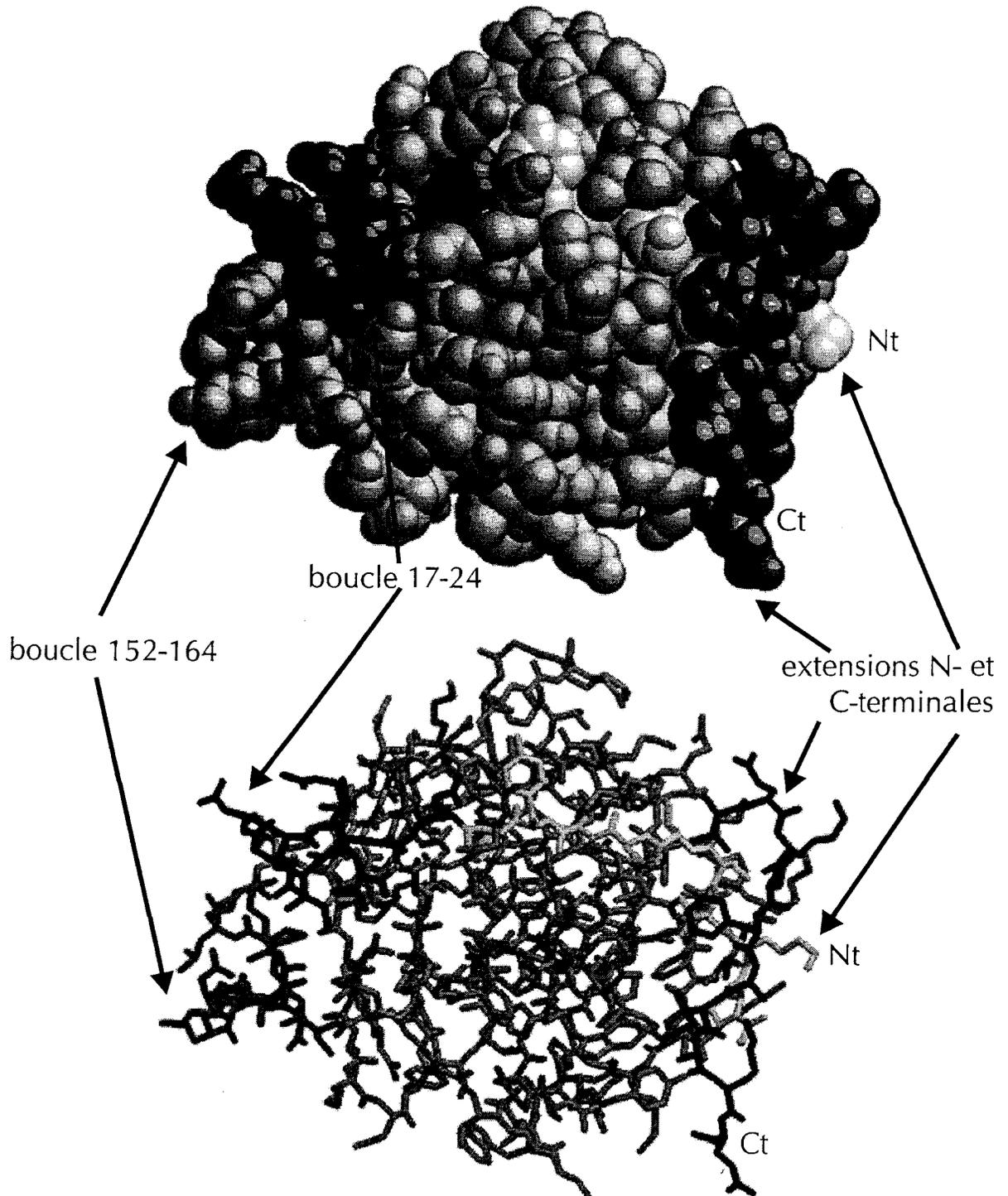
Cette structure rapproche la CyPA d'autres protéines «  $\beta$ -barrel » à huit feuillets  $\beta$  comme la streptavidine, la  $\beta$ -lactoglobuline ou la superoxyde dismutase. A la différence de ces protéines, la structure de la CyPA est fermée par deux hélices  $\alpha$  empêchant la diffusion d'un ligand à l'intérieur des feuillets. La fixation de la CsA ou de substrats contenant un résidu de proline se fait donc à la surface du cylindre.

La présence de six structures («  $\beta$ -bulges »), peu rencontrées dans les autres protéines «  $\beta$ -barrel », pourrait rendre compte des caractéristiques structurales particulières de la CyPA [Ke (1992)]. L'intérieur du cylindre est une zone hydrophobe composée des chaînes latérales de 21 résidus d'acides aminés très conservés dans toutes les séquences de cyclophilines. Toutes les protéines de la famille des cyclophilines partageraient ce même motif «  $\beta$ -barrel » [Dalgarno *et al.* (1986), Ke *et al.* (1991); Ke (1992)]. La CyPA comprend également quatre résidus de cystéine. Il n'existe cependant pas de pont disulfure [Ke (1992)].



**Figure 6 :** Représentation schématique de la structure de la CyPA. Les hélices  $\alpha$  sont numérotées de H1 à H4. Les feuillets  $\beta$  sont numérotés de B1 à B8 [Ke (1992)]

La structure globale de la CyPB est identique à celle de la CyPA à quelques différences près. En effet, les extensions N- et C-terminales supplémentaires de la CyPB forment un nouveau feuillet  $\beta$  à la surface de la molécule, à l'opposé du site de fixation de la CsA. De plus, la présence d'un résidu de glycine (Gly21) dans la boucle Arg19-Asp24 provoque un changement de conformation par rapport à la CyPA. D'autre part, la boucle Thr153-Lys163 de la CyPB ne présente aucune homologie de séquence avec celle de la CyPA et sa structure est différente [Mikol *et al.* (1994)].



**Figure 7 :** Structure tridimensionnelle de la cyclophiline B. Le rmsd (« root-mean-square difference ») est de 1,02 Å entre la cyclophiline A et la cyclophiline B sauf pour les deux régions en vert et en bleu où il atteint 3,5 Å. De plus, la cyclophiline B possède des extensions N- et C-terminale qui ne sont pas retrouvées dans la cyclophiline A (en jaune et en rouge). [Ke *et al.* (1991); Mikol *et al.* (1994)].

La CyPC possède une très grande homologie de séquence avec la CyPB. Sa structure est très proche de celle de la CyPB. Ainsi, on retrouve les mêmes extensions N- et C-terminales formant un feuillet  $\beta$  et les mêmes boucles que pour la CyPB [Ke *et al.* (1993)].

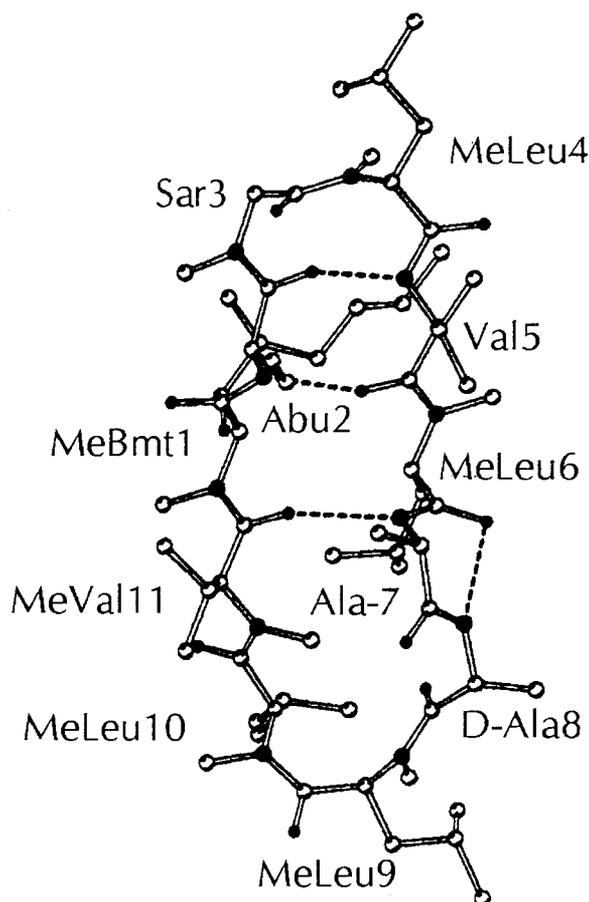
Les structures de la CyPA humaine et de la rotamase d'*Escherichia coli* sont très similaires bien que la rotamase soit le membre le plus éloigné de la famille des cyclophilines. Les variations structurales sont localisées dans des régions sans structure secondaire définie [Clubb *et al.* (1993,1994)].

## 2. Structure du complexe cyclophiline/cyclosporine A

### a) Structure de la cyclosporine A en solution

La CsA est un peptide cyclique de 11 résidus d'acides aminés produit par les champignons *Cylindrocarpon lucidum* et *Tolyocladium inflatum* [Borel *et al.* ((1976); von Wartburg et Traber (1986)]. La recherche de ligands intracellulaires pouvant être impliqués dans l'activité immunosuppressive de la CsA a permis la mise en évidence du complexe CyP(s)/CsA. Les acides aminés très particuliers entrant dans la composition de la CsA expliquent son hydrophobicité. On retrouve un résidu d'acide amino-butérique (Abu2), un de sarcosine (Sar3), quatre résidus de N-méthyl-leucines (MeLeu4, MeLeu6, MeLeu9 et MeLeu10), un résidu de valine (Val5), deux d'alanine (Ala7 et Ala8) et un de N-méthyl-valine (MeVal11). Le premier résidu d'acide aminé est le 4R-4[E-2-butenyl]-4-N-diméthyl-L-thréonine (**MeBmt1**). Il n'est rencontré nul part ailleurs.

La structure de la CsA libre dans les solvants organiques a été étudiée par diffraction des rayons X (Figure 8, p. 35) [Loosli *et al.* (1985)] et par résonance magnétique nucléaire (RMN) [Loosli *et al.* (1985); Kessler *et al.* (1990)].



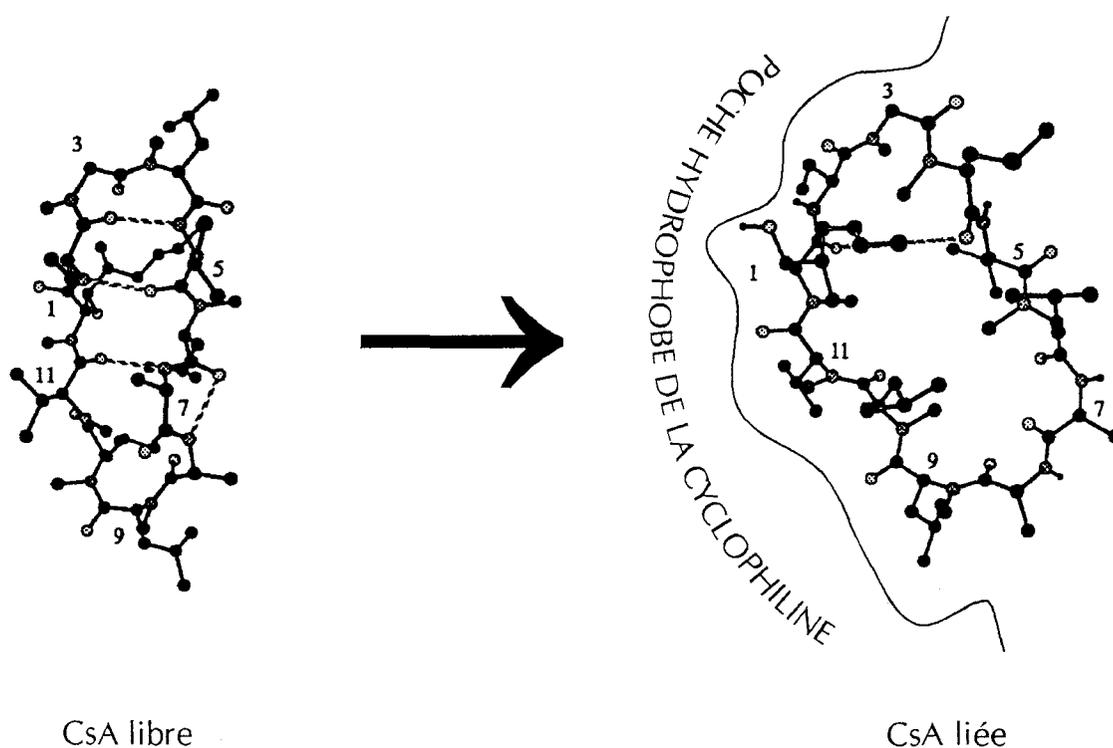
**Figure 8 :** Conformation de la CsA libre en solution dans le chloroforme ou à l'état cristallin [Loosli *et al.* (1985)].

La CsA forme une structure en feuillet  $\beta$  antiparallèle avec quatre liaisons hydrogène impliquant les quatre groupements amides (-NH) non méthylés. La liaison peptidique entre le résidu MeLeu9 et le résidu MeLeu10 est en conformation cis. L'analyse conformationnelle de la CsA en RMN n'est pas possible en milieu aqueux en raison de son insolubilité. Dans un solvant polaire tel que le méthanol, la CsA présente au moins six conformations différentes. L'une prédomine (30%), elle correspond à la conformation obtenue en milieu non aqueux (chloroforme) ou par cristallographie. La structure de la CsA dans un mélange méthanol/eau (50/50) reflète la même hétérogénéité [Ko et Dalvit (1992)].

#### *b) Interaction de la CsA avec la cyclophiline*

La fixation de la CsA aux cyclophilines est spécifique et réversible. La constante de dissociation  $K_d$  est comprise entre  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$  M [Liu *et al.* (1990a); Husi et Zurini (1994b)].

La conformation de la CsA liée à la CyPA diffère beaucoup de celle en solution dans le chloroforme ou à l'état cristallin (Figure 9, p. 36). L'utilisation de la diffraction des rayons X ou de la RMN a permis de montrer ce changement [Fesik *et al.* (1991); Weber *et al.* (1991); Ke *et al.* (1994)]. La CsA liée ne possède plus d'éléments de structure secondaire. Toutes ses liaisons peptidiques sont en trans, notamment la liaison MeLeu9-MeLeu10. Les quatre liaisons hydrogène intramoléculaires observées pour la CsA libre disparaissent; une nouvelle apparaît entre les résidus MeBmt1 et MeLeu4 [Mikol *et al.* (1993); Spitzfaden *et al.* (1994)]. La conformation de la CsA liée à un fragment Fab d'anticorps anti-CsA est différente de celle observée pour la CsA liée à la CyPA [Altschuh *et al.* (1992); Mikol *et al.* (1994)].



**Figure 9** : Structure de la CsA libre ou liée à la CyPA [Fesik *et al.* (1991); Thériault *et al.* (1993)]

La formation du complexe CyPA/CsA en une heure environ avait été interprétée comme une conversion lente du conformère cis de la liaison peptidique MeLeu9-MeLeu10 en conformère trans [Jorgensen (1991)]. Cependant, des dérivés hydrosolubles de la cyclosporine comme la [D-MeSer<sup>3</sup>-D-Ser-(O-Gly)<sup>8</sup>]-cyclosporine [Wenger *et al.* (1994)] ou la (D-MeSer<sup>3</sup>)-cyclosporine [Zeder-Lutz *et al.* (1994)] ont en solution une conformation unique identique à celle de la CsA liée à la CyPA. Ces dérivés forment instantanément un

complexe avec la CyPA. Il semble donc que la CyPA ne reconnaît qu'une conformation préexistante et définie (tout trans) de la CsA parmi les nombreux conformères existant en solution aqueuse [Zeder-Lutz *et al.* (1994)].

Des modifications chimiques des résidus de la CsA permettent de moduler son affinité pour la CyPA. Il apparaît ainsi que les résidus MeBmt1 et MeVal11 sont particulièrement importants pour la fixation de la CsA. Par contre, la modification des résidus 3 à 9 ne change pas l'affinité de la CsA pour la CyPA [Quesniaux *et al.* (1987); Durette *et al.* (1988)]. Ces résultats sont confirmés par l'apport de la cristallographie et de la RMN. En effet, il apparaît que les résidus MeBmt1, Abu2, Sar3, MeLeu9, MeLeu10 et MeVal11 sont impliqués dans l'interaction avec la CyPA. Le résidu MeVal11 est déterminant pour cette interaction. Il se positionne dans la même poche hydrophobe que la proline des substrats de la CyPA [Thériault *et al.* (1993)]. Les autres résidus de la CsA exposés au solvant sont à même d'interagir avec la calcineurine [Pflügl *et al.* (1993); Thériault *et al.* (1993)]. Il est alors possible de considérer la CsA comme une molécule à deux domaines :

- un domaine de liaison à la CyPA (résidus 1-3 et 9-11)
- un domaine exposé avec une plus grande flexibilité et pouvant interagir avec la calcineurine (résidus 4-8)

La CsA se fixe à la CyPA dans une poche hydrophobe située à la surface du cylindre constitué par les feuillettes  $\beta$ . Cette poche est formée par quatre feuillettes  $\beta$  (B3, B4, B5 et B6) et 4 boucles (65-75, 102-110, 117-128 et 147-150). Treize résidus de cette poche interagissent avec la surface hydrophobe des résidus 1-3 et 9-11 de la CsA. Six liaisons hydrogènes renforcent également l'interaction de la CsA avec la CyPA (Tableau 2, p. 38) [Pflügl *et al.* (1993); Thériault *et al.* (1993); Ke *et al.* (1994)].

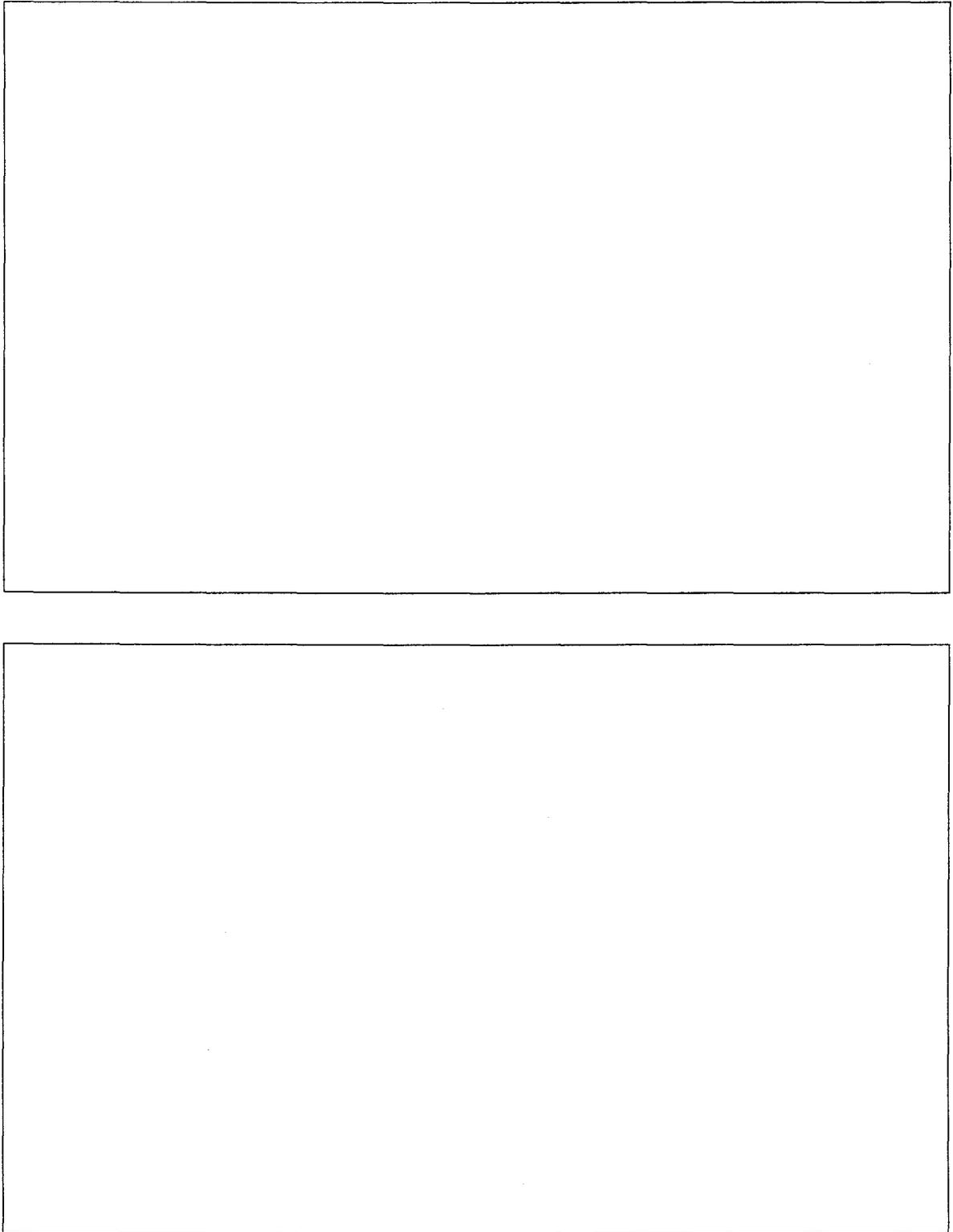
Tableau 2 : Interactions entre cyclosporine A et cyclophiline A

Interactions hydrophobes ou polaires entre la CsA et la CyPA		Liaisons hydrogène entre la CsA et la CyPA	
<i>résidus de la CsA</i>	<i>résidus de la CyPA</i>	<i>résidus de la CsA</i>	<i>résidus de la CyPA</i>
MeBmt1	Arg55, Ala101, Asn102, Ala 103	MeBmt1	Gln63
Abu2	Gly72, Ala101, Asn102, Ala103	Abu2	Asn102
Sar3	Gly72	Sar3	
MeLeu9	Phe60, Trp121	Ala7	Glu81
MeLeu10	Arg55, Phe60	MeLeu9	Trp121
MeVal11	Arg55, Phe60, Met61, Gln63, Ala101, Asn102, Phe113, Leu122, His126	MeLeu10	Arg55
		MeVal11	His126

[Pfügl *et al.* (1993); Thériault *et al.* (1993); Ke *et al.* (1994)]

Le résidu Trp121 est essentiel à la fixation de la CsA. La CsA est 75 fois moins affine pour la CyPA dont le résidu Trp121 est remplacé par un résidu de Phe. A l'inverse, la faible affinité de la rotamase d'*Escherichia coli* pour la CsA peut être restaurée si l'on remplace ce résidu de Trp dans la séquence [Liu *et al.* (1991); Fejzo *et al.* (1994)].

La structure de la poche hydrophobe de la CyPB est identique à celle de la CyPA. La conformation de la CsA liée à la CyPB est également semblable à celle de la CyPA [Neri *et al.* (1991); Mikol *et al.* (1994)]. Malgré ces similitudes, la CyPB présente pour la CsA un Kd apparent de 9,8 nM contre 36,8 nM pour la CyPA [Husi et Zurini (1994b)].



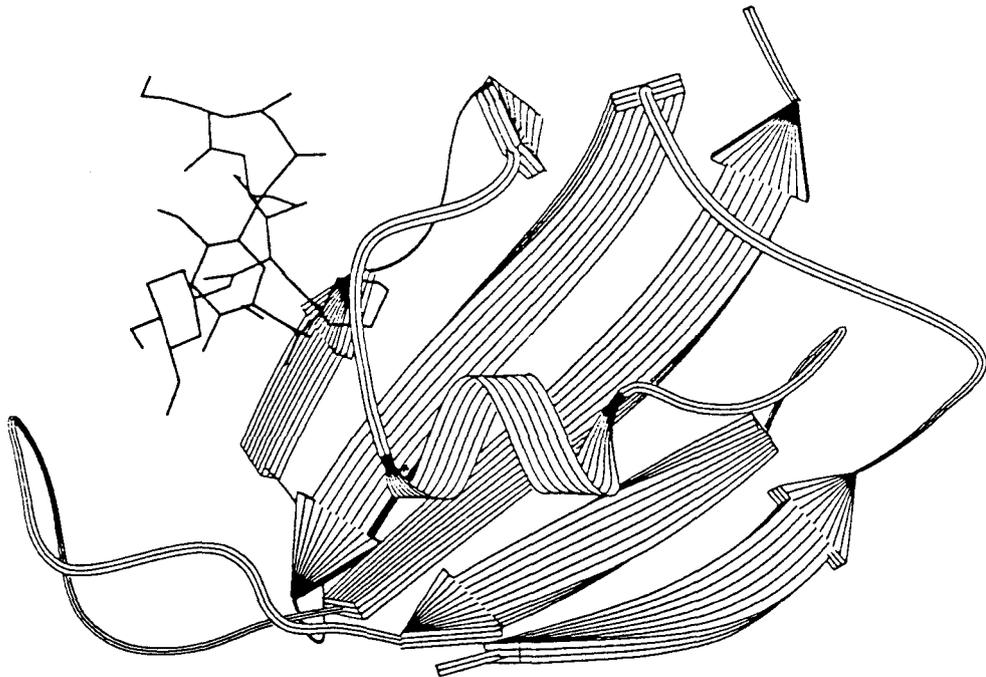
**Figure 10** : Structure tridimensionnelle du complexe cyclophiline B/cyclosporine A [Mikol *et al.* (1994)]

La conformation de la CsA liée à la CyPC est différente de celle du complexe CyPA/CsA. Cette variation peut être due à la structure de la boucle Gln179-Thr189 de la CyPC. En effet, elle diffère de la boucle correspondante de la CyPA proche du site de fixation de la CsA [Ke *et al.* (1993)]. Le Kd de la CyPC pour la CsA est donc plus faible (90,38 nM) [Husi et Zurini (1994b)].

Il existe une forte similitude entre les structures de la CyPA et de l'interleukine 8 (IL-8). En solution, l'IL-8 se présente sous la forme d'un dimère. Sa structure est composée de feuillets  $\beta$  et de deux hélices  $\alpha$  situées au dessus et en dessous de ces feuillets comme pour la CyPA [Clare *et al.* (1990)]. L'IL-8 apparaît donc capable de fixer la CsA avec un Kd de 850 nM. Cette fixation est spécifique. Ni la [D-Meval11]-cyclosporine (qui ne se fixe pas à la CsA) ni la rapamycine ne se fixent à l'IL-8. Les résidus d'acides aminés de la CyPA définis dans le site d'interaction avec la CsA ont leurs équivalents dans le dimère de l'IL-8 notamment le résidu Trp84 de l'IL-8 qui correspond au résidu Trp121 de la CyPA [Bang *et al.* (1993)].

## **B. Structure des FKBP(s) et des complexes FKBP(s)/FK506 et FKBP(s)/rapamycine**

La structure du FKBP12 comporte cinq feuillets  $\beta$  enveloppant une courte hélice  $\alpha$  totalement différente de celles des cyclophilines [van Duyne *et al.* (1993)]. La fixation du FK506 ou de la rapamycine n'induit pas de changement de structure de la protéine. Le FK506 et la rapamycine ont un site commun de fixation au FKBP12 (la région C1-C14 qui représente environ la moitié de chaque molécule). La fixation se fait dans une poche hydrophobe du FKBP12 comprenant les résidus Tyr26, Phe46, Phe99, Val55, Ile56 et Trp59. La partie exposée au solvant est propre à chacun de ces immunosuppresseurs (région C17-C22 du FK506 et C14-C23 de la rapamycine). Elle est responsable du mode d'action différent de ces deux molécules. En solution, le FK506 possède une forme cis et une forme trans en équilibre. Lorsque le FK506 se lie au FKBP12, il subit un profond changement de conformation et adopte une forme trans unique [Rosen *et al.* (1990)].



**Figure 11** : Structure du complexe FKBP12/FK506 [Schmid (1993)]

### III. L'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique

Les peptidyl prolyl cis-trans isomérasés catalysent efficacement l'isomérisation des liaisons prolyls d'oligopeptide. Pour certaines protéines, elles accélèrent aussi l'étape lente d'isomérisation des résidus de proline lors de la mise en conformation. Cette activité enzymatique particulière a été mise en évidence pour la première fois par Fischer *et al.* (1984) avec la peptidyl prolyl cis-trans isomérase de rein de porc ultérieurement identifiée comme étant la CyPA.

#### A. Importance des résidus de proline

##### 1. Structure de la proline

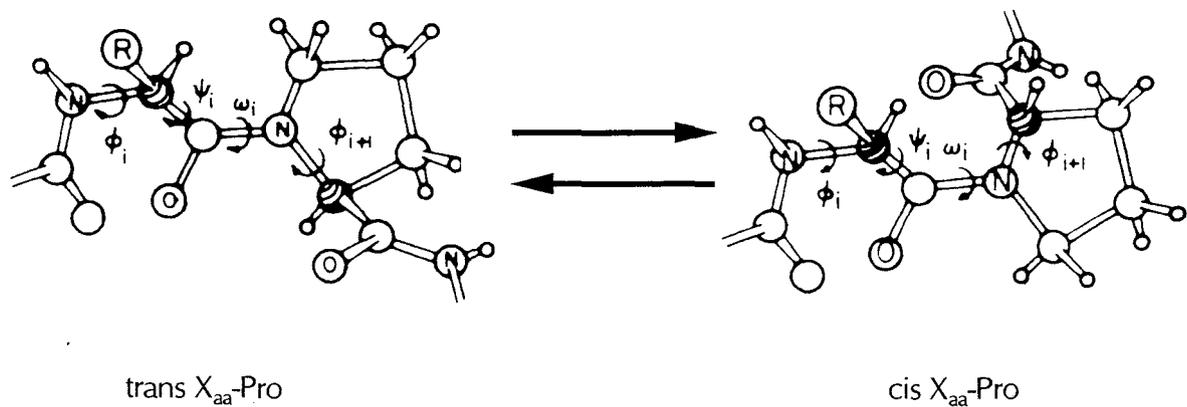
Parmi l'ensemble des acides aminés, la proline présente des caractéristiques uniques car son atome d'azote en  $\alpha$  est inclus dans un cycle pyrrolidine. Cette modification de l'azote  $\alpha$  affecte la basicité et la polarité de la molécule. Le proton amide étant remplacé par un

groupement  $\text{CH}_2$ , la proline ne peut pas agir comme donneur de liaison hydrogène, des contraintes apparaissent sur les angles diédraux  $\phi$ ,  $\psi$  et  $\omega$  de la chaîne peptidique.

Le résidu de proline dans une liaison peptidique apporte trois données conformationnelles importantes :

- l'angle  $\phi$  est contraint aux alentours de  $65^\circ$
- la liaison peptidique présente des conformations cis et trans. Les autres conformations sont instables (**Figure 12**, p. 42).
- l'énergie demandée pour passer d'une conformation à l'autre est importante à l'échelle des processus biologiques

Ces propriétés vont imposer des restrictions aux structures secondaire et tertiaire des protéines. En effet, la proline est connue pour perturber la structure des résidus la précédant en raison de sa conformation particulière et de son impossibilité à établir une liaison hydrogène [Yaron et Naider (1993); Fischer (1994); Galat et Metcalfe (1995)].



**Figure 12** : Isomérisation cis-trans de la liaison prolyl [Yaron et Naider (1993)]

L'angle de torsion  $\omega$  de la liaison peptidique peut être cis ou trans. Son énergie conformationnelle fait que la conformation cis apparaît très rarement dans les protéines sauf lorsque le résidu proline est impliqué dans cette liaison. Dans ce cas, la probabilité de former une liaison peptidique en cis est de 0,1 à 0,3 contre moins de 0,001 pour les 19 autres acides aminés [Brandts *et al.* (1975)]. La barrière d'énergie d'activation pour l'isomérisation de la liaison  $X_{aa}$ -Pro (85 kJ/mol) plus élevée que pour les autres liaisons (30 kJ/mol) est responsable de cette différence [Schmid (1993)].

## 2. Rôle des résidus de proline dans les protéines

Le taux de proline dans les protéines peut varier de zéro (histones) à 30% dans certaines protéines riches en proline (kératines, collagènes) avec une moyenne de 5 à 7,5%. Seule la liaison peptidique X<sub>aa</sub>-Pro présente une fréquence notable de forme cis. Souvent, la forme cis de la liaison X<sub>aa</sub>-Pro est rencontrée lorsque la proline est précédée par un acide aminé aromatique, la forme trans est elle, généralement suivie par un acide aminé aromatique [Frommel et Preisner (1990)].

Les protéines riches en proline peuvent être classées en fonctions des séquences riches en proline qu'elles contiennent. Les résidus de proline y jouent non seulement un rôle structural mais interviennent également dans les mécanismes de liaison. Ainsi, la liaison de la myosine kinase à l'actine est liée à la présentation correcte de son extrémité N-terminale par une région à motif (Ala-Pro)<sub>n</sub>. De même, lors de la transduction du signal, Grb2 interagit par ses domaines SH3 avec les régions riches en proline du facteur Sos. Les interactions domaines SH3/régions riches en proline sont également retrouvées dans les mécanismes d'endocytose faisant intervenir des récepteurs autophosphorylables. Dans une étape commune intervient l'association phosphatidylinositol 3-kinase/dynamine. Ce type d'interaction est souvent moins spécifique mais s'établit beaucoup plus rapidement grâce à la rigidité des régions riches en proline [Williamson (1994)].

Des résidus de proline sont toujours retrouvés dans les régions transmembranaires des protéines possédant une fonction de transport. Ils sont absents lorsque ces mêmes protéines sont dépourvues de fonction de transport. L'isomérisation cis-trans de ces résidus de proline pourrait provoquer l'ouverture et la fermeture des canaux transmembranaires. Le caractère négatif de la liaison X<sub>aa</sub>-Pro interviendrait dans l'interaction avec les ligands positifs (proton/cation) [Brandl et Deber (1986); Williams et Deber (1991)].

Certaines protéines présentent en solution plusieurs conformations dues à l'isomérisation des résidus de proline, notamment la nucléase de staphylocoque. Elle possède deux formes natives en équilibre en raison de l'isomérisation cis-trans du résidu Pro117 [Fox *et al.* (1986)]. Il en est de même pour la calbindin D<sub>9k</sub> avec l'isomérisation de la liaison Gly42-Pro43 [Chazin *et al.* (1989)].

### 3. Importance des résidus de proline dans la mise en conformation des protéines

L'étude de la mise en conformation de la ribonucléase A (RNase A) montre que les molécules se renaturent à des vitesses différentes. Ainsi, on observe lors de la renaturation une étape rapide et une étape lente. L'isomérisation des liaisons X<sub>aa</sub>-Pro est responsable de l'étape lente. L'influence des résidus de proline sur la mise en conformation des protéines a été montrée dans de nombreux cas ( chaîne légère des immunoglobulines, nucléase de staphylocoque, anhydrase carbonique, ...). Cependant, tous les résidus de proline n'ont pas la même influence et certains n'affectent en rien la mise en conformation des protéines [Schmid (1993)]. L'isomérisation des liaisons X<sub>aa</sub>-Pro se déroule toujours après la mise en place rapide de la structure de la protéine.

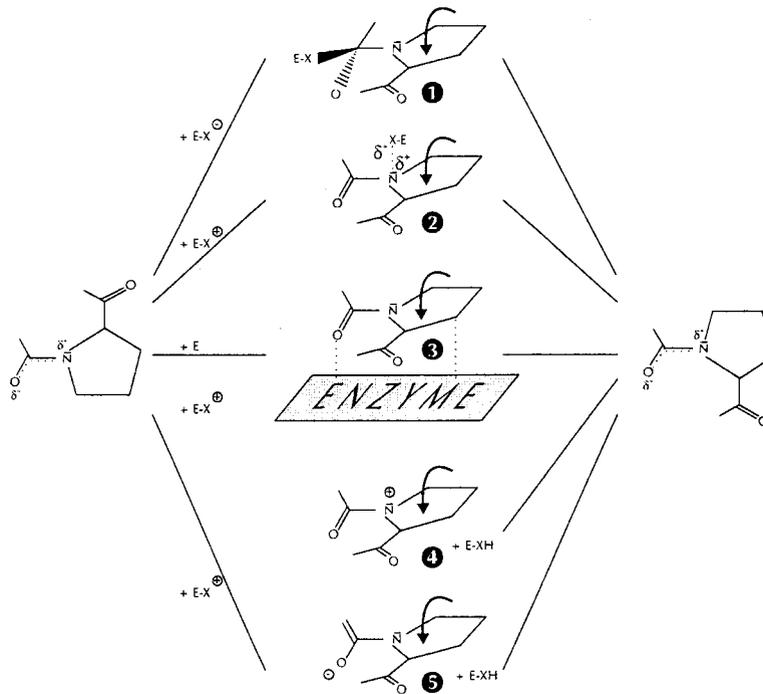
## B. Mécanisme d'action des peptidyl prolyl cis-trans isomérases

Les peptidyl prolyl cis-trans isomérases catalysent une réaction différente de la plupart des réactions enzymatiques. En effet :

- il n'y pas de formation ou de rupture de liaisons covalentes
- il n'y pas d'accumulation d'intermédiaires au cours de la réaction
- aucun cofacteur connu n'est requis

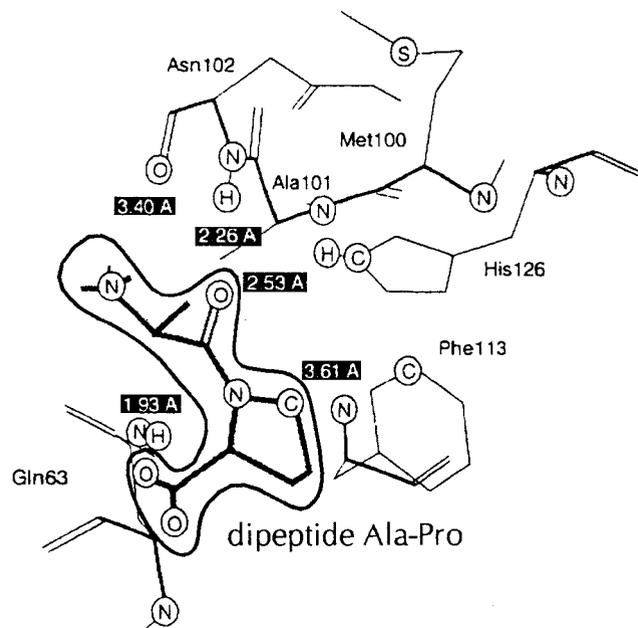
### 1. Mécanisme d'action des peptidyl prolyl cis-trans isomérases

La caractéristique principale de l'isomérisation des liaisons prolyls est la diminution du caractère double liaison. Plusieurs mécanismes sont envisageables pour arriver à cette état de transition (Figure 13, p. 45). Certains font intervenir les groupements nucléophiles (E-X) ou électrophiles (E-X<sup>+</sup>) de l'enzyme. Cependant, l'hypothèse la plus probable correspond à la stabilisation d'un état de transition apolaire par désolvatation. En effet, il a été montré que l'état de transition de la liaison prolyl est moins polaire que les conformères cis ou trans plus stables [Radzicka *et al.* (1992)]. La stabilisation de cet état serait assurée par l'environnement hydrophobe du site enzymatique. La peptidyl prolyl cis-trans isomérase imposerait une tension suffisante à la liaison prolyl pour l'amener à un angle  $\omega$  de 90° diminuant ainsi fortement l'enthalpie d'activation de l'isomérisation de la liaison [Harrison et Stein (1992); Fischer (1994)].



**Figure 13** : Mécanismes proposés pour la catalyse de l'isomérisation des liaisons prolyls par une peptidyl prolyl cis-trans isomérase [Fischer (1994)]

L'analyse structurale du complexe CyPA/Ala-Pro montre que les résidus His126, Gln63 et le segment Met100-Asn102 pourraient constituer la base du site catalytique. Une molécule d'eau constitutivement associée au résidu Gln63 contribuerait à la stabilisation de l'état de transition [Ke *et al.* (1993)].



**Figure 14** : Structure du complexe cyclophiline A/dipeptide Ala-Pro [Ke *et al.* (1993), Fischer (1994)].

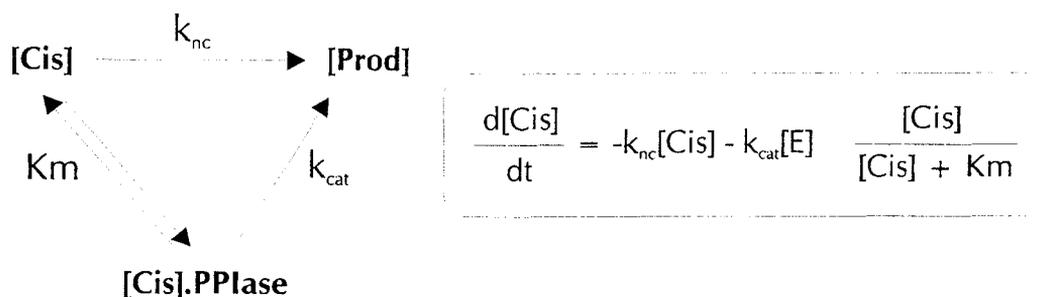
Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de séparer l'activité enzymatique de la CyPA de la fixation à la CsA. Le remplacement du résidu Trp121 affecte dix fois plus l'affinité de la CyPA pour la CsA que son activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique. D'autre part, les CyPA mutées sur les résidus His126, Phe60 ou Arg55 fixent la CsA mais ne présentent plus d'activité enzymatique [Zydowski *et al.* (1992)]. On retrouve le même cas de figure pour le FKBP12 où la mutation des résidus Phe36 ou Tyr82 touche essentiellement l'activité enzymatique alors que la mutation du résidu Asp37 provoque une diminution d'affinité pour le FK506 [Bossard *et al.* (1994); Fischer (1994)].

## **2. Spécificité des peptidyl prolyl cis-trans isomérases**

L'emploi de différents térapeptides du type succinyl-Ala-X<sub>aa</sub>-Pro-Phe-4-nitroanilide permet l'étude de la spécificité des peptidyl prolyl cis-trans isomérases pour la proline et le résidu en position Xaa. La spécificité pour la proline est stricte. Toute modification de sa structure entraîne une inhibition presque totale de l'activité enzymatique [Schmid (1994)]. La CyPA tolère en position Xaa de nombreux résidus d'acides aminés différents. En effet, pour neuf acides aminés testés à cette position, la valeur  $k_{cat}/K_m$  varie de moins d'un ordre de grandeur. Par contre, avec les mêmes acides aminés, le FKBP12 présente des variations de trois ordres de grandeur. La valeur de  $k_{cat}/K_m$  augmente avec le degré d'hydrophobicité du résidu en position Xaa [Harrison et Stein (1990); Harrison et Stein (1992)]. Il semble donc que cyclophilines et FKBP12 présentent une spécificité différente, tout au moins pour le résidu d'acide aminé en Nt de la proline.

## **3. Paramètres cinétiques de la réaction de prolyl isomérisation**

L'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique peut être mise en évidence grâce à l'emploi d'une méthode spectrophotométrique exploitant la spécificité conformationnelle de la chymotrypsine pour les peptides du type X-Pro-Phe-4-nitroanilide (X-Pro-Phe-pNA). En effet, la chymotrypsine n'hydrolyse la liaison en Ct du résidu de Phe (avec libération de pNA) que si la liaison X-Pro est en trans. L'isomérisation des conformères cis vers la forme trans, naturellement lente, peut être catalysée par la présence d'une peptidyl prolyl cis-trans isomérase [Fischer *et al.* (1984); Fischer *et al.* (1989)].



**Figure 15 :** Mécanisme cinétique de l'isomérisation de la liaison prolyl catalysée par une peptidyl prolyl cis-trans isomérase. [Cis] représente la concentration en conformère cis, [E] la concentration en enzyme,  $k_{nc}$  la constante de vitesse du 1<sup>er</sup> ordre pour la réaction d'isomérisation non catalysée,  $k_{cat}$  la constante de renouvellement pour la réaction d'isomérisation catalysée,  $K_m$  la constante de Michaelis-Menten.

Dans la mesure de l'activité prolyl isomérasique l'isomérisation naturelle (non catalysée) complique fortement l'analyse cinétique. L'utilisation du test couplé à la chymotrypsine ne permet de déduire que la valeur  $k_{cat}/K_m$  en utilisant l'équation  $k_{cat}/K_m = k_{obs} - k_{nc}/[E]$  où  $k_{obs}$  est la constante de vitesse du 1<sup>er</sup> ordre pour la réaction catalysée [Harrison et Stein (1990)].

Des conditions de solvant particulières augmentent considérablement le pourcentage de conformère cis au départ de la réaction (50-70% au lieu de 10-15% habituellement). Combiné à un travail à basse température, ceci permet de se rapprocher de la valeur de  $K_m$  et de déterminer les paramètres cinétiques à l'équilibre ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ) [Kofron *et al.* (1991)].

**Tableau 3 :** Paramètres cinétiques à l'équilibre de la cyclophiline A et du FKBP12

<i>PPlase</i>	substrat	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )
<i>CyPA bovine</i>	suc-Ala-Ala-(cis)Pro-Phe-pNA	0,98 +/- 0,14	13200 +/- 880
<i>CyPA humaine</i>	suc-Ala-Ala-(cis)Pro-Phe-pNA	0,87 +/- 0,084	12700 +/- 550
<i>FKBP12 bovin</i>	suc-Ala-Leu-(cis)Pro-Phe-pNA	0,52 +/- 0,08	344 +/- 26

[Kofron *et al.* (1991)]

L'utilisation d'un peptide fluorescent 2-aminobenzoyl-Gly-Ala-Pro-Phe(4-NO<sub>2</sub>)-X<sub>aa</sub>-NH<sub>2</sub> dont les extrémités provoquent une extinction réciproque de la fluorescence suivant la conformation a permis de se passer de l'utilisation de la chymotrypsine [Garciaecheverria *et*

*al.* (1992)]. La RMN à une dimension peut également être utilisée pour caractériser la catalyse de l'isomérisation des liaisons prolyls. Cette technique devrait permettre d'utiliser des peptides sans chromophore à l'extrémité C-terminale [Hübner *et al.* (1991)].

### C. Démonstration *in vitro* et *in vivo* de l'activité des peptidyl prolyl cis-trans isomérase

#### 1. L'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique *in vitro*

L'utilisation du test couplé à la chymotrypsine montre l'action des peptidyl prolyl cis-trans isomérase sur l'isomérisation cis-trans d'oligopeptides. Il reste ensuite à démontrer cette activité vis à vis des protéines. Les protéines présentant, au cours de leur mise en conformation, une étape lente due à l'isomérisation des liaisons prolyls constituent les substrats idéaux pour cette recherche. L'influence de la CyPA a été étudiée essentiellement *in vitro* au cours de la renaturation de protéines préalablement dénaturées par l'urée ou le chlorure de guanidium.

**Tableau 4 :** Protéines dont la renaturation *in vitro* est catalysée par la cyclophiline

Cyclophilines	Protéines	Références
CyPA porcine	RNase A bovine	Fischer et Bang (1985)
CyPA porcine	fragment 1-20 de la RNase A (RNase A « S-protein »)	Lang <i>et al.</i> (1987)
CyPA porcine	RNase A porcine	Lang <i>et al.</i> (1987)
CyPA humaine; CyPA porcine CyP cytosolique d' <i>Escherichia coli</i> , de <i>saccharomyces cerevisiae</i> et de <i>Neurospora crassa</i>	RNase T <sub>1</sub> ( <i>Aspergillus oryzae</i> )	Lin <i>et al.</i> (1988); Schönbrunner <i>et al.</i> (1991)
CyPA porcine	collagène de type III	Bächinger (1987)
CyPA porcine	cytochrome c	Lin <i>et al.</i> (1988)
CyPA porcine; NK-TR	anhydrase carbonique II	Freskgard <i>et al.</i> (1992); Kern <i>et al.</i> (1994); Rinfret <i>et al.</i> (1994); Kern <i>et al.</i> (1995)
CyPA porcine	chaîne légère des Ig de souris	Lang <i>et al.</i> (1987)
CyPA humaine	fragment Fab des Ig de souris	Lilie <i>et al.</i> (1993)

Dans le test couplé à la chymotrypsine, la catalyse par la CyPA d'une protéine entière est nettement moins efficace que celle d'un peptide. Ainsi, cette catalyse est 60 fois plus faible pour la renaturation de la chaîne légère des immunoglobulines, qui constitue le meilleur des cas [Lang *et al.* (1987)].

L'effet de la CyPA sur la vitesse de renaturation de la RNase A bovine n'est pas clairement montré. Cependant, la renaturation du fragment 1-20 de cette protéine, comprenant quatre résidus de proline, est catalysée par la présence de CyPA. Il apparaît donc que l'accessibilité des résidus de proline est un facteur critique pour l'intervention des peptidyl prolyl cis-trans isomérase [Lang *et al.* (1987)]. Ceci est confirmé par le fait que la renaturation de la  $\beta$ -lactoglobuline, de la thiorédoxine ou du chymotrypsinogène, présentant une étape lente d'isomérisation des liaisons prolyls, n'est pas catalysée par la CyPA [Lin *et al.* (1988)].

La RNase T<sub>1</sub> réduite et carboxyméthylée peut être dénaturée et renaturée par simple variation de la concentration en NaCl. Grâce à cette propriété, il a pu être montré que la CyPA catalyse l'isomérisation des liaisons prolyls dans le sens de la renaturation mais aussi dans le sens de la dénaturation [Mücke et Schmid (1992)].

La RMN à une et deux dimensions a été utilisée pour montrer, sans étude de dénaturation-renaturation, que la calcitonine, une hormone peptidique de 32 résidus d'acides aminés, est un substrat *in vitro* de la CyPA. Elle catalyse l'isomérisation de la liaison Phe22-Pro23 mais pas celle de la liaison Ala31-Pro32 suggérant une différence d'accessibilité ou une spécificité de substrat [Kern *et al.* (1993)].

L'addition de peptidyl prolyl cis-trans isomérase est capable d'influencer le pourcentage de protéines correctement conformées après renaturation dans le cas du fragment Fab des immunoglobulines [Lilie *et al.* (1993)] ou de l'anhydrase carbonique II [Freskgard *et al.* (1992); Rinfret *et al.* (1994)]. Dans le cas de l'anhydrase carbonique II, la CyPA ou le NK-TR, en plus de leur fonction prolyl isomérase, agiraient comme protéine chaperonne en intervenant à un stade précoce de la renaturation pour prévenir la formation de protéines mal conformées. Ces résultats ne sont cependant pas retrouvés par tous les auteurs [Kern *et al.* (1994); Kern *et al.* (1995)].

La catalyse de la renaturation de protéines par le FKBP a été beaucoup moins étudiée que pour les cyclophilines. Elle a quand même été montrée pour le fragment Fab des immunoglobulines [Lilie *et al.* (1993)] ou l'anhydrase carbonique II [Kern *et al.* (1995)].

## 2. Intervention des peptidyl prolyl cis-trans isomérase *in vivo*

### a) La mise en conformation des protéines dans l'environnement cellulaire

Depuis les travaux d'Anfinsen (1973) sur la renaturation de la RNase, il est couramment admis que la mise en conformation des protéines est un phénomène spontané, dépendant uniquement de la séquence en acides aminés pour atteindre une conformation d'énergie minimale dans un environnement donné. Les expérimentations *in vitro* ne reflètent totalement les conditions *in vivo*. En effet :

- certaines conditions physico-chimiques ne sont pas reproductibles *in vitro* notamment en ce qui concerne la concentration des différentes protéines présentes.
- la renaturation *in vitro* se fait sur la chaîne polypeptidique entière alors que la mise en conformation *in vivo* est un processus vectoriel débutant par l'extrémité N-terminale.
- l'assemblage de nombreuses protéines oligomériques nécessite d'être réalisé avant la mise en conformation totale des monomères, ce qui a une faible probabilité de se réaliser *in vitro*.

Les développements récents de la biochimie et de la biologie cellulaire ont montré que dans l'environnement cellulaire, la mise en conformation des protéines peut être assistée de plusieurs manières par différentes classes de protéines. Outre les peptidyl prolyl cis-trans isomérase, la protéine disulfide isomérase (PDI) et les molécules chaperonnes sont à même d'intervenir dans ces phénomènes.

La PDI est une protéine résidente et abondante du réticulum endoplasmique. Elle catalyse l'isomérisation des ponts disulfures d'une protéine pour arriver à la combinaison la plus stable thermodynamiquement. C'est un homodimère dont chaque sous-unité de 57 kDa possède de fortes homologues fonctionnelles et de séquence avec la thiorédoxine. Bien que la PDI soit un véritable enzyme, son efficacité catalytique est faible. Mais sa spécificité large et son abondance naturelle (10% des protéines solubles du réticulum endoplasmique)

lui permettent vraisemblablement de compenser cet inconvénient [Freedman (1989); Lorimer (1992)].

Le concept de molécules chaperonnes définit une classe de protéines dont la fonction est d'assurer une mise en conformation correcte de certaines protéines [Ellis (1987)]. Bien qu'elles soient exprimées constitutivement, des conditions de stress comme les chocs thermiques provoquent leur synthèse accrue, d'où leur appellation de protéines de stress ou de « heat shock proteins » (**hsp**). Dans ce cas, elles s'associent aux protéines en cours de dénaturation pour éviter la formation d'agrégats insolubles. On distingue trois grandes familles de molécules chaperonnes, les protéines de stress de 70 et 90 kDa et les chaperonines.

Les protéines de stress de 70 kDa sont constituées d'un domaine conservé de fixation et d'hydrolyse de l'ATP et d'un domaine spécifique de fixation à la protéine cible [Gething et Sambrook (1992)]. La mieux caractérisée est la *grp78* (« glucose related protein ») également appelée BiP (« immunoglobulin heavy chain-binding protein »). C'est une protéine résidente du réticulum endoplasmique. Une de ces fonctions est de s'associer aux chaînes lourdes des immunoglobulines jusqu'à leur assemblage avec les chaînes légères [Bole *et al.* (1986)]. Les protéines de stress de 90 kDa sont moins diversifiées que celles de 70 kDa. Peu de choses sont connues sur leurs rôles. Il semble qu'elles interviennent surtout dans des interactions visant à stabiliser la protéine cible dans un état inactif. Les plus connues sont la *grp94*, qui comme la *grp78* est induite par l'accumulation de protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique [Gething et Sambrook (1992)], et la *hsp90* qui entre dans la composition du complexe du récepteur inactif aux hormones stéroïdes [Pratt (1993)]. Les chaperonines constituent la troisième classe de molécules chaperonnes. Elles sont présentes chez tous les procaryotes dans les mitochondries et les chloroplastes des chloroplastes. Ce sont des protéines oligomériques de 14 sous-unités de 60 kDa disposées en deux anneaux superposés de 7 sous-unités. La *hsp60* (chaperonine mitochondriale des eucaryotes) est directement impliquée dans la mise en conformation des protéines importées dans la matrice mitochondriale [Gething et Sambrook (1992)].

b) Intervention de l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérase dans la mise en conformation *in vivo* des protéines

L'activité enzymatique *in vitro* des peptidyl prolyl cis-trans isomérase commence à être bien caractérisée mais l'intervention de cette activité dans des fonctions cellulaires reste mal définie. Les premières preuves de l'intervention d'une CyP dans la mise en conformation *in vivo* de protéines furent des démonstrations indirectes. En effet, la CsA provoque un retard de la mise en conformation de deux protéines secrétées : la transferrine et le collagène.

L'augmentation de la résistance à la protéolyse a été utilisée pour suivre la maturation du collagène de type I dans des fibroblastes d'embryon de poulet. Le temps de  $\frac{1}{2}$  vie de la mise en conformation de la triple hélice de collagène augmente de 60% en présence de CsA. Ce ralentissement s'accompagne aussi d'une augmentation des modifications post-traductionnelles et de la dégradation intracellulaire du collagène [Steinmann *et al.* (1991)]. De la même manière, la mise en conformation *in vivo* de la transferrine dans les cellules HepG2 est suivi par retard de migration en gel de polyacrylamide. L'addition de CsA provoque un retard de 10 min de la mise en conformation de la protéine qui ensuite se déroule normalement. L'augmentation de la concentration en CsA réduit la sécrétion de la transferrine pour finir par la bloquer complètement [Lodish et Kong (1991)]. Le problème reste que dans ces deux cas les effets observés sont faibles et difficilement différenciables d'autres effets potentiels de la CsA. Le fait qu'il s'agisse de deux protéines secrétées laisse à penser que la CsA exerce son effet inhibiteur vis à vis d'une cyclophiline présente dans la voie de sécrétion comme la CyPB ou la CyPC.

Cette hypothèse est confortée par le fait que dans le réticulum endoplasmique et les vésicules pré-golgiennes de fibroblastes murins, la CyPB et la hsp47 sont trouvées associées au procollagène de type I. Le traitement des cellules par la CsA entraîne la dissociation de la CyPB, une diminution de la vitesse de dissociation de la hsp47 et de la sécrétion du collagène. Le mécanisme de coopération entre la CyPB et la hsp47 reste mal défini. La hsp47 pourrait d'abord agir en tant que protéine chaperonne pour limiter les phénomènes l'agrégation puis, avec la CyPB, avoir un effet anti-chaperonne destiné à concentrer le procollagène en vue de sa sécrétion [Smith *et al.* (1995)]. Ces travaux ne permettent pas de savoir si l'activité enzymatique de la CyPB est impliquée. Le modèle de *Saccharomyces cerevisiae* confirme le rapprochement entre les peptidyl prolyl cis-trans isomérase et les

protéines chaperonnes. En effet, les chocs thermiques induisent une synthèse accrue de la CyP1 cytoplasmique et de la CYP2 du réticulum endoplasmique. La production accrue de ces cyclophilines facilite la survie cellulaire lors du choc thermique. L'amplitude de l'induction est similaire à celle observée pour les hsp. La transcription du gène de la CYP1 est sous le contrôle d'une séquence en cis proche de celle contrôlant le gène de la HSE (« heat shock response element »). Aucune induction de l'expression du FKBP1 n'est déclenchée par le choc thermique. Par contre, la sonde nucléotidique FKBP1 détecte un transcrit pouvant provenir d'un autre gène de la famille des FKBP et dont le taux de transcription augmente après un choc thermique. [Sykes *et al.* (1993)]. De manière identique, la transcription du gène du FKBP13 augmente fortement lorsque des cellules de rein de chien (MDCK) sont soumises à des conditions connues pour provoquer une induction des protéines de stress (traitement par la tunicamycine ou les ionophores  $\text{Ca}^{2+}$ ). L'analyse de la séquence en 5' du gène murin du FKBP13 révèle une grande similarité avec les régions correspondantes des gènes de la grp78 et de la grp94 [Bush *et al.* (1994)].

Une autre approche a consisté à exprimer dans le périplasma d'*Escherichia coli* les fragment  $F_{ab}$ ,  $F_V$ ,  $V_H-V_L$  et  $V_L-V_H$  d'immunoglobulines. La CyP périplasmique a été surexprimée jusqu'à un rapport de 40 molécules de CyP par fragment d'immunoglobulines. Seul un effet sur le taux de fragment  $V_H-V_L$  correctement conformé (+ 80%) est observé. Malheureusement, la vitesse de mise en conformation de ces fragments n'a pas été étudiée. De plus, la surexpression de la protéine DsbA, équivalent de la PDI et essentielle à l'assemblage des fragments, ne change pas non plus le taux de recouvrement de fragments bien conformés [Knappik *et al.* (1993)].

L'importation de protéines dans la matrice mitochondriale est aussi un bon modèle pour l'étude de la mise en conformation des protéines. En effet, ces protéines sont synthétisées dans le cytosol et leur translocation au travers de la membrane mitochondriale se fait sous forme dénaturée. Leur renaturation dans la matrice mitochondriale fait intervenir entre autre la hsp70 et la chaperonine GrpEp. Une protéine de fusion comprenant la dihydrofolate réductase et la séquence de ciblage vers la matrice mitochondriale de l'ATPase  $F_1-F_{10}$  a servi à étudier l'importation de protéines dans des mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae*. Il apparaît que la vitesse de renaturation de la protéine de fusion importée est six fois plus lente après traitement par la CsA. Si des mitochondries déficientes

en CyP3 sont utilisées, la même diminution de vitesse est observée, confirmant que cette CyP est directement impliquée dans les mécanismes de mise en conformation des protéines importées dans la matrice mitochondriale. Par contre, la CsA ou la délétion de la CyP3 n'affectent pas l'importation des protéines [Mastouschek *et al.* (1995)]. Cette importance de la cyclophiline mitochondriale est aussi retrouvée chez *Neurospora crassa* grâce à l'utilisation de mutants déficients en cet enzyme. Les hsp60 et hsp70 coopèrent avec cette cyclophiline pour constituer un ensemble fonctionnel assurant la mise en conformation des protéines importées dans la matrice mitochondriale [Rassow *et al.* (1995)].

La coopération entre protéines chaperonnes et cyclophilines et FKBP a aussi été montrée dans le cytosol grâce à l'utilisation de lysats de réticulocytes comme système de translation *in vitro*. En effet, la mise en conformation de deux luciférase (une protéine dimérique et une protéine de fusion) dans le cytosol nécessite de l'ATP, suggérant l'intervention de protéines chaperonnes, et est inhibée par l'addition simultanée de CsA ou de FK506. L'inhibition n'est que partielle si l'on n'utilise que l'un ou l'autre de ces immunosuppresseurs. Il s'agit de la première mise en évidence de l'intervention des peptidyl prolyl cis-trans isomérase dans la mise en conformation des protéines dans le cytosol [Kruse *et al.* (1995)].

Les expérimentations *in vivo* sur le rôle de l'activité enzymatique des peptidyl prolyl cis-trans isomérase ne permettent pas de les impliquer uniquement dans un rôle de catalyse des liaisons prolyls lors de la mise en conformation des protéines. Si cette activité semble bien intervenir dans la maturation du collagène et la renaturation des protéines importées dans la matrice mitochondriale, les parallèles avec les protéines chaperonnes, notamment les protéines de stress de 70 kDa, sont nombreux :

- ces deux familles de protéines sont retrouvées dans tous les compartiments cellulaires
- elles sont inductibles par des conditions de stress mais sont quand même exprimées constitutivement (CYP1, CYP2, FKBP13 pour les peptidyl prolyl cis-trans isomérase)
- elles augmentent la survie des cellules exposées à une haute température (CYP1 et CYP2 pour les peptidyl prolyl cis-trans isomérase)
- elles facilitent la mise en conformation correcte des protéines (activité chaperonne de la CyPA pour l'anhydrase carbonique II)

## LES PEPTIDYL PROLYL CIS-TRANS ISOMERASES ET L'IMMUNOSUPPRESSION

### I. Pourquoi l'immunosuppression?

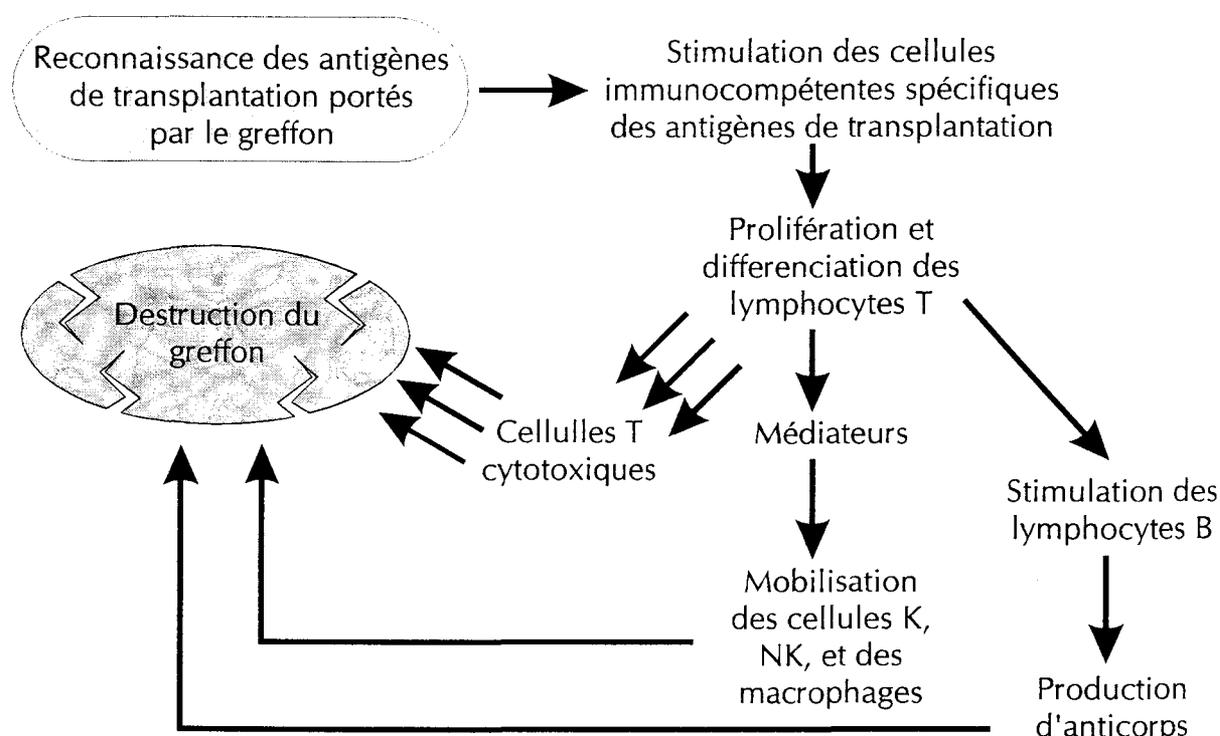
Pendant que progressaient les connaissances fondamentales en immunopathologies, des techniques d'immunomodulations se sont développées. Elles visent à interrompre les réactions indésirables du système immunitaire. Les pathologies dysimmunitaires peuvent être d'origine naturelle (maladies auto-immunes, allergies), mais également la conséquence d'actes médicaux (greffes d'organes). Des progrès énormes ont été réalisés, particulièrement depuis l'apparition de la CsA. L'utilisation clinique de la CsA s'est surtout développée dans les greffes d'organes et de moelle osseuse, et plus récemment dans les maladies auto-immunes.

Le succès des greffes dépend des groupes tissulaires et nécessite une identité génétique totale (autogreffe ou syngreffe) sinon partielle (allogreffe) entre le donneur et le receveur.

Les travaux de Jean Dausset en 1958 ont permis la découverte des antigènes majeurs d'histocompatibilité ou groupes tissulaires constituant le système HLA (Human Leucocyte Antigen). Ces antigènes majeurs d'histocompatibilité constituent un ensemble unique de molécules exprimées sur les cellules de l'organisme. Ils interviennent dans le mécanisme du rejet de greffe et jouent un rôle prépondérant dans la reconnaissance du soi et du non-soi et dans la régulation de la réponse immune. L'extrême polymorphisme des gènes qui en gouvernent la synthèse fait que ces antigènes d'histocompatibilité constituent de véritables marqueurs d'identité. C'est pourquoi ces « marqueurs du soi » sont si importants dans le rejet de greffe. En l'absence de traitement immunosuppresseur et d'une identité au moins partielle entre les individus au niveau du HLA, le système immunitaire reconnaît le caractère étranger du greffon et déclenche une série d'événements conduisant à un inévitable rejet de greffe.

Le rejet d'une allogreffe peut être divisée en 3 étapes :

- reconnaissance, prolifération et différenciation des lymphocytes (phase de sensibilisation)
- migration des cellules sensibilisées
- destruction du greffon (phase effectrice)



**Figure 16 :** Principales étapes du rejet de greffe

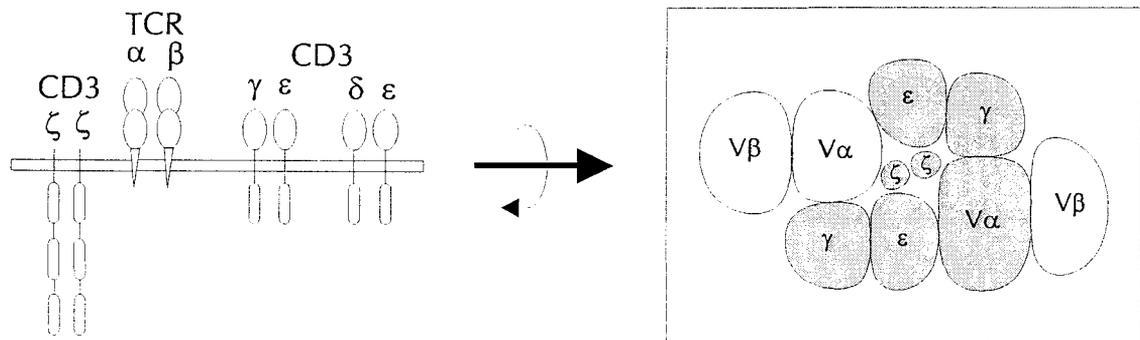
### A. Bases moléculaires de la phase de sensibilisation

Les allogreffes d'organes présentent une grande variété de cellules possédant toutes sur leur membrane les antigènes d'histocompatibilité de classe I (Alloantigène de classe I). Par contre, les antigènes d'histocompatibilité de classe II (Alloantigène de classe II) ne sont exprimés que par une minorité de cellules du greffon, en particulier les cellules dendritiques. Ces cellules dendritiques expriment à la fois les antigènes de classe I et de classe II et possèdent la capacité particulière de présenter les antigènes aux lymphocytes.

Le récepteur de l'antigène des lymphocytes T est constitué par un complexe multimoléculaire de 6 protéines membranaires désigné TcR/CD3 (Figure 17, p. 57). Le TcR est un hétérodimère comportant 2 chaînes polypeptidiques polymorphes  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . Sa fonction est de reconnaître et de fixer les alloantigènes. Il ne transmet aucun signal directement. Le CD3 composé des chaînes  $\gamma, \delta, \epsilon, \zeta$  est associé de façon non covalente au TcR. Il permet ainsi d'assurer la transduction des signaux externes vers l'intérieur de la cellule.

La reconnaissance spécifique est réalisée par l'interaction du complexe TcR/CD3 du lymphocyte T avec l'antigène porté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II. Des molécules accessoires vont intervenir pour renforcer la liaison lors du contact entre la cellule cible et le lymphocyte T [Hérold *et al.* (1995)]. La fonction de présentation du CMH permet au système immunitaire de contrôler les membranes cellulaires. En temps normal, le répertoire T reconnaît le complexe [CMH du soi + peptide antigénique]. Mais par contre dans le cas d'une greffe d'organe, c'est la présence du complexe [CMH du non-soi + peptide antigénique] est détectée avec mise en jeu de la réaction immune. Les cellules TCD4+ répondent aux alloantigènes par une prolifération et aident les cellules TCD8+ à se différencier en cellules T cytotoxiques.

La reconnaissance de l'alloantigène par le TcR/CD3 est suivie au niveau intracellulaire par un ensemble d'événements conduisant à terme à l'activation du lymphocyte T. 200 à 1000 molécules de TCR interagissant sur moins de 1% de la surface de la cellule suffisent à mettre en jeu les signaux d'activation.



**Figure 17 :** Organisation du complexe TCR / CD3

Les événements précoces consistent en l'activation par phosphorylation sur des résidus tyrosine de protéines tyrosines kinases (PTK). La PTK p56<sup>lck</sup> est associée à CD4 ou CD8 $\alpha$ . Cette association permet la phosphorylation de la chaîne  $\zeta$  et l'activation du lymphocyte T via le complexe TcR/CD3 [Veillette *et al.* (1989)]. La chaîne  $\zeta$  peut alors interagir et activer la PTK ZAP-70 [Hivroz *et al.* (1995)]. La PTK p59<sup>fyn</sup> est également activée par l'intermédiaire de l'interaction TcR/CD3- alloantigène.

Il s'ensuit une cascade de phosphorylation sur des résidus tyrosine aboutissant à l'activation des protéines membranaires et cytoplasmiques, en particulier la phospholipase C- $\gamma$ 1 (**PLC- $\gamma$ 1**) et la protéine p21<sup>ras</sup>.

La PLC- $\gamma$ 1 activée hydrolyse le phosphatidyl-inositol 4,5 diphosphate (**PIP2**) en inositol 1,4,5 triphosphate (**IP3**) et diacylglycérol (**DAG**). L'IP3 mobilise le Ca<sup>2+</sup> provenant du réticulum endoplasmique. Cette augmentation de la concentration du Ca<sup>2+</sup> intracytoplasmique libre est responsable de l'activation de la calmoduline et d'une enzyme clé : la calcineurine (phosphatase 2B ou **PP2B**). La calcineurine est une serine phosphatase Ca<sup>2+</sup>/calmoduline dépendante qui peut être inhibée par la CsA et le FK506. Par son activité enzymatique, elle agit sur le facteur de transcription **NF-AT** (« nuclear factor of activated T-cells) spécifique du gène de l'IL-2 [Israël (1994)]. Le NF-AT comporte une sous-unité cytoplasmique transloquée dans le noyau après activation par la calcineurine et une sous-unité nucléaire.

Par ailleurs le DAG provoque l'activation de la protéine kinase C (**PKC**) qui va stimuler NF- $\kappa$ B. Le NF- $\kappa$ B, en synergie avec d'autres facteurs transcriptionnels, participe à l'activation de la transcription des gènes codant pour l'IL-2 et pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2. La migration du complexe hétérodimérique de NF- $\kappa$ B vers le noyau n'est possible qu'après phosphorylation de I- $\kappa$ B par la PKC; la phosphorylation provoquant la dissociation du complexe NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B. Une activité phosphatasique (peut-être la calcineurine) serait également requise dans cette étape de dissociation du complexe NF- $\kappa$ B sensible à la CsA et au FK506 [Bierer (1994)].

Parallèlement, la protéine p21<sup>ras</sup> activée, régule une cascade de kinases aboutissant à l'activation des facteurs de transcription dont c-jun et c-fos puis à l'induction de la sous-unité nucléaire de NF-AT [Cantrell (1994)]. NF-AT participe alors à la transcription du gène codant pour l'IL-2 en se fixant sur les séquences « enhancer ».

La transcription du gène de l'IL-2 va demander la fixation coordonnée d'un ensemble de facteurs de transcription sur les éléments régulateurs situés en amont du promoteur de l'IL-2 :

- NF-AT (sensible à la CsA et au FK506) (2 sites)
- NF- $\kappa$ B (sensible à la CsA et au FK506)
- AP1 (famille jun et fos) (2 sites)
- OAP/Oct1 (2 sites)
- CD28RC (sensible à la rapamycine)

Outre le complexe TCR/CMH, d'autres composants membranaires vont intervenir dans l'activation des lymphocytes T : CD2, CD5, CD28, CD45 essentiellement; CD26, CD27, CD40L, CD44, CD50, CD69, CD73, CD11a/CD18 (LFA1) [Hérold *et al.* (1995)].

La molécule CD28 du lymphocyte T est particulièrement intéressante. Elle utilise une voie de signalisation qui est insensible à la CsA et au FK506 mais sensible à la rapamycine [Sigal et Dumont (1992)]. La fixation de la protéine CD80-86 (ou B7/BB1) de la cellule dendritique au CD28 va conduire (par l'intermédiaire de l'IP3 kinase) à l'activation du « CD28 Responsive Complexe » (CD28RC). Un autre ligand de CD80-86 est le CTLA4, moins représenté mais plus affine que le CD28. L'effet de la liaison CD28/CD80-86 (ou CTLA4/CD80-86) se manifeste surtout par une stabilité accrue des ARNm des lymphokines et en particulier de l'IL-2. L'absence du second signal apporté par cette voie peut empêcher les lymphocytes de proliférer et les rendre réfractaires à un deuxième signal d'activation par l'antigène (état d'anergie) [Schwartz (1992)].

La synthèse de l'IL-2 et de la chaîne  $\alpha$  du récepteur d'IL-2 vont marquer le passage du lymphocyte T en phase G1. La liaison de l'IL-2 à son récepteur va produire le signal nécessaire à la progression en phase S et ainsi conduire à la prolifération cellulaire.

La stimulation mitogène provoquée par la liaison de l'IL-2 à son récepteur conduit à la phosphorylation de la sous-unité ribosomale S6 permettant une synthèse accrue de protéines, et notamment celles régulant le cycle cellulaire [Erikson (1991); Lane *et al.* (1993)]. Plusieurs kinases, dont la p70 S6 kinase, vont intervenir. L'activation de cette phosphorylation constitue une étape sensible à la rapamycine lors de la progression de la phase G1 vers S [Calvo *et al.* (1992); Kuo *et al.* (1992)].

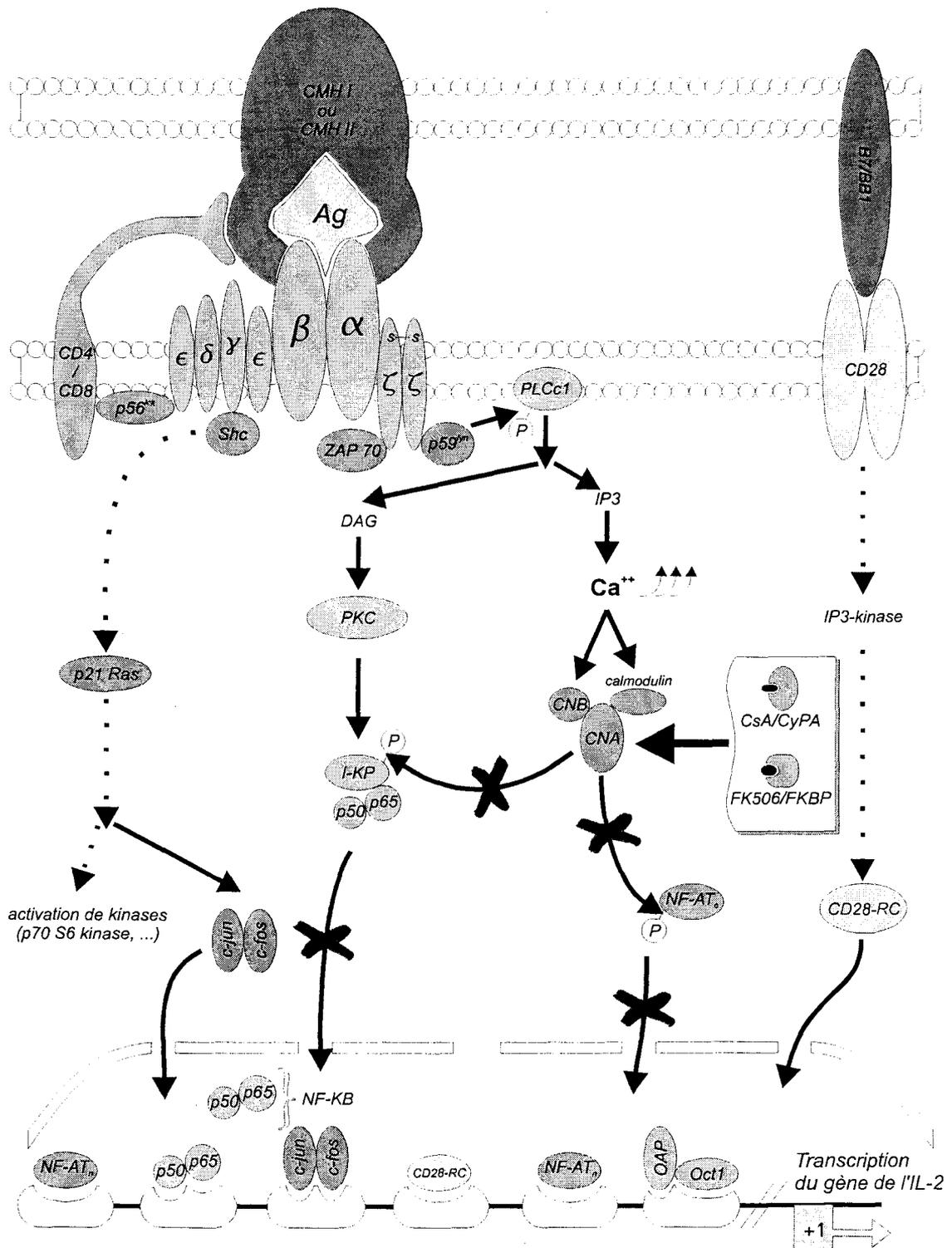


Figure 18 : Transduction du signal induit par la présentation de l'antigène au lymphocyte T

## B. Migration des lymphocytes sensibilisés

De façon générale, la sensibilisation de l'allogreffe peut être un phénomène central. Elle s'effectue au niveau des tissus lymphoïdes du receveur dans lequel migrent les cellules dendritiques du donneur. Il peut également s'agir d'un phénomène périphérique. Les lymphocytes du receveur rencontrent alors l'antigène *in situ*, dans le greffon. Les lymphocytes T sensibilisés colonisent ensuite le greffon en plusieurs étapes :

- interactions faibles et aléatoires entre lymphocytes et endothélium par l'intermédiaire de selectines.
- expression d'intégrines par les lymphocytes suite à un signal provenant du greffon.
- mise en place d'interactions fortes grâce aux intégrines.
- migration des lymphocytes dans le tissu par les jonctions entre les cellules endothéliales.

## C. Mécanismes effecteurs

La phase effectrice du rejet de greffe est soumise à une régulation complexe cellulaire et humorale (Tableau 5, p. 62). Le rejet aigu des allogreffes fait essentiellement intervenir l'immunité à médiation cellulaire assurée par les lymphocytes T. Chez l'animal, les lymphocytes T cytotoxiques et la production de cytokines par les cellules T auxiliaires jouent un rôle central dans les rejets primaires d'allogreffes sans immunosuppression. Les cellules T CD4<sup>+</sup> répondent à l'alloantigène par une prolifération. Elles produisent diverses cytokines (IL-2, IL-3, IL-6, IL-13, INF $\gamma$ , TNF $\beta$ ) permettant la différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en cellules T cytotoxiques et l'activation des macrophages, des lymphocytes B et des cellules de l'immunité naturelle.

Chez l'Homme, la mise en place d'une immunosuppression atténue les réactions lymphocytotoxiques et humorales. D'autres paramètres de la réponse immunitaire d'allogreffe se développent notamment le phénomène d'ADCC (« Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity ») et l'activation d'anticorps bloquants.

**Tableau 5 :** Réactions humorales et cellulaires déclenchées par le rejet de greffe

Réactions humorales	Réactions cellulaires
<i>Anticorps cytotoxiques</i> Assurent la lyse cellulaire en présence de complément	<i>Lymphocytes T cytotoxiques</i> Les clones lymphocytaires spécifiques de l'antigène sont stimulés, se différencient, se multiplient et acquièrent leur pouvoir cytotoxique
<i>Anticorps de la réaction cytotoxique à médiation cellulaire</i>	<i>Macrophages</i> Stimulés par les lymphocytes TCD4+, ils interviennent dans les réactions cytotoxiques à médiation cellulaire. Les macrophages sont activés par le MAF (Macrophage Activating Factor) produit par les lymphocytes TCD4+. Ces macrophages « armés » interviennent dans les réactions cytotoxiques à médiation cellulaire. Les macrophages peuvent également exercer une activité ADCC.
<i>Anticorps agglutinants</i>	<i>Cellules K</i> Elles interviennent dans les réactions cytotoxiques à médiation cellulaire dépendante des anticorps
<i>Anticorps bloquants</i>	<i>Cellules NK</i> Elles exercent leur pouvoir cytotoxique non spécifique de l'antigène, de façon spontanée, indépendamment de toute sensibilisation préalable.

## D.Importance des traitements immunosuppresseurs

L'évolution notable des traitements immunosuppresseurs, en particulier l'introduction de la CsA, a permis de diminuer de façon significative la fréquence et l'intensité des rejets, améliorant ainsi les pourcentages de survie des greffons à plus ou moins long terme.

Les premiers traitements immunosuppresseurs ont été basés sur l'utilisation d'antimitotiques et de corticoïdes. L'apparition de la CsA a permis une meilleure compréhension des mécanismes de la réponse immunitaire. Elle a ouvert la voie aux traitements immunosuppresseurs ayant une action sélective. C'est ainsi qu'ont été mises en évidence les propriétés du FK506 et de la rapamycine, puis plus récemment de l'acide mycophénolique et de la desoxyspergoline [Schreiber (1991)]. De très nombreux produits biologiques possèdent également des activités immunosuppressives. Un certain nombre d'entre eux a franchi la barrière de l'utilisation clinique ou semble susceptible d'y parvenir. Les anticorps anti-lymphocytes, les immunotoxines et certaines lymphokines comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-10 sont venus diversifier la panoplie de ces traitements.

Les immunosuppresseurs vont avoir des spécificités d'action différentes. Certains inhibent les fonctions des cellules de l'immunité, essentiellement des lymphocytes. Ainsi la CsA, le FK506, les corticoïdes répriment les réponses immunitaires à médiation cellulaire. Ils agissent essentiellement en inhibant l'activation des lymphocytes T auxiliaires produisant les lymphokines dont l'IL-2; la rapamycine bloque le signal de transduction provenant de l'activation des récepteurs des lymphokines.

D'autres immunosuppresseurs agissent par un effet antiprolifératif. Cet effet antiprolifératif est observé avec les antimétabolites (azathioprine, 6-mercaptopurine, l'acide mycophénolique) et les alkylants (cyclophosphamide). Il concerne de façon préférentielle les cellules à fort taux de renouvellement ainsi que les lymphocytes engagés dans la réponse immunitaire après activation par reconnaissance de l'antigène.

Enfin, il est également possible d'agir sur des événements divers : l'inactivation des récepteurs de reconnaissance des lymphocytes ou la différenciation des lymphocytes B et T.

Dans tous les cas, ces immunosuppresseurs sont utilisés en association. L'utilisation d'association de plusieurs médicaments à faibles doses permet de maintenir le niveau d'immunosuppression désiré en diminuant les effets secondaires et toxiques propres à chaque produit.

## II. Les immunosuppresseurs impliquant des peptidyl prolyl cis-trans isomérase

La CsA, le FK506 et la rapamycine sont trois immunosuppresseurs inhibant spécifiquement l'activation des lymphocytes T. Bien que la CsA et le FK506 appartiennent à des familles chimiques différentes, ces composés inhibent les mêmes événements calcium-dépendants. Par contre, la rapamycine, proche du FK506, agit non pas sur l'activation  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante des lymphocytes T, mais sur leur état de prolifération. Cependant tous trois ont la particularité de se lier à une peptidyl prolyl cis/trans isomérase (cyclophiline ou FKBP) pour exprimer leur activité immunosuppressive [Rosen et Schreiber (1992)]. Ces enzymes sont souvent appelées immunophilines.

### A. La cyclosporine A et le FK506

Depuis 1983, date de son introduction dans la plupart des pays, la CsA a profondément modifié l'histoire des transplantations d'organes. Son introduction s'est accompagnée d'un essor considérable des transplantations en particulier des greffes rénales. Le champ d'investigation ouvert par la CsA a permis la découverte du FK506. Le FK506 présente une activité similaire à la CsA.

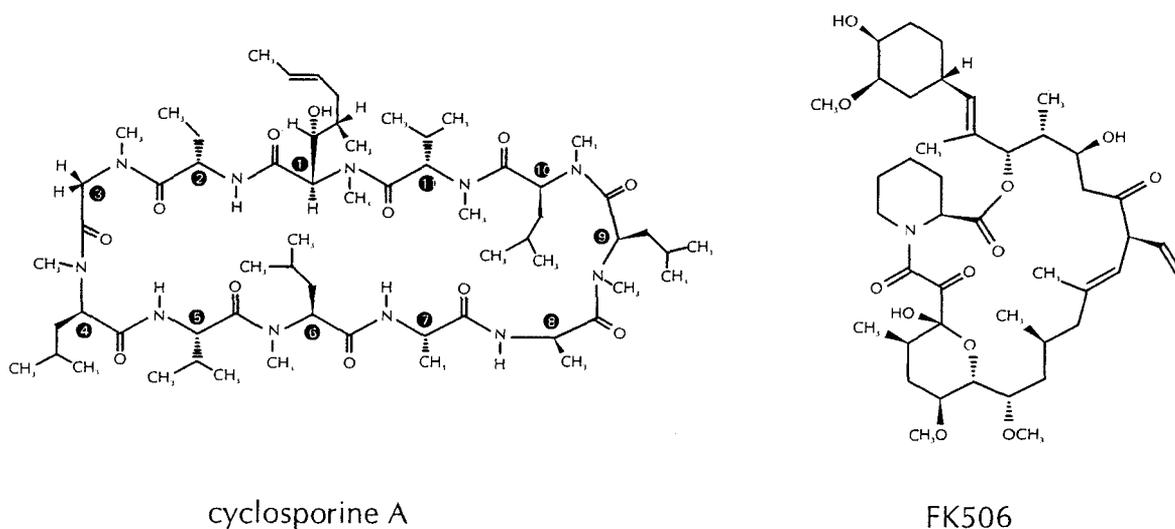


Figure 19 : Structures de la cyclosporine A et du FK506

Les effets immunosuppresseurs de la CsA sont essentiellement liés à son action sur les lymphocytes T auxiliaires. La CsA induit une interruption fonctionnelle du système IL-2/Récepteur de l'IL-2 contrôlant la croissance et la prolifération des lymphocytes T. En effet, l'inhibition de la sécrétion d'IL-2 bloque l'activation des lymphocytes T. L'addition d'IL-2 exogène peut partiellement annuler l'effet de la CsA [Hess (1985); Dumont *et al.* (1990), Lin *et al.* (1991)]. La CsA affecte également l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 [Ryffel *et al.* (1985), Reed *et al.* (1986), Foxwell *et al.* (1990)] en agissant probablement sur la stabilité de l'ARNm [Hemar et Dautry-Varsat (1990)] et sur les besoins en IL-2 [Malek et Ashwell (1985)].

S'associe à ces effets sur le système IL-2/Récepteur IL-2 une inhibition de la synthèse de plusieurs cytokines (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN $\gamma$ , TNF  $\alpha$  et  $\beta$ ) par la CsA [Herold *et al.* (1986), Kronke *et al.* (1984)].

Les gènes c-myc ou les gènes de la famille src sont également réprimés par la CsA [Graneeli-Piperno *et al.* (1986); Furue *et al.* (1990)].

La CsA est aussi capable d'inhiber le relargage de la sérine estérase associée aux granules des lymphocytes Tc [Lancki *et al.* (1989), Trenn *et al.* (1989)].

La stimulation du complexe TcR/CD3 peut entraîner la mort par apoptose de certains lymphocytes T, notamment les thymocytes immatures. *In vitro*, la CsA bloque cette apoptose induite par la stimulation du TcR/CD3 [Shi *et al.* (1989)]. Cette inhibition de l'apoptose pourrait être corrélée à l'inactivation de la calcineurine, protéine phosphatase calmoduline/Ca<sup>2+</sup> dépendante [Liu *et al.* (1991)]. *In vivo*, par ce même effet, la CsA inhibe la sélection thymique négative des lymphocytes immatures porteurs de récepteurs anti-soi [Kappler *et al.* (1987), Kosaka *et al.* (1990)].

D'autre part, la CsA est susceptible d'agir sur les lymphocytes B en inhibant la synthèse des lymphokines par les lymphocytes T auxiliaires [Borel (1989)]. Elle affecte aussi directement l'activation des lymphocytes B lors d'une activation par ionomycine+PMA mais pas dans le cas d'une activation par le LPS. Ces observations suggèrent l'existence d'au moins deux voies d'activation. Contrairement aux lymphocytes T, l'inhibition de l'activation se produit seulement en fin de phase G1 [Klaus (1988), Wicker *et al.* (1990)].

L'addition de CsA inhibe l'activité du  $TNF\alpha$  dans le surnageant de culture de macrophages activés par un LPS. Elle n'a pas d'effet sur l'ARNm du  $TNF\alpha$  [Nguyen *et al.* (1990)]. La CsA empêche également la présentation d'alloantigènes par des macrophages murins sans pour autant affecter l'expression des molécules du CMH de classe II [Little *et al.* (1990)].

La dégranulation et la sécrétion des protéines sont, dans de nombreux cas, des mécanismes sensibles à l'action de la CsA :

- histamine et leucotriène  $LTC_4$  par les monocytes [Marone *et al.* (1988)]
- sérotonine par les basophiles [Hultsh *et al.* (1990)]
- lactoferrine par les neutrophiles [Forrest *et al.* (1991)]

Le FK506 possède un mode d'action similaire à la CsA. Il présente les mêmes effets moléculaires et cellulaires que ceux cités précédemment [Sigal et Dumont (1992)]. Le FK506 est cependant capable d'agir à des doses beaucoup plus faibles que la CsA.

## B. La rapamycine

La rapamycine est un macrolide de structure apparentée au FK506, produit par *Streptomyces hygroscopicus*. Bien que sa structure soit apparentée au FK506, elle présente un mécanisme immunosuppresseur différent.

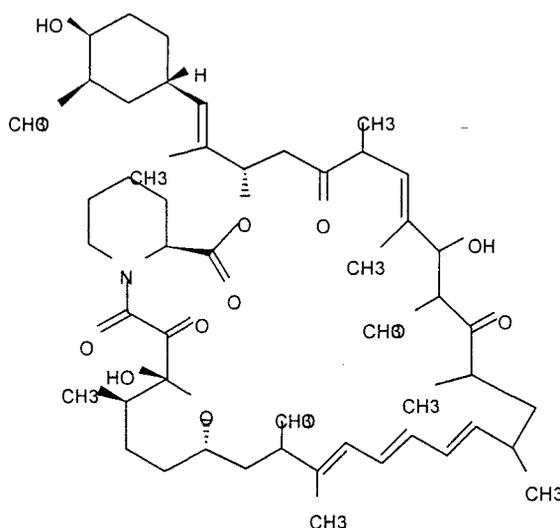


Figure 20 : Structure de la rapamycine

En effet, la rapamycine n'inhibe pas la cascade de signaux calcineurine dépendant. Elle ne bloque pas la transcription des gènes d'activation des lymphocytes T (en particulier les gènes de l'IL-2 et de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2). Il semble qu'elle agisse à un stade plus tardif en inhibant la voie de transduction du signal émanant des récepteurs des lymphokines activés par la fixation de l'IL-2, IL-4 ou IL-6 [Kahan *et al.* (1991); Dumont *et al.* (1990)]. La rapamycine empêche ainsi la progression des lymphocytes T vers la phase S. Il a été montré par des études de compétition que la rapamycine peut agir comme un puissant antagoniste du FK506. Ces deux molécules se lient à un récepteur intracellulaire commun : le FKBP12 [Dumont *et al.* (1990); Bierer *et al.* (1990)]. Kahan *et al.* (1991) ont d'autre part démontré que la CsA et la rapamycine utilisées en association à des doses subthérapeutiques inhibent le rejet de greffe. Cet effet différent de la rapamycine démontrant l'existence de cibles différentes pour la CsA et le FK506 dans les lymphocytes T [Kahan *et al.* (1991), Bierer *et al.* (1987), Dumont *et al.* (1990)]. Les effets de la rapamycine ne sont pas limités aux cellules T. Ainsi, la rapamycine empêche la prolifération des lymphocytes B murins et humains [Kay *et al.* (1991), Wicker *et al.* (1990)]. Il a également été montré que la rapamycine inhibe l'ADCC et l'activité cytotoxique des cellules NK [Luo *et al.* (1992)]. La rapamycine est un agent immunosuppresseur et antiprolifératif. Son utilité clinique potentielle fait encore actuellement l'objet d'investigations.

## FONCTIONS DES PEPTIDYL PROLYL CIS-TRANS ISOMERASES

### I. Activités des cyclophilines dans l'environnement cellulaire

#### A. Cyclophiline et calcineurine

##### 1. Inhibition de la voie calcium-dépendante

La CsA et le FK506 sont des molécules d'origine et de structure différentes. Elles interagissent respectivement avec les cyclophilines et FKBP, deux familles d'enzymes à activité similaire mais sans aucune relation structurale. Les complexes formés présentent des effets inhibiteurs sur l'activation des lymphocytes T étonnamment analogues.

##### a) La calcineurine : une cible pour les complexes immunosuppresseurs

Leur effet immunosuppresseur similaire a été dans un premier temps lié à l'inhibition de l'activité peptidyl prolyl cis trans isomérasique des cyclophilines ou des FKBP. Plusieurs faits montrent que cette théorie est erronée. La dose immunosuppressive de CsA ou FK506 n'inhibe qu'une faible proportion de l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique totale de la cellule. En effet, aux posologies usuelles, le FK506 occupe moins de 1% des FKBP cellulaires [Schreiber (1991); Sigal et Dumont (1992)]. D'autre part, des analogues structuraux de la CsA ([MeAla<sup>6</sup>] CsA) et du FK506 (506BD) capables d'inhiber l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique des cyclophilines ou FKBP n'ont pas de propriétés immunosuppressives [Liu *et al.* (1991); Liu *et al.* (1992)]. Ainsi, il apparaît que l'inhibition de l'activité enzymatique est insuffisante pour expliquer l'immunosuppression. Cependant, la liaison de ces immunosuppresseurs à leurs immunophilines respectives est une condition préalable obligatoire à leur effet. Le modèle actuel laisse envisager que le complexe immunophiline/immunosuppresseur exerce son potentiel immunosuppresseur en agissant sur une cible intracellulaire.

Simultanément, en 1991, Liu *et al.* et Friedman et Weissman montrent que *in vitro*, les complexes CyPA/CsA ou FKBP12/FK506 se lient et inhibent la calcineurine. La calcineurine (CN ou PP2B) est une protéine serine/thréonine phosphatase hétérodimérique. Elle est constituée d'une sous-unité catalytique A (CnA) de 59-61 kDa et

d'une sous-unité de régulation B (CnB) de 19 kDa. Elle est exprimée dans toutes les cellules eucaryotes mais sa répartition est hétérogène [Kincaid *et al.* (1987)]. La CnA est capable de fixer le  $\text{Ca}^{2+}$  et la calmoduline (CaM). La CaM est une protéine de 17 kDa fixant le  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle confère une sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  à de nombreuses protéines. La CnA possède un domaine autoinhibiteur C-terminal, clivable par protéolyse ménagée. Ce domaine autoinhibiteur interagit avec le site catalytique en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de la calmoduline. Lorsque la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  augmente brusquement, la CaM se lie à la CnA. Elle induit un changement de conformation de cette sous-unité A se traduisant par la dissociation du domaine autoinhibiteur et du site catalytique. Quand la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  revient à son niveau basal, la calcineurine se dissocie de la CaM et la CnA retrouve alors son état autoinhibé [Hashimoto *et al.* (1986); Cardenas *et al.* (1994)]. La partie catalytique de la CnA présente une forte homologie de séquence avec les phosphatases PP1 et PP2B [Swanson *et al.* (1992)]. La CnB fixe également le  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle présente 35% d'homologie de séquence avec la calmoduline [Husi *et al.* (1994a)]. En se liant à la CnA, la CnB provoque une augmentation de 700 fois de l'activité phosphatasique de la CnA. Le temps d'activation de la CnA par la CnB (6-8h) suggère que cette dimérisation se traduit par un changement de conformation lent de la CnA. La CnB joue le rôle d'un activateur allostérique [Etzkorn *et al.* (1993)].

*In vivo*, la CsA et le FK506 provoquent également l'inactivation de la calcineurine mais pas d'autres phosphatases [Fruman *et al.* (1992)]. Par contre, l'activité de la calcineurine n'est pas inhibée par le complexe FKBP12/rapamycine [Liu *et al.* (1991)]. En effet, le FK506 et la rapamycine, bien qu'ayant des structures similaires exercent leur activité immunosuppressive *via* des voies de transduction différentes.

Plusieurs observations permettent de confirmer l'importance de l'inactivation de la calcineurine dans l'inhibition de l'activation des lymphocytes T par la CsA ou le FK506. Ainsi, la surexpression de la calcineurine rend les lymphocytes T moins sensibles à l'inhibition de la transcription du gène de l'IL-2 par la CsA ou au FK506 [Clipstone et Crabtree (1992); O'Keefe *et al.* (1992)]. De plus, les cellules possédant une calcineurine constitutivement activée sont stimulées par les esters de phorbol seuls [O'Keefe *et al.* (1992)]. La calcineurine est donc une étape limitante de la voie  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante dans l'activation des lymphocytes T.

b) Le complexe cyclophiline/cyclosporine/calcineurine à l'origine de l'immunosuppression

L'utilisation des complexes CyPA/CsA et CyPC/CsA a permis la purification par affinité de la calcineurine et la calmoduline [Friedman & Weissman (1991); Liu *et al.* (1991)]. La formation de ce complexe CyP(s)/CsA/CN entraîne l'inhibition de l'activité phosphatasique de la calcineurine.

La CaM influe sur l'activité phosphatasique de la calcineurine. Elle module l'affinité de la CN pour le complexe CyPA/CsA ( $K_i=33$  nM avec la CaM,  $K_i=191$  nM sans la CaM). Elle n'est cependant pas indispensable à la formation du complexe CyP(s)/CsA/CN [Liu *et al.* (1992)].

Le comportement d'analogues structuraux de la CsA montre la nécessité de la formation d'un complexe ternaire CyP(s)/CsA/CN dans l'immunosuppression. La présence de la CsA au sein du complexe permet l'interaction entre la CyPA et la calcineurine puis l'immunosuppression par inhibition de la CN. Ainsi la MeAla<sup>6</sup>-CsA ne possède pas d'effet immunosuppresseur. Elle est très affine pour la CyPA mais n'inhibe pas la calcineurine. Par contre, la MeBm<sup>2</sup>t<sub>1</sub>-CsA est immunosuppressive. Elle est peu affine pour la CyPA mais forme un complexe inhibant fortement la calcineurine. Le complexe CyPA/CsA/CN présente un ratio de 1:1:1 [Liu *et al.* (1992); Ryffel *et al.* (1993)]. La présence de Ca<sup>2+</sup> est nécessaire à l'établissement du complexe [Liu *et al.* (1992)].

La CyPA n'est pas la seule cyclophiline capable de former un complexe ternaire avec la CsA et la calcineurine. Les complexes CyPB/CsA, CyPC/CsA, CyPD/CsA et CyP40/CsA se fixent également à la calcineurine [Friedman et Weissman (1991); Liu *et al.* (1991); Swanson *et al.* (1992); Kieffer *et al.* (1992)]. Ils montrent cependant des affinités très différentes pour la calcineurine. En effet, l'affinité du complexe CyPB/CsA est nettement supérieure à celle du complexe CyPA/CsA; celle du complexe CyPC/CsA est intermédiaire [Swanson *et al.* (1992); Bram *et al.* (1993); Fliri *et al.* (1993); Etzkorn *et al.* (1994)].

Le dernier point à déterminer est l'isoforme de la cyclophiline impliquée *in vivo* dans l'immunosuppression par la CsA. Pour cela, les CyP A, B et C sont transfectées et surexprimées dans des cellules lymphoblastiques Jurkat afin d'en mesurer l'impact sur la sensibilité à la CsA. La surexpression de la CyPA augmente la sensibilité des cellules à la

CsA. La CyPA est donc bien la protéine contrôlant l'action de la CsA *in vivo*. La surexpression de la CyPC n'entraîne aucun changement. Elle possède une séquence signal la dirigeant vers la voie de sécrétion. Par contre, lorsque les cellules sont transfectées avec une CyPC dépourvue de séquence signal, elle s'accumule dans le cytoplasme et la sensibilité à la CsA augmente [Bram *et al.* (1993)]. Le cas de la CyPB est particulier. Cette protéine a été localisée dans des portions spécialisées du réticulum endoplasmique [Arber *et al.* (1992)] ou dans les fluides biologiques [Spik *et al.* (1991); Allain *et al.* (1995)]. Cependant, sa surexpression entraîne une augmentation de la sensibilité des cellules à la CsA. L'échange des séquences N-terminale et C-terminale des CyPB et C permet d'invertir leur rôle dans la sensibilité à la CsA. Il semble donc que malgré sa localisation, la CyPB pourrait interagir avec la calcineurine [Bram *et al.* (1993)].

### c) Organisation du complexe immunosuppresseur

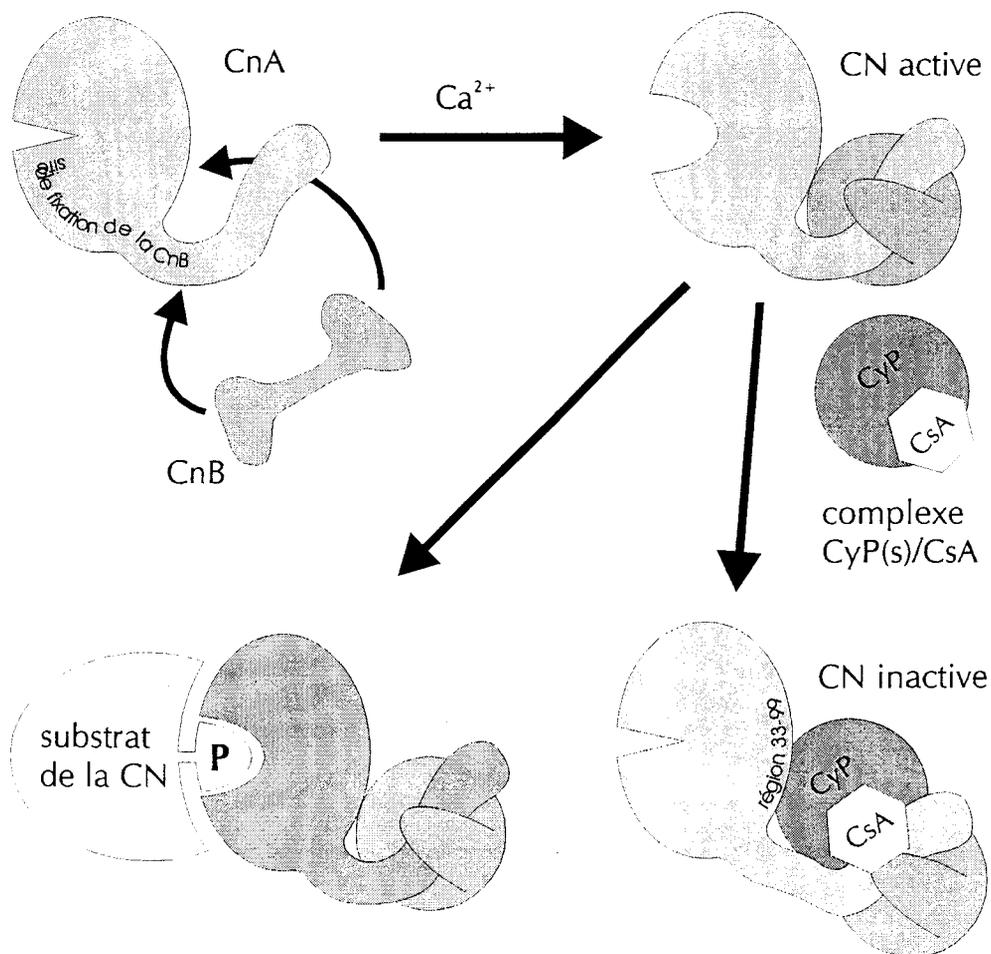
#### (1) Identification du site d'interaction de la calcineurine

L'inhibition de l'activité phosphatasique de la calcineurine laisse penser que le complexe CyP(s)/CsA interagit tout particulièrement avec la sous-unité catalytique (CnA) [Liu *et al.* (1992)]. L'utilisation d'un dérivé photoactivable de la CsA (PL-CS) ne montre qu'une liaison covalente avec la CnA [Ryffel *et al.* (1993)]. Par contre, la présence de la CnB apparaît essentielle à l'établissement du complexe CyP(s)/CsA/CN [Haddy *et al.* (1992); Clipstone *et al.* (1994)]. Des travaux ultérieurs utilisant la PL-CS et des réactifs bifonctionnels ont montré la formation d'une liaison covalente avec la CnB [Li et Handschumacher (1993); Husi *et al.* (1994a)].

L'utilisation de protéines de fusion a permis de préciser que la séquence comprise entre les résidus d'acides aminés 332 et 390 est nécessaire à l'interaction avec le complexe CyP(s)/CsA. Elle comprend le site de fixation de la CnB et s'arrête au début du site de fixation de la CaM. En effet, les sites d'autoinhibition et de fixation de la CaM n'interviennent pas dans l'interaction avec le complexe CyP(s)/CsA. La CaM peut donc se lier avec l'intégralité de son site de fixation. Elle facilite ainsi l'interaction de la CsA avec le complexe CyP(s)/CsA, probablement en empêchant le domaine d'autoinhibition de gêner cette interaction [Husi *et al.* (1994a)]. La région comprise entre les résidus d'acides aminés 32 et 99 serait également nécessaire à la liaison au complexe. L'association de la CnB à la

CnA serait une condition obligatoire à l'interaction avec le complexe CyP(s)/CsA [Clipstone *et al.* (1994)].

Un modèle de la CnB a pu être établi à partir de la structure de la CaM. La CnB possède une structure ouverte pouvant se refermer en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de la CnA. Il existe dans cette structure une région loquet («latch region»). Des mutations ponctuelles dans cette région empêchent la liaison du complexe CyPB/CsA à la calcineurine. Ces mêmes mutations empêchent également l'activation de la CnA par la CnB. Il semble donc que le complexe CyP(s)/CsA interagisse avec la région essentielle au rôle d'activateur allostérique de la CnB. Ainsi, cette interaction CyP(s)/CsA/CnB entraîne l'inhibition de l'activité phosphatasique de la CnA [Milan *et al.* (1994)].



**Figure 21** :Inhibition de la calcineurine par le complexe cyclophiline/cyclosporine A [Husi *et al.* (1994a); Li et Handschumacher (1993); Milan *et al.* (1994)]

## (2) La cyclophiline et la cyclosporine forment une surface composite

En présence de CsA, Les différentes isoformes des cyclophilines sont capables de se fixer à la calcineurine mais avec des affinités très variables. Pour les FKBP, les différences sont encore plus accentuées. En effet, le complexe FKBP12/FK506 se lie et inhibe la calcineurine, par contre le complexe FKBP13/FK506 n'interagit pas avec la calcineurine. Ces écarts ont d'abord été attribués à des conformations différentes de la CsA en fonction de l'isoforme de la cyclophiline à laquelle est fixée. En réalité, il apparaît que ces variations d'affinité sont dues à des résidus d'acides aminés particuliers exprimés à la surface des cyclophilines. La reconnaissance du complexe CyP(s)/CsA est donc liée à la formation d'une surface composite CyP(s)/CsA.

Ainsi, le remplacement du résidu Trp121 de la CyPA par un résidu d'alanine permet la fixation de la CsA mais empêche totalement l'inhibition de la calcineurine [Zydowsky *et al.* (1992)]. Les mutations affectant des résidus d'acides aminés de la CyPA choisis pour leur exposition au solvant et la proximité du site de fixation de la CsA affectent la formation du complexe CyPA/CsA/CN. Le remplacement du résidu Arg69 par un résidu d'acide glutamique diminue l'affinité du complexe pour la calcineurine. Par contre, la substitution du résidu Arg148 par un résidu d'acide glutamique multiplie l'affinité du complexe par 17. Le résidu d'arginine correspondant de la CyPB est entouré de deux résidus d'acide glutamique expliquant probablement la meilleure affinité du complexe CyPB/CsA pour la calcineurine [Etzkorn *et al.* (1994)]. D'autre part, l'analyse de la surface de la CyPB montre trois résidus d'acides aminés (Arg99, Lys113 et Ala 128) qui diffèrent entre les CyP A, B et C. Ils sont convenablement exposés pour interagir avec la calcineurine. La boucle contenant le résidu Arg158 (homologue du résidu Arg148 de la CyPA) pourrait également interagir avec la calcineurine [Mikol *et al.* (1994)].

Le fait que la MeAla<sup>6</sup>-CsA se fixe à la CyPA mais ne permet pas l'inhibition de la calcineurine montre l'implication directe des résidus exposés de la CsA lors de l'interaction du complexe CyP(s)/CsA avec la CN. Les résidus 4-8 n'interviennent pas dans la fixation de la CsA aux cyclophilines et sont à même d'interagir avec la CN. Une analyse conformationnelle révèle que la CsA possède deux domaines structuraux similaires (Sar3-MeLeu4 et Val5-MeLeu6). Ils ont la même conformation que le fragment C17-C22 du FK506 [Denesyuk *et al.* (1993)]. Ces motifs structuraux communs participeraient à

l'interaction avec la calcineurine et expliqueraient que deux molécules de nature différente puissent agir sur la même cible.

Toutes ces données montrent que l'interaction du complexe CyP(s)/CsA avec la calcineurine nécessite la participation de résidus d'acides aminés de la CsA et de la cyclophiline. Le fait que la reconnaissance soit due à une surface composite créée par l'association immunophiline/immunosuppresseur permet de mieux comprendre l'action des complexes CyP(s)/CsA et FKBP(s)/FK506 sur la même protéine.

#### d) Les substrats de la calcineurine sensibles à l'immunosuppression

Les substrats de la calcineurine ont été recherchés parmi les facteurs responsables de l'activation de la transcription du gène de l'IL-2. Il s'est avéré que la calcineurine déphosphoryle *in vitro* le NF-AT [Jain *et al.* (1993); McCaffrey *et al.* (1993)].

Le NF-AT est une protéine hétérodimérique présente dans les cellules T et B, les thymocytes et les splénocytes. Indispensable à la transcription du gène de l'IL-2, elle est composée des protéines nucléaires fos et jun et d'une phosphoprotéine cytoplasmique (NF-ATp ou NF-ATc) de 120 kDa. La phosphoprotéine cytoplasmique NF-ATp migre vers le noyau au cours de l'activation des lymphocytes T. Sa déphosphorylation nécessaire à la translocation dépend de la concentration en  $Ca^{2+}$ . Elle est inhibée par la CsA et le FK506. Dans le noyau, le NF-ATp s'associe à fos et jun pour se lier ensuite à l'ADN et participer à l'activation du promoteur de l'IL-2 [Jain *et al.* (1993); McCaffrey *et al.* (1993)]. Le NF-ATp est donc un substrat *in vivo* de la calcineurine. Sa déphosphorylation par la calcineurine est indispensable à la transcription du gène de l'IL-2. En empêchant cette étape la CsA et le FK506 inhibent l'activation des lymphocytes T.

NF- $\kappa$ B, autre facteur de transcription, est une protéine hétérodimérique sensible à l'action de la CsA ou du FK506. Localisée dans le cytoplasme, elle migre vers le noyau lors de l'activation des lymphocytes T. Sa localisation dans le cytoplasme est stabilisée par une troisième protéine : I $\kappa$ B. La déphosphorylation de I $\kappa$ B entraîne la libération de NF $\kappa$ B, sa translocation vers le noyau et la dégradation de I $\kappa$ B. La calcineurine serait la phosphatase impliquée dans la déphosphorylation de I $\kappa$ B [Bierer (1994)].

OAP/Oct-1 est un facteur de transcription nécessaire à la transcription du gène de l'IL-2. Sa fixation à l'ADN est corrélée à l'activité de la calcineurine. OAP/Oct-1 pourrait être un

autre facteur de transcription sensible à la CsA ou au FK506 [Ullman *et al.* (1991); Frantz *et al.* (1994)].

L'apoptose des thymocytes immatures lors de la sélection thymique négative peut être inhibée par la CsA ou le FK506 [Bierer *et al.* (1993)]. En effet, ce phénomène apoptotique est initié par un mécanisme  $Ca^{2+}$ -dépendant dans lequel la calcineurine joue un rôle crucial. La calcineurine semble également impliquée dans d'autres processus biologiques inhibés par la CsA et le FK506, notamment l'apoptose des lymphocytes B [Bonney-Berard *et al.* (1994)] et la dégranulation des lymphocytes T cytotoxiques [Dutz *et al.* (1993)]. Elle pourrait aussi intervenir dans la régulation du flux calcique de la membrane cytoplasmique du cerveau [Armstrong (1989)] ou la sécrétion d'amylase par les cellules acineuses [Grobowski *et al.* (1994)].

## **2. Les complexes immunophilines/calcineurine en absence d'immunosuppresseurs : un rôle pour ces immunophilines?**

La système double hybride est une méthode de clonage par interaction *in vivo* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette méthode a conduit à la caractérisation d'interactions protéine-protéine. Elle a permis de détecter une interaction FKBP12/CnA en présence et en absence de FK506. Les complexes FKBP12/CnA et CyPA/CnA ont ensuite été observés *in vitro*. Dans les deux cas, l'addition de FK506 ou de CsA renforce l'interaction immunophiline/calcineurine. Cependant, le complexe CyPA/CnA est plus stable que FKBP12/CnA. La CyPA interviendrait dans l'association de la CnB à la CnA.

Dans le cas de la formation du complexe FKBP12/CnA, une région de 65 résidus d'acides aminés de la CnA incluant le site de fixation de la CnB est requise. L'absence de CnB facilite donc la formation de complexe FKBP12/CnA *in vivo*. En effet, le FKBP12 et la CnB seraient en compétition pour la liaison à la CnA.

Des mutants affectant l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérisique du FKBP12 et de la CyPA n'affectent pas la formation des complexes. Le site catalytique des deux immunophilines semble donc accessible dans ces complexes. La fixation d'un immunosuppresseur renforce l'interaction CN/immunophiline. Elle provoque un changement de structure du complexe inhibant l'activité phosphatasique de la calcineurine.

Des études *in vitro* montrent une modulation de l'activité de la CN par le FKBP12 et la CyPA. En effet, le FKBP12 semble inhiber la calcineurine alors que la CyPA l'active. Selon Cardenas *et al.* (1994), deux modèles expliquent la modulation de l'activité de la calcineurine par ces deux immunophilines. Dans le premier, le FKBP12 et la CyPA régulent l'assemblage dynamique de la calcineurine; le FKBP12 inhibant l'association de la CnB à la CnA alors que la CyPA facilite cette association. Dans le second modèle, plus hypothétique, les deux immunophilines régulent l'activité de la calcineurine en agissant au niveau des changements de conformations induits par la fixation de la CaM à la CnA. Le FKBP12 et la CyPA contrôlèrent les modifications de conformation au niveau de l'isomérisation de liaisons prolyls impliquant l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique. Elles participeraient alors directement à la transduction du signal.

## B. Interactions avec d'autres protéines

### 1. Un ligand pour la CyPC : la protéine CyCAP

Une colonne d'affinité utilisant une protéine de fusion CyPC murine-glutathion-S-transférase (CyPC-GST) a permis de mettre en évidence plusieurs ligands intracellulaires pour cette protéine dans des cellules de moelle osseuse de souris. On observe ainsi une forte affinité de la CyPC pour des protéines de 77 kDa, 60 kDa, 37 kDa et 25 kDa. Cette affinité est beaucoup plus faible pour la CyPA et la CyPB. La protéine de 77 kDa est retrouvée dans la lignée lymphoblastique Jurkat. L'association de la CyPC avec ces différentes protéines est déplacée par l'addition de CsA au profit de la formation d'un complexe CyPC/CsA/calcineurine-calmoduline. Le site de fixation de la CyPC à la CsA est donc vraisemblablement impliqué dans la liaison aux quatre protéines détectées [Friedman et Weissman (1991)].

Les protéines de 77 kDa, 60 kDa et 37 kDa présentent des épitopes communs. Le séquençage de leurs fragments tryptiques montre certaines homologues de ces trois protéines, suggérant l'existence d'un précurseur commun. L'obtention d'un seul ADNc à partir des séquences de ces fragments confirme cette hypothèse. Cet ADNc correspond à une protéine de 574 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire prédite de 64 kDa et nommée CyCAP (« CyPC associated protein »). La différence de masse avec la protéine de 77 kDa est expliquée par la présence de cinq sites potentiels de N-glycosylation. Le

traitement par une glycosidase conduit à l'obtention de la protéine de 64 kDa. Conjointement à sa glycosylation, la CyCAP possède une séquence N-terminale analogue à une séquence signal qui lui confère les caractéristiques d'une protéine sécrétée. La CyCAP présente également une région SRCR (« scavenger receptor cystein-rich »). Ce type de domaine est retrouvé dans des protéines de surface ou sécrétées et serait impliqué dans des interactions avec d'autres protéines [Friedman *et al.* (1993)].

Toutes ces données rapprochent l'interaction CyPC-CyCAP de celle entre *ninaA* et la rhodopsine Rh1 rencontrée chez *Drosophila melanogaster* bien qu'aucun rôle fonctionnel n'ait été montré. De façon similaire à la hsp90, la CyPA pourrait intervenir dans l'interaction de la CypC avec une autre protéine.

## 2. Le complexe du récepteur aux stéroïdes

Les récepteurs aux hormones stéroïdes préexistent dans le cytosol des cellules cibles sous une forme inactive. Ces formes inactives sont des structures oligomériques complexes (Figure 22, p.78). Les protéines associées aux récepteurs sont :

- hsp90 (une ou deux molécules)
- hsp70
- FKBP52 (p59)
- FKBP54
- CyP40 (ERBC)
- p23

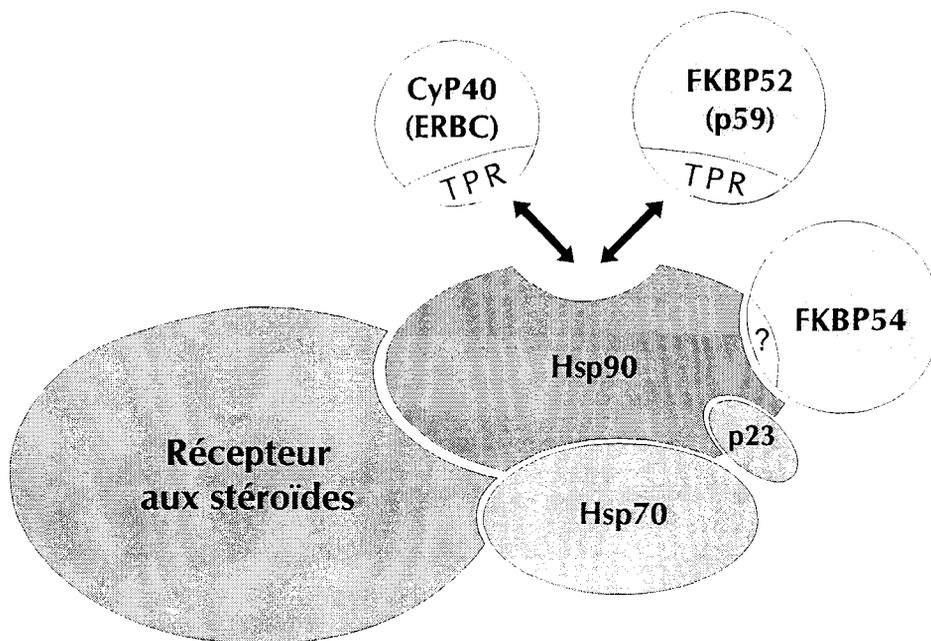
[Ratajczak *et al.* (1993); Johnson et Toft (1994); Segnitz et Gehring (1995)]

Les protéines de la famille des hsp (70 et 90) et la p23 semblent intervenir dans l'assemblage du complexe. Elles s'opposent à la formation du dimère actif du récepteur et contrôlent la liaison du ligand. Les rôles de la p59 et de la CyP40 ne sont pas encore établis.

La région homologue entre la CyP40 et la p59 comprend trois unités TPR (« tetracorticopeptide repeat ») pouvant former une structure « hole and knob » favorable à l'établissement d'interactions protéine-protéine. Ces domaines TPR participent à la liaison de la CyP40 et de la p59 au complexe du récepteur [Ratajczak *et al.* (1993)].

La p59 se lie au récepteur par l'intermédiaire de la hsp90 [Renoir *et al.* (1990)]. Il a été montré récemment que la CyP40 se lie au complexe de la même manière. La zone

d'interaction a pu être localisée dans le domaine homologue à la p59 confirmant l'intervention probable des unités TPR et le fait que le site enzymatique n'est pas impliqué dans la liaison à la hsp90 [Hoffman et Handschumacher (1995)]. En fait, la hsp90 ne possède qu'un site de fixation commun et unique pour ces deux protéines. Il existerait en réalité deux types de récepteurs inactifs aux hormones stéroïdes suivant qu'ils aient fixé la CyP40 ou la p59 [Owens-Grillo *et al.* (1995)].



**Figure 22** : Organisation du complexe du récepteur inactif aux hormones stéroïdes

La p59 et la CyP40, par leur activité peptidyl prolyl cis-trans isomérisique pourraient, en conjonction avec les hsp 70 et 90 et la p23, constituer un système facilitant la mise en conformation et l'assemblage du complexe du récepteur aux hormones stéroïdes. Comme pour la calcineurine, on constate une convergence fonctionnelle des deux familles de peptidyl prolyl cis-trans isomérases.

### 3. La maturation de la rhodopsine

Dans les photorécepteurs de la drosophile, la rhodopsine 1 (Rh1), pigment visuel majeur, est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et suit la voie de sécrétion jusqu'aux organelles chargées de la transduction du signal lumineux. En absence de production de la protéine *ninaA*, la Rh1 s'accumule dans le réticulum endoplasmique pour y être ensuite dégradée. D'autre part, *ninaA* et la Rh1 sont localisées dans les mêmes vésicules de transport à l'intérieur du photorécepteur [Colley *et al.* (1991)].

*NinaA* n'est pas requise par toutes les rhodopsines. En effet, seules les rhodopsines 1 et 2 (70% d'homologie de séquence) ont besoin de la présence de *ninaA* pour être produites à un taux normal. La rhodopsine 3 (seulement 30% d'homologie de séquence) ne requiert pas l'intervention de *ninaA*. La présence de plusieurs résidus de proline conservés entre Rh1 et Rh2 mais pas avec Rh3 est probablement à la base de cette discrimination. On peut supposer l'existence de différentes peptidyl prolyl cis-trans isomérase propres aux autres membres de la famille des rhodopsines (Rh3 et Rh4) [Stamnes *et al.* (1991)].

*NinaA* et Rh1 (ou Rh2 de façon plus minoritaire) forment *in vivo* un complexe suffisamment stable pour que ces deux protéines soit copurifiées. L'impossibilité à reformer ce complexe *in vitro* suggère qu'il s'est formé à un stade précoce de la maturation de Rh1. L'association de *ninaA* à Rh1 dépend fortement de son intégrité structurale. Le court fragment cytoplasmique de *ninaA* est indispensable à la formation du complexe vraisemblablement en interagissant avec d'autres composants cellulaires. Par contre, des mutations dans la séquence d'ancrage transmembranaire ne gênent pas l'association *ninaA*-Rh1 [Baker *et al.* (1994)].

La maturation de Rh1 est quantitativement dépendante du taux de *ninaA*. Une simple réduction de moitié du taux de *ninaA* provoque l'accumulation de Rh1 dans le réticulum endoplasmique. Ceci est à l'encontre d'un rôle enzymatique de *ninaA*. Ces données en association avec celles concernant la colocalisation des deux protéines dans des vésicules de transport, sont en faveur d'une activité chaperonne de *ninaA* assurant la stabilité de Rh1 durant son transport. La présence d'une cyclophiline uniquement dévolue à la maturation de Rh1 peut s'expliquer par la demande massive ( $10^8$  molécules/cellule) nécessitant une synthèse et une maturation rapide de cette cyclophiline [Ondek *et al.* (1992); Baker *et al.* (1994)]

#### 4. L'ouverture du pore de la membrane interne de la mitochondrie

L'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , en phosphore (P<sub>i</sub>) et des conditions de stress oxydatif provoquent l'ouverture de pores non spécifiques de grande taille dans la membrane interne de la mitochondrie. L'ouverture de ces pores est à l'origine du découplage des fonctions énergétiques et du gonflement osmotique de la mitochondrie. Cette ouverture est inhibée par les nucléotides adénine et la CsA [Crompton *et al.* (1988)].

Ces effecteurs suggèrent qu'en fait, ces pores non spécifiques pourraient être la translocase de l'adénine. Une protéine de la famille des cyclophilines serait également impliquée dans l'ouverture de ces pores [Halestrap et Davidson (1990)].

Il existe actuellement deux protéines candidates à ce rôle : une cyclophiline de la matrice ainsi qu'une cyclophiline associée à la membrane interne de la mitochondrie. L'affinité de la cyclophiline de la matrice pour différents isomères de la cyclosporine est corrélée à leur action sur l'ouverture du pore [Griffith et Halestrap (1991)]. De plus, l'induction d'un stress oxydatif conduisant à l'ouverture du pore provoque la liaison de cette cyclophiline à la membrane interne de la mitochondrie. La localisation dans la matrice et la masse moléculaire (18 kDa) suggèrent qu'il s'agit de la CyPD [Connern et Halestrap (1994)]. D'autre part, la mise en évidence de deux classes de site d'affinité pour la CsA se répartissant entre fraction soluble (matrice) et fraction membranaire démontrent l'existence d'une autre cyclophiline associée aux membranes mitochondriales [McGuinness *et al.* (1990)]. C'est ainsi qu'une cyclophiline de 22 kDa, différente de la cyclophiline de la matrice, a été trouvée associée à la membrane interne de la mitochondrie. La fixation de la CsA à cette protéine est affectée par les effecteurs (CsA et ADP) influençant l'ouverture du pore [Andreeva *et al.* (1995)]. Le mécanisme par lequel l'une de ces deux protéines peut induire l'ouverture du pore est encore ignoré.

#### 5. La protéine Gag du HIV de type 1

Gag est une protéine importante lors de la phase précoce de l'infection par le virus HIV-1. Elle participe également à la formation des particules virales et à leur dissémination hors de la cellule hôte. La recherche d'interactions Gag/protéines hôtes par la méthode du double hybride a montré une interaction avec les CyP A et B. Les CyP A, B et C sont capables de s'associer *in vitro* comme *in vivo* à la protéine Gag du virus HIV-1 [Luban *et al.*

(1993); Franke *et al.* (1994)]. La CsA inhibe cette interaction de manière plus efficace pour la CyPA que pour la CyPB [Luban *et al.* (1993)]. La CyPA n'interagit qu'avec cette protéine Gag du virus HIV-1. Elle ne présente pas d'interaction avec les protéines du virus HIV-2 ou d'autres rétrovirus (SIV (simien), MPMV (simien), Mo-MuLV (murin) ou virus visna) [Luban *et al.* (1993); Thall *et al.* (1994)]. Par contre, la CyPB interagit *in vivo* avec le virus SIV [Luban *et al.* (1993)].

Dans les particules virales de HIV-1, la CyPA est dans un rapport de 1:10 avec la protéine Gag. La CsA ou son dérivé non immunosuppresseur SDZ NIM811 (Melle<sup>4</sup>-CsA) [Rosenwirth *et al.* (1994)] n'empêchent pas la formation de la particule virale, mais les virus libérés ne contiennent pas de CyPA et montrent une infectiosité réduite [Thall *et al.* (1994)]. Il est nécessaire d'employer ces compétiteurs à des concentrations 10 à 100 fois plus élevées que dans les traitements habituels par la CsA afin d'inhiber le pool total de CyPA.

Le site d'interaction de la protéine Gag avec la CyPA a été localisé dans une partie restreinte de la protéine comportant plusieurs résidus de proline (PX<sub>4</sub>PX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub>P). Cette séquence est conservée dans tous les HIV-1 isolés mais on ne la retrouve pas dans d'autres rétrovirus. Le résidu Pro222 est indispensable à la fixation de la CyPA mais il n'est pas suffisant [Franke *et al.* (1994)].

## **6. Les protéines qui interagissent avec la cyclophiline B**

### *a) La « calcium-signal modulating cyclophilin ligand » (CAML)*

L'utilisation de la méthode du double hybride a permis l'isolement de plusieurs plasmides codant pour des protéines liant à la CyPB.

La surexpression d'une de ces protéines et l'utilisation d'esters de phorbol comme co-signal provoque l'activation du NF-AT par déphosphorylation. Cette activation du NF-AT est indépendante de la stimulation du TCR. Dans ce cas, la déphosphorylation du NF-AT requiert une stimulation exogène de la PKC par les esters de phorbol, suggérant que la protéine exerce son effet sur la voie calcium-dépendante. Elle a donc été appelée « calcium-signal modulating cyclophilin ligand » (CAML). L'utilisation de cellules déficientes en protéines tyrosine kinases Fyn et Lck montre que la CAML agit en aval de ces deux protéines. Cependant, elle exerce son effet en amont de la calcineurine. La CsA et FK506 inhibent complètement la déphosphorylation du NF-AT induite par la CAML. Le taux

élevé de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans les cellules surexprimant la CAML montre qu'elle pourrait activer la calcineurine en provoquant un afflux calcique.

La CAML est une protéine de 296 résidus d'acides aminés (33 kDa). Elle ne présente pas d'interaction avec les cyclophilines A ou C, le FKBP12 ou la calcineurine A. Son extrémité C-terminale possède trois régions hydrophobes susceptibles de constituer des domaines transmembranaires. Elle est localisée dans des structures vésiculaires proches du noyau et semblable aux calciosomes décrits par Arber *et al.* (1992). La CAML est présente à des taux variables dans tous les tissus testés. Elle est particulièrement abondante dans les ovaires et les testicules.

En conclusion, la CAML serait une protéine membranaire intégrale du calciosome principalement située sur la face cytoplasmique. Elle semble impliquée dans la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  lors de l'activation des lymphocytes T. Son interaction avec la CyPB constituerait un mécanisme de déclenchement ou de régulation de cette libération.

#### b) Le récepteur lymphocytaire

La cyclophiline B possède un récepteur spécifique à la surface des cellules lymphoblastiques Jurkat. La constante de dissociation (Kd) est de  $12 \pm 2$  nM. Le nombre de sites est estimé à  $35000 \pm 17000$ /cellule. Ce récepteur est présent à la surface d'autres cellules T (lymphocytes circulants, lignées Molt-4 et HSB2). Il n'est pas retrouvé à la surface des cellules B (lignées Raji et LiCr).

Après la liaison de la CyPB au récepteur, le complexe est internalisé. La CyPB est libérée sous forme dégradée dans le milieu [Allain *et al.* (1994b)]. Le complexe CyPB/CsA se fixe à la surface des lymphocytes T avec la même affinité et le même nombre de sites que la CyPB seule. Le complexe est aussi internalisé mais, à la différence de la CyPB, la CsA s'accumule à l'intérieur de la cellule. La CsA incorporée par l'intermédiaire du complexe provoque la même immunosuppression que la CsA libre. Lorsque sa concentration est inférieure à la capacité de fixation des lymphocytes T, la CyPB cible la CsA vers ces cellules. Par contre, si cette concentration dépasse la capacité de fixation des cellules, la CyPB provoque une rétention de la CsA dans le milieu extracellulaire [Allain *et al.* (1995a)]. Les conséquences biologiques de la liaison de la CyPB libre à son récepteur n'ont pas encore été mises en évidence.

## C. Autres activités

### 1. Cyclophiline B et activité mitogène

De nombreux travaux montrent que la CyPB peut être sécrétée [Caroni *et al.* (1991); Spik *et al.* (1991); Allain *et al.* (1995); Price *et al.* (1994)]. La CyPB de Poulet sécrétée présente une activité mitogène vis à vis des fibroblastes et des cellules du cœur à une concentration nettement supérieure à celles des facteurs de croissance [Caroni *et al.* (1991)].

### 2. Intervention d'une cyclophiline dans le phénomène d'apoptose

La protéine NUC18 est une nucléase de 18 kDa. Son activité associée à la dégradation de l'ADN dans les thymocytes de Rat en apoptose est régulée par les mêmes facteurs que l'apoptose des lymphocytes (glucocorticoïdes, ionophores) [Gaido et Cidlowski (1991); Caron-Leslie et Cidlowski (1991)].

Deux fragments tryptiques de la NUC18 montrent de fortes homologies de séquence avec la CyPA. D'autre part, des anticorps anti-NUC18 et anti-CyPA sont capables de reconnaître l'une ou l'autre des protéines. Ces observations ont permis de montrer que les CyP A, B et C ont aussi une activité nucléasique. Comme pour la NUC18, cette activité est dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$ . De manière surprenante, la CsA stimule l'activité nucléasique des CyP A, B et C [Montague *et al.* (1994)]. Il reste à déterminer l'impact de cette activité dans la cellule et plus particulièrement au cours de l'apoptose.

### 3. Le chimiotactisme des cyclophilines

Chez les macrophages murins, les LPS induisent la sécrétion de la protéine sp18 (« secreted protein 18 kDa »). La sp18 possède une activité pro-inflammatoire *in vivo*. *In vitro*, elle a une activité chimiotactile pour les neutrophiles et les macrophages. Cette activité est inhibée par la CsA. Dans les mêmes conditions, la CyPA bovine montre également une activité chimiotactile. Le séquençage de trois fragments tryptiques de la sp18 montre une identité totale avec la CyPA murine [Sherry *et al.* (1992)].

De façon similaire, la recherche de facteurs chimiotactiles dans l'utérus de Rat a conduit à l'isolement d'une protéine de 18 kDa, probablement la CyPA. *In vitro*, cette protéine ainsi que les CyPA bovine et humaine sont chimiotactiles pour les éosinophiles et les

neutrophiles. Elles stimulent également la dégranulation des éosinophiles. La CsA bloque toutes ces activités [Xu *et al.* (1992)].

Les fortes similitudes de structure existent entre la CyPA et le dimère de l'IL-8. Ces similitudes pourraient être l'explication de l'activité chimiotactile de la CyPA. En effet, l'IL-8 est une cytokine proinflammatoire majeure. Cependant, la localisation cytosolique et l'absence de séquence signal de la CyPA rendent difficile l'explication de ces propriétés dans des conditions physiologiques. Ces propriétés sont peut être liées à des formes sécrétées de cyclophiline.

## II. Activités biologiques des « FK506-Binding Proteins »

### A. Interaction avec d'autres protéines

#### 1. Le FKBP12

Le FKBP12 se fixe à deux récepteurs intracellulaires associés à la libération du  $Ca^{2+}$ . Ces récepteurs de deux types sont : le récepteur ryanodine (RyR ou aussi CRC pour « calcium release channel ») et le récepteur à l'inositol 1, 4, 5- triphosphate (IP3R).

Les RyR des muscles squelettiques (RyR-1) et des cellules du cœur (RyR-2) sont associés à la libération de  $Ca^{2+}$  lors de la contraction musculaire. Le RyR-1 et le FKBP12 cytoplasmique sont associés en équilibre rapide [Timerman *et al.* (1995)]. Ils forment un hétérooligomère [Jayaraman *et al.* (1992)] constitué de quatre monomères ryanodine et de quatre molécules de FKBP12 [Timerman *et al.* (1993)]. Cet hétérooligomère peut être dissocié par la rapamycine et le FK590 (un analogue structural du FK506). Le FKBP12 régule le RyR-1 en altérant sa sensibilité au  $Ca^{2+}$  et en stabilisant son état fermé. Comme le montre l'utilisation de mutants du FKBP12 affectés dans leur activité enzymatique, l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérisique du FKBP12 n'est pas impliquée dans la régulation du RyR-1.

Le FKBP12 est également retrouvé associé à l'IP3R. Il stabilise le canal calcique dans son état fermé, probablement en assurant une coopérativité maximale entre les quatre sous-unités [Cameron *et al.* (1995)].

La stimulation de mastocytes par des anticorps anti-IgE provoque la libération de FKBP12 bien qu'il ne possède pas de séquence signal. Cette libération est liée à l'exocytose du FKBP12 à partir d'un compartiment de stockage. Dans les neutrophiles, le FKBP12 extracellulaire induit une variation de la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  par l'ouverture des RyR. Le FK506 et la rapamycine inhibent cet effet du FKBP12. Ces observations suggèrent l'existence d'un récepteur membranaire pour le FKBP12 induisant un signal de transduction passant par la libération de  $Ca^{2+}$  [Bang *et al.* (1995)].

Le TGF- $\beta$  (« transforming growth factor ») exerce son effet en se liant à un complexe constitué de récepteurs de type I et de type II. Le système du double hybride montre que le FKBP12 se fixe spécifiquement à la partie cytoplasmique du des récepteurs de type I. Cette fixation peut être déplacée par le FK506. De plus, la partie N-terminale du FKBP12 et l'intégrité de son site de fixation du FK506 sont nécessaires à l'interaction. Il reste à déterminer si le FKBP12 intervient dans la transduction du signal du TGF- $\beta$  [Wang *et al.* (1994)].

## 2. Le FKBP25

Le FKBP25 s'associe à deux protéines : la caséine-kinase II et à la nucléoline. La caséine-kinase II phosphoryle et se complexe avec de nombreuses protéines impliquées dans la croissance cellulaire notamment la nucléoline et avec la protéine de fusion GST-FKBP25. Cette GST-FKBP25 peut se lier à la nucléoline. La rapamycine n'inhibe pas la formation de ces complexes car l'activité isomérasique n'y est pas impliquée [Jin et Burakoff (1993)].

## 3. Les FKBP52 et FKBP54

Les FKBP52 et FKBP54 participent à la formation du complexe inactif du récepteur aux hormones stéroïdes [cf. I. B. 2. p. 49 Le complexe du récepteur aux stéroïdes].

## B. inhibition de la prolifération

La rapamycine intervient dans l'inhibition de la phosphorylation de la p70 S6 kinase [Price *et al.* (1991); Terada *et al.* (1993)]. Cet enzyme, activé par phosphorylation, intervient dans la synthèse de protéines régulant le cycle cellulaire. La p70 S6 kinase est également essentielle au passage de la cellule vers la phase G1 par phosphorylation de la sous-unité ribosomale 40S [Erikson (1991)]. L'inactivation de la p70 S6 kinase est réversible par

addition de FK506. Elle montre la nécessité de la formation d'un complexe rapamycine/FKBP

Le modèle de la levure a permis d'identifier la cible du complexe rapamycine/FKBP. Deux protéines TOR1 et TOR2 («target of rapamycin») sont indispensables au passage de la cellule en phase G1. TOR2 est inhibé par le complexe rapamycine/FKBP1(homologue du FKBP12 chez la levure) [Kunz et Hall (1993); Cafferkey *et al.* (1993)]. Chez les mammifères, ces protéines sont dénommées : FRAP («FKBP-rapamycine associated protein») [Brown *et al.* (1994)], RAPT («rapamycin target») [Chiu *et al.* (1994)] ou mTOR [Sabers *et al.* (1995)]. Pour exercer son effet, la rapamycine nécessite la formation d'un complexe ternaire rapamycine/FKBP12/(FRAP ou RAPT ou mTOR).

## CONCLUSION

La CsA et le FK506 permettent de commencer à emboîter les pièces du puzzle constitué par la transduction des signaux d'activation des lymphocytes T.

Comme nous l'avons vu, les mécanismes moléculaires d'action de ces immunosuppresseurs nécessitent entre autre la formation d'un complexe avec les immunophilines. Ces découvertes fournissent à la recherche de nouveaux outils et des hypothèses pour un modèle rationnel du contrôle de l'activité immunitaire. C'est ainsi que les complexes CyPA/CsA et CyPB/CsA inhibent *in vivo* l'activité de la calcineurine. La CyPA est certainement la cyclophiline majeure intervenant dans les phénomènes d'immunosuppression, ne serait-ce que par sa localisation cytosolique identique à celle de la calcineurine et son abondance naturelle.

Le cas de la CyPB est plus intrigant. En effet, elle possède un peptide signal qui la dirige sans conteste vers la voie de sécrétion; elle n'a jamais été mise en évidence dans le cytosol. Pourtant sa surexpression entraîne une plus grande sensibilité des cellules à la CsA. La mise en évidence de la CAML a permis d'établir une relation entre la CyPB et l'activation  $Ca^{2+}$ -dépendante des lymphocytes T.

La calcineurine a permis de rapprocher les CyPs et les FKBP. La mise en évidence d'une interaction de ces protéines avec la calcineurine en l'absence de CsA ou de FK506 suggère qu'elles peuvent intervenir dans un mécanisme commun. Une telle convergence est aussi observée pour la CyP40 et le FKBP52 au sein du complexe inactif du récepteur aux stéroïdes. Les protéines membranaires impliquées dans un transport sont aussi en relation avec les peptidyl prolyl cis-trans isomérases :

- le FKBP12 stabilise le RyR et l'IP3R
- une cyclophiline mitochondriale intervient dans l'ouverture d'un pore de la membrane interne de la mitochondrie
- la CyPB interagit avec la CAML qui est impliquée dans le flux calcique intracellulaire.

La CyPB présente plusieurs aspects qui peuvent paraître contradictoires. Elle est décrite en tant que protéine résidente de vésicules dérivées du réticulum endoplasmique mais aussi comme une protéine suivant la voie de sécrétion jusqu'au milieu extracellulaire. Sa localisation intracellulaire est en accord avec l'existence de la CAML et la mise en évidence d'un récepteur spécifique à la surface des lymphocytes T justifie sa sécrétion. La CyPB pourrait avoir des rôles totalement différents en fonction de sa compartimentation.

Afin de pouvoir répondre à l'ambiguïté de la localisation multiple de la CyPB, nous nous sommes attachés à caractériser ses propriétés structurales. Nos premiers travaux ont consisté en la purification de la forme sécrétée de la CyPB dans le lait humain. Nous avons ensuite analysé les caractéristiques structurales de cette forme sécrétée. En dernier lieu, nous avons recherché la région de la CyPB responsable de son interaction avec le récepteur lymphocytaire.

# Travaux Personnels

---

**Purification de la cyclophiline B  
du lait de Femme**

---

## I. Introduction

Une partie des travaux effectués dans le laboratoire du professeur G. SPIK concerne l'étude des composés biologiquement actifs du lait de Femme. Le lait maternel est l'aliment exclusif du nouveau-né. Il répond non seulement aux besoins du métabolisme et de la croissance du nourrisson, mais il participe également à la maturation de l'intestin et à sa défense contre les infections. En effet, plusieurs substances, notamment le lysozyme ou la lactoperoxydase, interviennent dans la lutte contre les infection bactériennes ou virales. D'un autre côté, les facteurs de croissance du lait de Femme assurent la maturation et la régénération rapide des cellules intestinales. L'étude des facteurs de croissance et de différenciation cellulaire présents dans le lait maternel a débuté dans notre laboratoire en 1988. L'incorporation de [<sup>3</sup>H]-thymidine dans les fibroblastes CCL39 (fibroblastes de poumon de hamster chinois) a servi d'outil d'investigation dans la recherche de nouvelles substances mitogènes du lait de Femme. Le fractionnement du lait maternel par ce crible a curieusement conduit à la mise en évidence de la CyPB. Cette découverte a été réalisée au même moment que les travaux conduisant aux articles de Caroni *et al.* (1991), Hasel *et al.* (1991) et Price *et al.* (1991), cependant elle se distingue par le fait que la CyPB est retrouvée dans un liquide biologique. Caroni *et al.* (1991) ont décrit une sécrétion de la CyPB de poulet quand elle est exprimée par des cellules d'insectes et une activité facteur de croissance pour les fibroblastes et les cellules cardiaques.

Les quantités de CyPB purifiée à partir du lait de Femme sont variables et faibles. Nous nous sommes donc attachés dans un premier temps à rendre le protocole de purification plus fiable afin de pouvoir caractériser la CyPB isolée.

## II. Travaux antérieurs

La recherche de nouveaux facteurs de croissance du lait maternel a donc conduit à la caractérisation d'une forme sécrétée de la CyPB [Delmas (1988)]. Dans le protocole permettant d'isoler pour la première fois la CyPB, le point essentiel est qu'il n'existe pas d'étape préalable d'acidification visant à précipiter les caséines. Ceci permet de conserver toutes les protéines acido-sensibles du lait. Un autre point important est l'utilisation de plusieurs étapes de chromatographie d'échanges de cations pour séparer les protéines

basiques. En effet, le lait de Femme est riche en protéines fortement basiques présentant un intérêt biologique (angiogénine, lactoferrine, lysozyme, ...). Le fractionnement du lait est basé sur le suivi de l'incorporation de [3H]-thymidine par des fibroblastes CCL39. Il permet de sélectionner les fractions renfermant une activité mitogène. L'étape finale de chromatographie d'échange de cations sur colonne Mono S a conduit à l'isolement de deux protéines basiques de 19 et 20 kDa. Ces deux protéines sont reconnues par des anticorps anti-bFGF. Leur activité mitogène est dose-dépendante et 50% de l'incorporation maximale de [3H]-thymidine est obtenue pour une concentration de 50 ng/ml. Cette concentration est cependant 50 fois plus élevée que celle rencontrée pour un facteur de croissance comme le bFGF. Le séquençage de la protéine de 20 kDa montre de fortes homologues de séquence avec la CyPA pour les 50 premiers résidus d'acides aminés. A ce moment, aucune cyclophiline distincte de la CyPA n'avait encore été décrite chez les mammifères. Cette protéine a donc été appelée dans un premier temps CGF (« cyclophilin-like growth factor »). Une collaboration entreprise avec les laboratoires Sandoz a alors conduit au clonage du gène de cette cyclophiline à partir d'une banque d'ADNc de lymphocytes humains. Cependant, la protéine recombinante exprimée chez *Escherichia coli* ne montrait aucune activité mitogène pour les fibroblastes.

Nos premiers travaux ont donc consisté à reprendre le protocole de purification de cette protéine à partir du lait de Femme afin d'obtenir une protéine d'une plus grande pureté. Le but étant de caractériser les véritables propriétés intrinsèques de cette protéine et les rapprocher de celles de la protéine recombinante.

### III. Purification de la cyclophiline B à partir du lait de Femme

Ces travaux ont conduit à l'établissement du protocole de purification décrit dans l'article qui suit :

#### A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP)

Spik G., Haendler B., Delmas O., Mariller C., Chamoux M., Maes P., Tartar A., Montreuil J., Stedman K., Kocher H.P., Keller R., Hiestand P.C. & Movva N.R.

1991 *J. Biol. Chem.* 266(17), 10735-10738

## **A Novel Secreted Cyclophilin-like Protein (SCYLP)**

(Received for publication, January 2, 1991)

**Genevieve Spik‡, Bernard Haendler§, Olivier Delmas‡, Christophe Mariller‡, Muriel Chamoux‡, Pierrette Maes¶, André Tartar¶, Jean Montreuil‡, Kenneth Stedman§, Hans P. Kocher§, Roland Keller§, Peter C. Hiestand§, and N. Rao Movva§**

*From the ‡Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, the ¶Laboratoire des Biomolécules, Institut Pasteur de Lille, 1 Rue Calmette, 59109 Lille, France, and §Preclinical Research, Sandoz Ltd., 4002 Basel, Switzerland*

## Abstract

A novel cyclosporin A binding glycoprotein of 21kDa was isolated from human milk by several steps of cation exchange chromatography. The corresponding gene was cloned from human T cells, expressed in *Escherichia coli* and the recombinant protein purified. The protein shares 58% amino acid identity with the cytosolic cyclophilin and is initially synthesized with an hydrophobic leader sequence. The cyclophilin-like protein has also peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase activity, although less efficient, that is inhibited by cyclosporin A. The existence of a secreted form of cyclophilin-like protein in addition to the previously known cytosolic cyclophilin implies that these proteins act on different *in vivo* targets.

Cyclosporin A (CsA) and FK-506 are distinct immunosuppressive molecules (1). They, respectively, bind to the structurally unrelated cytosolic polypeptides, cyclophilin (2) and FK-506 binding protein (3, 4). These proteins have recently been shown to be peptidyl-prolyl cis/trans-isomerases (5, 6) and to mediate protein folding *in vitro*. Neither the cellular role of these peptidyl-prolyl cis/trans-isomerases nor the relation of their enzymatic activity to inhibition of early T-cell activation by CsA (7, 8) or FK-506 (9) is presently understood.

We report the existence of a novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP) in the extracellular environments. We have fortuitously purified this protein in our attempts to isolate novel growth factors from human milk. We present results concerning cloning, complete nucleotide sequence, purification of native protein and recombinant protein expressed in *Escherichia coli*, their binding to CsA, and the associated proline isomerase activity.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Materials

Sephadex G-50 superfine, SP-Sephadex C-25, S-Sepharose FastFlow, and Mono S HR 5/5 column were purchased from Pharmacia(Uppsala, Sweden). Nucleic acid modifying enzymes were from Boehringer Mannheim. Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide was provided by Bachem AG (Bubendorf, Switzerland). Recombinant human cyclophilin was prepared from an *E. coli* strain engineered to express this protein.'

### Methods

*Oligonucleotide Screening* – All recombinant nucleic acid methods were as described (10). Two sets of oligonucleotides, GAYGARAARAARAARGGICCIAARGT (corresponding to amino acids 2 – 10 in Fig. 2) and ACRTCYTCRTCICCIATICGIAGGTC (amino acids 16 – 24 in Fig. 2), where R = adenosine or guanine, Y = cytosine or thymine and I = inosine were used to screen the  $\lambda$ gt10 library of human T-cell cDNA (source, Clontech, Palo Alto, CA) at low stringency conditions. The cDNA inserts from positive recombinant phage were subcloned into plasmid vectors, and the longest insert was sequenced in both strands by using the sequenase kit from U. S. Biochemical Corp.

*Construction of Recombinant Plasmid for Expression in E. coli* – A recombinant plasmid, PCGF-72, capable of expressing the mature SCYLP was generated by inserting the nucleotide sequence 118 – 893 as shown in Fig. 2, into an E. coli expression vector, pKK233-2 (supplied by Pharmacia, Sweden, Ref. 11) between the restriction enzyme sites NcoI and HindIII. The insert was generated by polymerase chain reaction and engineered such that the ATG codon within the NcoI site of the plasmid specified the initiating methionine followed by mature protein. This plasmid specified the expression of recombinant mature SCYLP under the control of Trc promoter.

*Purification of SCYLP from Human Milk* – Human milk proteins were obtained from a milk bank pool collected from mothers at all stages of lactation and stored frozen before use. Unless stated otherwise all subsequent operations were conducted at 4 °C. SCYLP was prepared from human skim milk and isolated by sequential ion exchange chromatography and gel filtration chromatography as described below. Thawed human milk (20 liters) was centrifuged at 10,000 x g for 1 h. 50 g of dry SP-Sephadex C-25 were added to the skim milk, and the mixture was stirred overnight. The resin was extensively washed with 0.22 M sodium acetate, pH 7.0, and eluted with solutions containing increasing sodium acetate concentrations (0.22, 0.4, 0.6, and 2.5 M). The fraction eluted with sodium acetate 0.4 M was applied to 5 X 10-cm column of S-Sepharose Fast Flow equilibrated with 0.22 M sodium acetate, pH 7. The column was washed extensively with the equilibration buffer, and the proteins were eluted successively with 500 ml of a solution containing 0.4, 0.6, and 1.5 M sodium acetate. In the first experiments, separation was monitored by absorbance at 280 nm and by the mitogenic activity using [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in CCL39 fibroblast cells (12). From there on, purification was routinely performed and monitored by absorbance at 280 nm and by enzyme-linked immunosorbent assay (color reaction monitored at 490 nm) and dot-blot immunoassays (data not shown) using polyclonal antiserum against the COOH-terminal peptide (CGKIEVEKPFAlAKE) of SCYLP. Pooled immunoreactive fractions eluted with 0.6 M sodium acetate were concentrated on Amicon YM-5 membranes to 10 ml, applied to a Sephadex(-50 superfine column (3.5 x 100 cm), equilibrated, and eluted with 0.1 M ammonium bicarbonate and lyophilized. The lyophilized immunoreactive material was resuspended in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.6, and passed through an ultrafiltration HV membrane (Millipore). Purification of the filtrate was further performed on a fast protein liquid chromatography Mono S HR 5/5

column (Pharmacia) as described in the legend of Fig. 1. The pooled immunoreactive fractions were stored at 4 °C.

*Amino Acid Sequence Analysis* – The amino acid sequence analysis of native SCYLP was carried out by automated Edman degradation using an Applied Biosystems 470A Sequencer equipped with a model120A on-line phenylthiohydantoin analyzer. The digest of the native protein with trypsin (1%, w/w) was separated on an Aquapore RP300 column using a 130 A high performance liquid chromatography system (Applied Biosystems).

*Purification of Recombinant Human SCYLP* – A 1.2-liter culture of *E. coli* transformed with PCGF-72 was grown at 37 °C overnight to an optical density (absorbance at 550 nm) of 3.9 and harvested by centrifugation. The cells (6.45 g of wet weight) were suspended in 38.7 ml of phosphate-buffered saline, 10 mM EDTA and sonicated four times for 3 min each on ice. The resulting homogenate was centrifuged at 50,000 X g for 60 min to remove cell debris. The clear supernatant was dialyzed against 200 volumes of 20 mM MES, 1 mM EDTA, pH 6.0 (buffer A), for 16 h at 8 °C. The dialyzed material was loaded onto a Mono S cation exchange column (HR 5/5) equilibrated with buffer A and eluted with a linear gradient of NaCl in buffer A. A peak (280-nm absorbance) eluting with 250 mM NaCl was collected and found to be essentially pure (>95%) by SDS-PAGE analysis and silver staining (data not shown). This fraction was analyzed by Edman degradation and found to have identical NH<sub>2</sub>-terminal amino acids to those predicted from the DNA sequence.

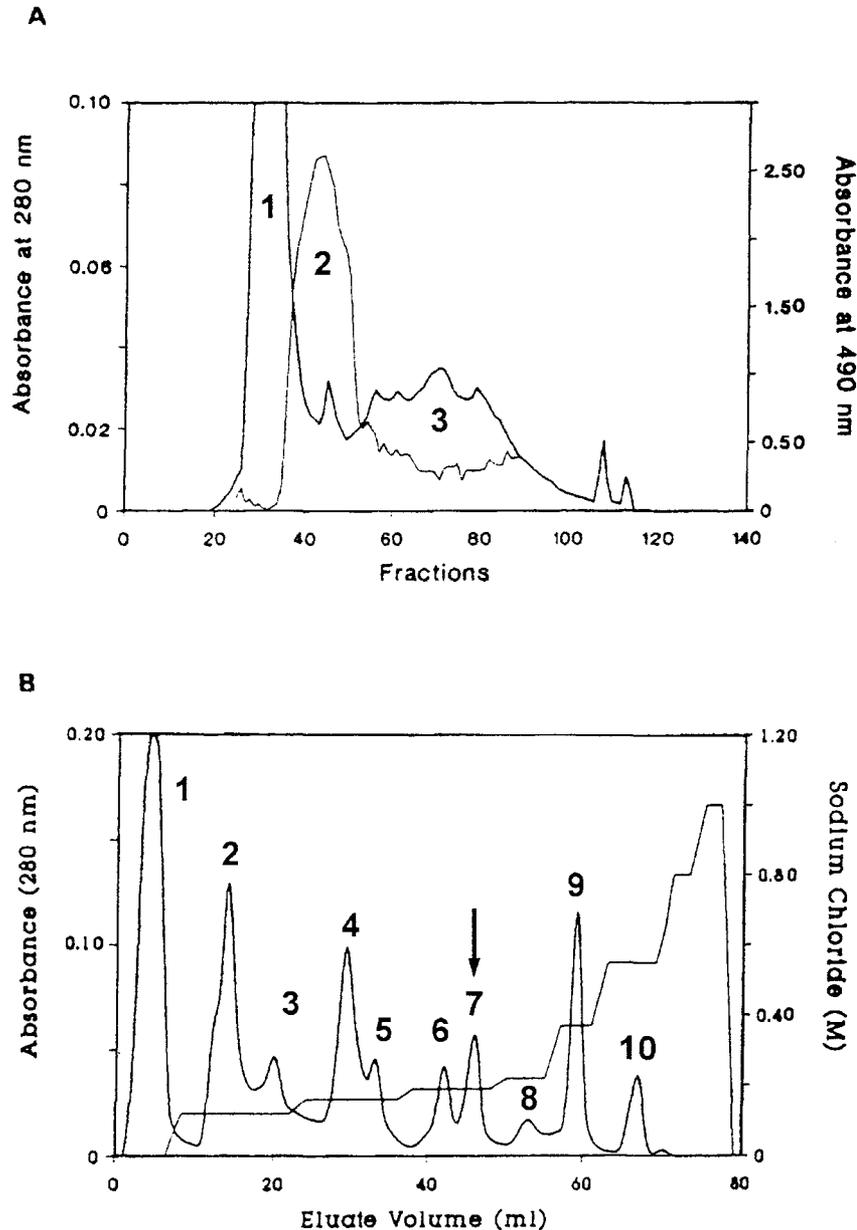
*Protein Analyses* – SDS-PAGE was performed using the Pharmacia Phast-gel system and preformed 8 – 25% polyacrylamide gradient gels. The detection of sugars in glycoconjugates was performed by an enzyme immunoassay according to the procedure described by Haselbeck and Hosel (13).

*Enzymatic Activity* – The peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerase activity was assessed according to the method of Fischer et al. (5) with the exception that the reaction was allowed to proceed for 90 s at 4 °C. The  $\alpha$ -chymotrypsin mediated liberation of p-nitroaniline from the substrate, succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (50  $\mu$ M final concentration), was assayed at 410 nm. To assay the inhibition of enzyme activity by CsA, the enzyme was preincubated with CsA for 15 min at 37 °C before the addition of substrate.

*CsA Binding* - An automated LH-column binding assay as described by Handschumacher et al. (2) was used. The indicated amounts of protein were incubated for 15 min at 37 °C with 100,000 dpm of [<sup>3</sup>H]CsA (cyclosporin A, specific activity of 12.12  $\mu$ Ci/ $\mu$ g) in a final volume of 100  $\mu$ l. 50  $\mu$ l of this reaction mixture was injected into the column. Binding was calculated from the total amount of label injected *versus* the amount bound to the fraction isolated in the void volume of the column.

## RESULTS AND DISCUSSION

In the first experiments, human milk was separated into various components with the aim of isolating novel growth factors as assayed by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation into CCL39 fibroblasts. Various chromatography steps led to the isolation of three fractions (Fig. 1A). Fraction 2, still possessing mitogenic activity, was further fractionated on a fast liquid chromatography Mono S column. Ten well-defined fractions were obtained (Fig. 1B) and analyzed. Fraction 7 was not mitogenic and amino acid sequencing by Edman degradation permitted identification of 48 out of 52 amino-terminal residues. A computer search of the National Biomedical Research Foundation data base showed that the residues from 9 to 52 were 50% identical to the NH<sub>2</sub>-terminal 44 residues of human cyclophilin (14, 15). Oligonucleotide probes corresponding to the amino acid stretches least homologous to human cyclophilin were synthesized and employed to screen a T-cell cDNA library. We have reasoned that, similar to cyclophilin, which was originally isolated from thymus but subsequently detected in virtually all tissues (16), this highly related SCYLP might also be ubiquitous and expressed in particular by T cells which were shown to be a main target for CsA (7, 8). Four hybridizing clones with similar restriction patterns were obtained and the nucleotide sequence of the clone with the longest insert was determined (Fig. 2). An open reading frame coding for 184 amino acids and a stretch of residues starting with an alanine that was shown by protein sequencing to correspond to the NH<sub>2</sub> terminus of the mature protein can be deduced. The hydrophobic leader region between this alanine and the preceding methionine comprises 23 amino acids and is characteristic of secretory proteins (17). It might represent the initiating methionine but it cannot be ruled out that another methionine (at nucleotide positions 22-24), which lies further upstream but in a less favorable context for translation initiation (18) performs this function. One potential N-glycosylation site (amino acid positions 116-118) and an RGD sequence (positions 77-79)



**Figure 1:** Purification of SCYLP from human milk. In the routine assays, presence of SCYLP was detected by using a polyclonal antiserum against the COOH-terminal peptide of SCYLP. Pooled immunoreactive fractions isolated from human milk as described under "Methods," by batch chromatography on SP-Sephadex C-25 and S-Sepharose were further purified by chromatography on Sephadex G-50 superfine (A). The elution profile of proteins was monitored by absorbance at 280 nm (—) peaks (peaks 1-3) were obtained. Elution of SCYLP was monitored by absorbance at 490 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay method. The immunoreactive fractions corresponding to peak 2 were pooled and re-chromatographed on a fast protein liquid chromatography Mono S column equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.6 (B). The column was eluted at a flow rate of 1 ml/min using a discontinuous NaCl gradient (0.1–1 M). The elution profile was monitored by absorbance at 280 nm. Ten individual fractions (numbers 1-10) were obtained. The arrow indicates the fraction reacting in a dot-blot assay with the polyclonal antiserum against the COOH-terminal peptide of SCYLP.

are also present. Native SCYLP, which corresponds to a 21-kDa band on SDS-PAGE, is glycosylated as assayed by specific staining of sugars (data not shown). Comparison of the mature protein with human cytosolic cyclophilin (15) showed 58% amino acid identity (Fig. 3). The similarities are far more pronounced in the central part of the molecule (80% conservation in the region between amino acids 48 and 143). An analogous pattern has already been noted among cyclophilins from different species(19).

A recombinant plasmid expressing mature SCYLP was introduced into *E. coli*, and the recombinant protein was purified as described under "Methods." In view of the homology of SCYLP to cyclophilin, CsA binding was measured using the LH-20 column assay (2) and peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase activity determined as described by Fischer *et al.* (5). These results were compared with those obtained for recombinant human cyclophilin (Fig. 4). Both recombinant and native SCYLP have isomerase activities similar to that found for recombinant human cyclophilin (Fig. 4a). However, binding of native and recombinant SCYLP to CsA is nearly 20-fold less than that of recombinant human cyclophilin (Fig. 4c), even though similar concentrations of CsA (30–100 nM) is required to inhibit the isomerase activity of SCYLP (Fig. 4b). Conversely, we have shown previously that yeast cyclophilin binds CsA as well as human cyclophilin but displays only 10% of its enzymatic activity (19). Together these results indicate that CsA binding and peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase activity can be dissociated from each other to a certain extent, and it should be possible to obtain cyclophilin variants that possess only CsA binding or peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase activity.

The role of a variant form of peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase secreted in human milk and expressed in T lymphocytes is unclear. Further immunoblotting experiments using antibodies directed against the 15 COOH-terminal amino acid residues of SCYLP allowed its detection in the extracellular medium of HepG2 cells, a human liver cell line, and Jurkat cells, a human T-cell line (data not shown). Thus, this protein seems also to have a nonspecific tissue distribution and may perform functions similar to that of cytosolic cyclophilin but in non-cytosolic compartments. In the extra-cellular medium, SCYLP may, through its proline isomerase activity, modify the interaction of polypeptides with their receptors. It is also possible that SCYLP is not truly extra-cellular but is sequestered in the non-cytosolic compartments within the cell. Protein disulfide isomerase, another enzyme

```

1  gggtttcgcctccgcctgtggatgctgcgcctctccgaacgcaacatgaag  51
      METLeuArgLeuSerGluArgAsnMETLys
      -32                               -24
52  gtgctccttgcgcgccctcatcgcggggtccgttcttctctctgctgctg  102
      ValLeuLeuAlaAlaAlaLeuIleAlaGlySerValPhePheLeuLeuLeu
      -20                               -10
103 ccgggaccttctgcggccgatgagaagaagaaggggcccaggcaccgtc  153
      ProGlyProSerAlaAlaAspGluLysLysLysGlyProLysValThrVal
      -1 | +1                               10
154 aagggtgtattttgacctacgaattggagatgaagatgtaggccgggtgatc  204
      LysValTyrPheAspLeuArgIleGlyAspGluAspValGlyArgValIle
      20
205 tttgggtctcttcggaaagactgttccaaaaacagtggataattttgtggcc  255
      PheGlyLeuPheGlyLysThrValProLysThrValAspAsnPheValAla
      30                               40
256 ttagctacaggagagaaaggatttggctacaaaaacagcaaatccatcgt  306
      LeuAlaThrGlyGluLysGlyPheGlyTyrLysAsnSerLysPheHisArg
      50                               60
307 gtaatcaaggacttcatgatccagggcggagacttcaccaggggagatggc  357
      ValIleLysAspPheMETIleGlnGlyGlyAspPheThrArgGlyAspGly
      70                               * * * 80
358 acaggaggaagagacatctacgggtgagcgttccccgatgagaacttcaa  408
      ThrGlyGlyLysSerIleTyrGlyGluArgPheProAspGluAsnPheLys
      90
409 ctgaagcactacgggcctggctgggtgagcatggccaacgcaggcaaaagac  459
      LeuLysHisTyrGlyProGlyTrpValSerMETAlaAsnAlaGlyLysAsp
      100                               110
460 accaacggctcccagttcttcatcagcagctcaagacagcctggctagat  510
      ThrAsnGlySerGlnPhePheIleThrThrValLysThrAlaTrpLeuAsp
      ===== 120                               130
511 ggcaagcatgtggtgtttggcaagtcttagagggcatggagggtggtgcgg  561
      GlyLysHisValValPheGlyLysValLeuGluGlyMETGluValValArg
      140
562 aagggtggagagaccaagacagacagccgggataaacccctgaaggatgtg  612
      LysValGluSerThrLysThrAspSerArgAspLysProLeuLysAspVal
      150                               160
613 atcatcgcagactgcggcaagatcgaggtggagaagccctttgccatcgcc  663
      IleIleAlaAspCysGlyLysIleGluValGluLysProPheAlaIleAla
      170                               180
664 aaggagttagggcacagggacatcttcttcttgagtgaccgtctgtgcaggcc  714
      LysGlu .
      184
715 ctgtagtccgccacagggctctgagctgcaactggcecccggtgctggcatct  765
766 ggtggagcgggaccactcccctcacattccacaggeccatggactcacttt  816
817 tgtaacaaactcctaccaacactgaccaataaaaaaaaaatgtgggtttttt  867
868 ttttttttaataataaaaaaaccccc  893

```

**Figure 2:** Nucleotide sequence of SCYLP insert and the derived amino acid sequence of the protein. The underlined aminoacids were initially identified by sequenator analysis of the intact native protein or of its tryptic fragments. The arrow shows the position of cleavage from the precursor. A potential glycosylation site(= =) and a possible adhesion site (\*\*\*) are indicated. Nucleotide sequence aataaaa corresponds to a polyadenylation signal.



```

SCYLP    1 adekkkgpkvTVkvyFDlrigdEdvGRViFgLFgktVPKTvdNFvALaTGEKGFGYKnSkFHRvIkdf
          ||  ||  |  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
CYP      1      mvnpTV  fFDiavdgEplGRVsFeLFadkVPKTaeNFrALsTGEKGFGYKqScFHRiIpgF
          -----TV---FD-----E--GRV-F-LF---VPKT--NF-AL-TGEKGFGYK-S-FHR-I---F

SCYLP    69 MiQGGDFTRgdGTGGKSIYGErFpDENFkLKHgPGwvSMANAGkdTNGSQFFItTvKTaWLDGKHVV
          |  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
CYP      61 McQGGDFTRhnGTGGKSIYGEkFeDENFiLKhtGPGilSMANAGpnTNGSQFFIcTaKTeWLDGKHVV
          |  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
          con  M-QGGDFTR--GTGGKSIYGE-F-DENF-LKH-GPG--SMANAG--TNGSQFFI-T-KT-WLDGKHVV

          137 FGKVLEGMevvrkvestktdsrkKplKdviIADCGkiEvekpfaiake
          ||||  |||  |  |||  |||  |
          129 FGKVkEGM niveamerfgsrngKtsKkitIADCGqlE
          con  FGKV-EGM-----K--K---IADCG--E-----

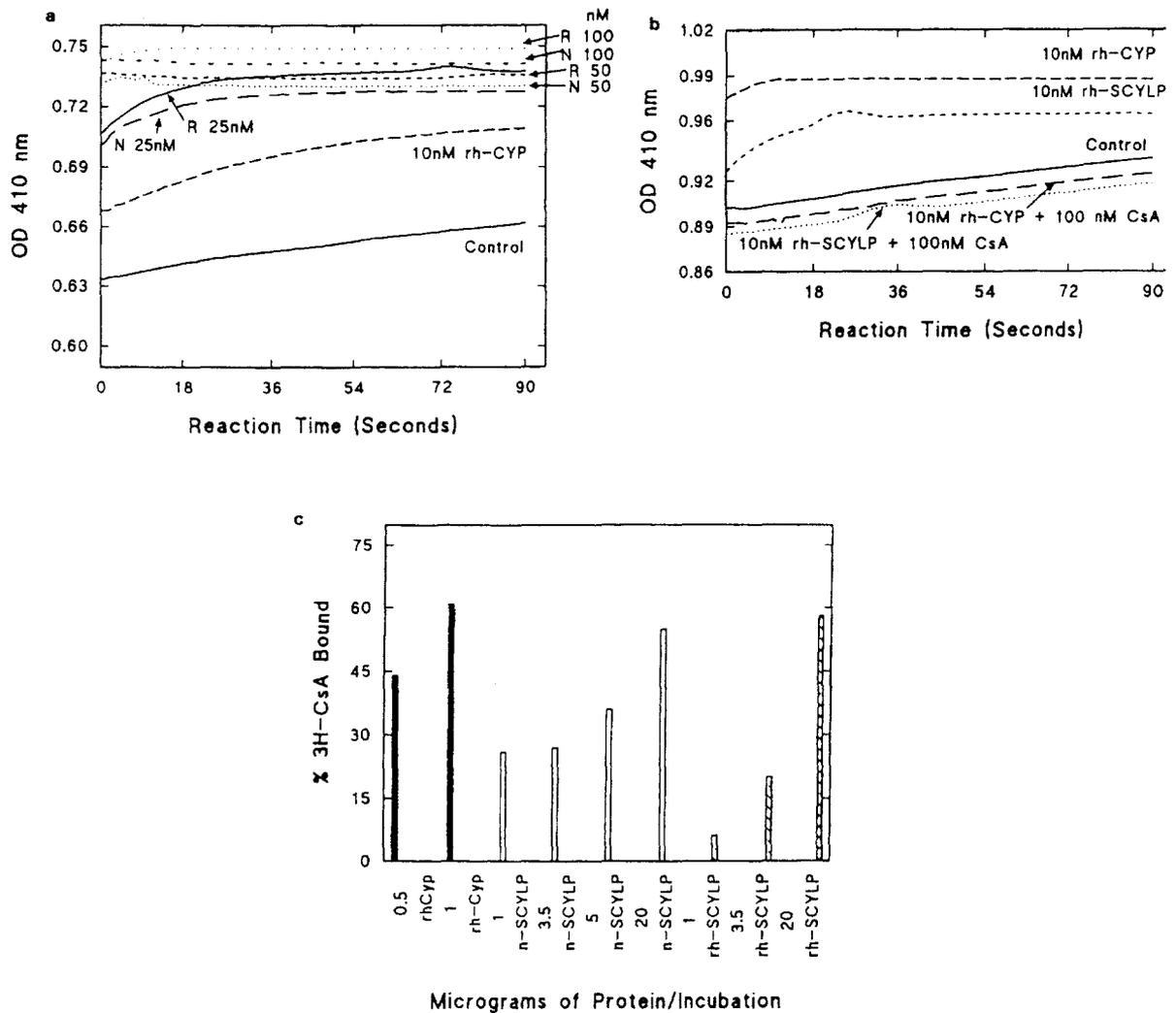
```

**Figure 3:** Amino acid sequence comparison between mature SCYLP and human cyclophilin. The GENALIGN program of Intelligenetics Software was used. Gaps are introduced to maximize similarities. CON shows the identical residues.

affecting covalent bonds of proteins, was actually found in endoplasmic reticulum (20). There is possibly a role for a proline isomerase in the endoplasmic reticulum, but SCYLP lacks the targeting sequence KDEL (21) common to many resident proteins of this compartment. However, similar to Bip (22), the secreted counterpart of the heat shock protein hsp70, SCYLP has an NH<sub>2</sub>-terminal-charged region that cyclophilin lacks. A mitochondrial cyclophilin, in addition to the cytosolic form has been characterized in *Neurospora crassa*, but both proteins were shown to be encoded by the same gene (23).

In *Saccharomyces cerevisiae*, a cDNA sequence probably corresponding to a non-cytosolic form of the protein has also been found recently (24). In addition, the *ninaA* gene product of *Drosophila melanogaster* specifies a membrane associated cyclophilin (25) that is synthesized with a signal sequence necessary for translocation. Last, a periplasmic proline isomerase that is homologous to cyclophilin, although insensitive to CsA, has been isolated from *E. coli* (26). The protein folding activity displayed by peptidyl-prolyl isomerases must be part of a fundamental biochemical mechanism, since two structurally unrelated abundant proteins, cyclophilin and FK-506 binding protein, the first of which was shown to be ubiquitous and extremely conserved in the phylogeny (16), share this activity. In the case of cyclophilin, the existence of a family of proteins responding to changing cell physiological conditions was postulated as numerous cyclophilin related sequences were detected in the human genome (15). Even though most of those were later found to be pseudogenes (27), it is still possible that additional variant exist besides the cytosolic cyclophilin and the secreted form described here. The precise role of these polypeptides *in vivo* awaits further investigation. Purified SCYLP is not mitogenic to CCL39 fibroblasts, but it is tempting to think that its folding function may activate an associated growth factor. A homologue of SCYLP from chickens (168 out of 184 amino acids are identical) has been independently isolated and is described in the accompanying manuscript of Caroni et al. (28).

*Acknowledgments* – We thank E. Andersen and Dr. Max Schreier for help with growth factor studies and acknowledge the excellent technical assistance of S. Valente, B. Loher, and P. Graff. We also thank Dr. Joseph Heitman for critical reading of the manuscript.



**Figure 4:** Binding of CsA and peptidyl prolyl cis/trans isomerase activity of SCYLP. a, peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of SCYLP and comparison to cyclophilin. Control, spontaneously liberated p-nitroanilide due to slow conversion of residual (~13 %) cis form into the corresponding trans configuration accessible by  $\alpha$ -chymotrypsin. R, recombinant human SCYLP (from *E. coli*); N, natural human SCYLP (from milk); rh-CYP, recombinant human cyclophilin (from *E. coli*). b, inhibition of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of recombinant human SCYLP (rb-SCYLP) and recombinant human cyclophilin (rb-CYP) by CsA. c, binding of CsA to cyclophilin and SCYLP. Binding studies were done at  $\sim 7^\circ\text{C}$  in a final volume of 100  $\mu\text{l}$  of Tris, pH 7.2, containing 5 mM 2-mercapto-ethanol and 0.5 % Triton X-100. Fifty microliters were injected onto a LH-Sephadex column. Radioactivity was measured with a flow-through radioactivity detector (Cannberra-Packard Flow-One). The counts measured in the void volume was used for calculating the amount of [ $^3\text{H}$ ]CsA bound to protein. Recombinant human CYP (rh-Cyp), recombinant human SCYLP (rh-SCYLP) and native human CYLP (n-SCYLP).

## REFERENCES

1. Sawada, S., Suzuki, G., Kawase, Y. Takaku, F. (1987) *J. Immunol.* **139**, 1797 - 1803
2. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J. & Speicher, D. W. (1984) *Science* **226**, 544 - 547
3. Siekierka, J. J., Hung, S. H. Y., Poe, M., Lin, C. & Sigal, N. H. (1989) *Nature* **341**, 75 -77
4. Harding, M., Galat, A., Uehling, D. E. & Schreiber, S. L. (1989) *Nature* **341**, 738 - 760
4. Fischer, G., Wittman-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaher, T. & Schmid, F. X. (1989) *Nature* **337**, 476 - 478
5. Takahashi, N., Hayano, T. & Suzuki, M. (1989) *Nature* **337**, 476 - 478
6. Elliott, J. F., Lin, Y. & Mizel, S. (1984) *Science* **226**, 1439 - 1441
7. Kronke, M., Leonard, W., Depper, J. & Greene, W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 5214 -5218
9. Tocci, M. J., Matkovich, D. A., Collier, K. A., Kwok, P., Dumont, F., Lin, S., Degudicibus, S., Siekierka, J. J., Chin, J. & Hutchinson, N. I. (1989) *Immunol.* **143**, 718 - 726
10. Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982) in *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
11. Amman, E. & Brosius, J. (1985) *Gene (Amst.)* **40**, 183 - 190
12. Plouet, J., Olivie, M., Courtois, Y. & Barritault, D. (1984) *J. Cell. Mol. Biol.* **30**, 105 - 110
13. Haselbeck, A. & Hosel, W. (1990) *Glycoconjugate J.* **7**, 63 - 74
14. Harding, M. W., Handschumacher, R. E. & Speicher, D. W. (1989) *J. Biol. Chem.* **261**, 8547-8555
15. Haendler, B., Hofer-Warbinek, R. & Hofer, E. (1987) *EMBO J.* **6**, 947 - 901

16. Koletsky, A. J., Harding, M. W. & Handschumacher, R. E. (1986) *J. Immunol.* **137**, 1054 – 1059
17. Von Heijne, G. (1986) *Nucleic Acids Res.* **14**, 4683 – 4690
18. Kozak, M. (1986) *Cell* **44**, 283 – 292
19. Haendler, B., Keller, R., Hiestand, P. C., Kocher, H. P., Wegmann, G. Movva, N. R. (1989) *Gene (Amst.)* **83**, 39 – 46
20. Freedman, R. B. (1989) *Cell* **57**, 1069-1072
21. Munro, S. & Pelham, H. R. B. (1987) *Cell* **48**, 899 – 907
22. Munro, S. & Pelham, H. R. B. (1986) *Cell* **46**, 291 – 300
23. Tropschug, M., Nicholson, D., Hartl, F., Koeler, H., Pfanner, N., Wachter, E. & Neupert, W. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 14433 – 144440
24. Koser, P. L., Sylvester, D., Livi, G. P. & Hergsma, D. J. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 1643
25. Schneuwly, S., Shortridge, R. D., Larrivee, D. C., Ono, T., Ozaki, M. & Pak, W. L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5390 – 5394
26. Liu, J. & Walsh, C. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 4028 – 4032
27. Haendler, B. & Hofer, E. (1990) *Eur. J. Biochem.* **190**, 477 – 482
28. Caroni, P., Rothenfluh, A., McGlynn, E. & Schneider, C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10739 – 10742

Pour cet article, le CGF a été rebaptisé SCYLP pour « secreted cyclophilin-like protein ». Ensuite, le nom de cyclophiline B sera utilisé pour respecter la nomenclature la plus répandue.

Dans le protocole décrit dans cet article, l'activité mitogène n'est plus utilisée pour le suivi de la purification. En effet, l'extension C-terminale spécifique de la CyPB a servi de modèle pour la synthèse d'un peptide représentant les 15 derniers résidus d'acides aminés de cette protéine par l'équipe du professeur Tartar. Après couplage à la KLH (« keyhole lymphet hemocyanine »), ce peptide permet la production d'anticorps polyclonaux chez le lapin. Ces anticorps reconnaissent spécifiquement la CyPB et permettent de suivre son élution au cours de la purification.

L'activité facteur de croissance qui avait été attribuée dans un premier temps à la CyPB n'est plus retrouvée lorsque la purification à partir du lait de Femme est contrôlée par immunodétection et non par l'activité mitogène. Cette constatation corrobore le fait que la CyPB recombinante est aussi dépourvue d'activité facteur de croissance. L'hypothèse la plus probable concernant cette activité particulière observée dans le premier protocole de purification est la co-purification d'un facteur de croissance possédant des caractéristiques physico-chimiques voisines de la CyPB. Le lait de Femme possède de nombreuses protéines basiques de petite taille qui peuvent avoir des profils d'élution proches de celui de la CyPB. Par exemple, le lysozyme (MM= 14,4 kDa et pI=10,5) est co-élué avec la CyPB lors des deux premières étapes de chromatographie d'échange de cations (SP Sephadex et S-Sepharose Fast Flow). Son élution reste très proche de celle de la CyPB lors de l'étape de chromatographie sur colonne Mono S. Un facteur de croissance basique pourrait donc être co-purifié avec la CyPB malgré la multiplicité des étapes de purification. Bien qu'il n'est pas encore été décrit dans le lait de Femme, il apparaît logique de penser au bFGF, car il est très basique (pI=9,5) et de petite taille (15-19 kDa). De plus, il faut rappeler que lors des premières purifications [Delmas (1988)], les anticorps anti-bFGF reconnaissaient la CyPB. Cette observation n'a pas été retrouvée lors des purifications suivantes de CyPB ou de CyPB recombinante. En comparant les effets mitogènes respectifs du bFGF et de la CyPB (CGF), on constate qu'une contamination de moins de 2% par un facteur de croissance de ce type suffit pour obtenir le même effet. L'utilisation de l'immunodétection plutôt que la

mesure de l'activité mitogène pour suivre l'élution de la CyPB permet certainement de recueillir des fractions de CyPB dépourvue d'activité facteur de croissance contaminante.

#### IV. Protocole de purification de la cyclophiline B

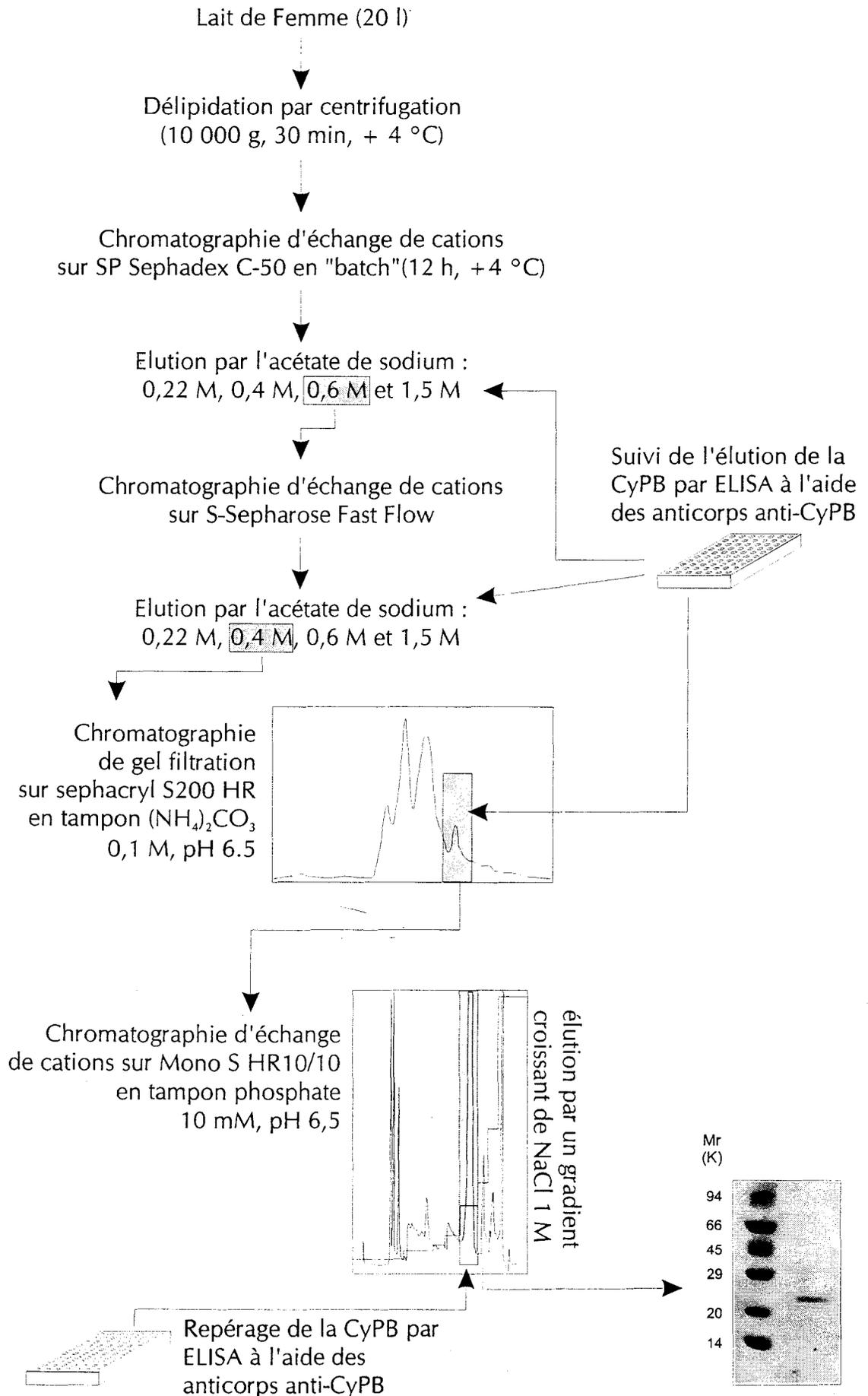
De nouveaux apports ont été faits au protocole publié de purification de la CyPB. Une méthode ELISA a été développée au laboratoire pour le dosage des CyP A et B [Allain *et al.* (1995)]. Elle sert au suivi de la purification de la CyPB. Un repérage précis de l'élution de la CyPB et l'optimisation des différentes étapes de chromatographie (utilisation de supports chromatographiques plus adaptés) a permis d'augmenter le rendement de la purification et ainsi de réduire considérablement la quantité de matériel initial (20l de lait au lieu de 60l). Les différentes étapes de la purification sont schématisées dans l'annexe 1. Dans les deux premières étapes de chromatographie d'échange de cations (SP Sephadex C50 et S-sepharose Fast Flow), l'élution est réalisée par des fractions discontinues d'acétate de sodium. Par contre, dans l'étape de gel filtration sur Sephacryl S200 HR (Annexe 2) et l'étape d'échange de cations sur Mono S HR 10/10 (Annexe 3), un repérage précis de l'élution de la CyPB est nécessaire. Il a pu être réalisé grâce à la méthode ELISA utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la séquence C-terminale de la CyPB. Nous avons ainsi pu isoler jusqu'à 75  $\mu\text{g}$  de CyPB par litre de lait contre 3 à 6  $\mu\text{g}$  pour les premières purifications. La CyPB a été dosée à environ 100  $\mu\text{g/l}$  dans le lait de Femme, ce qui nous donne un rendement de purification de 75 %. Le détail du protocole de purification et de la méthode ELISA est reporté dans l'annexe technique (p. 170).

#### V. Conclusion

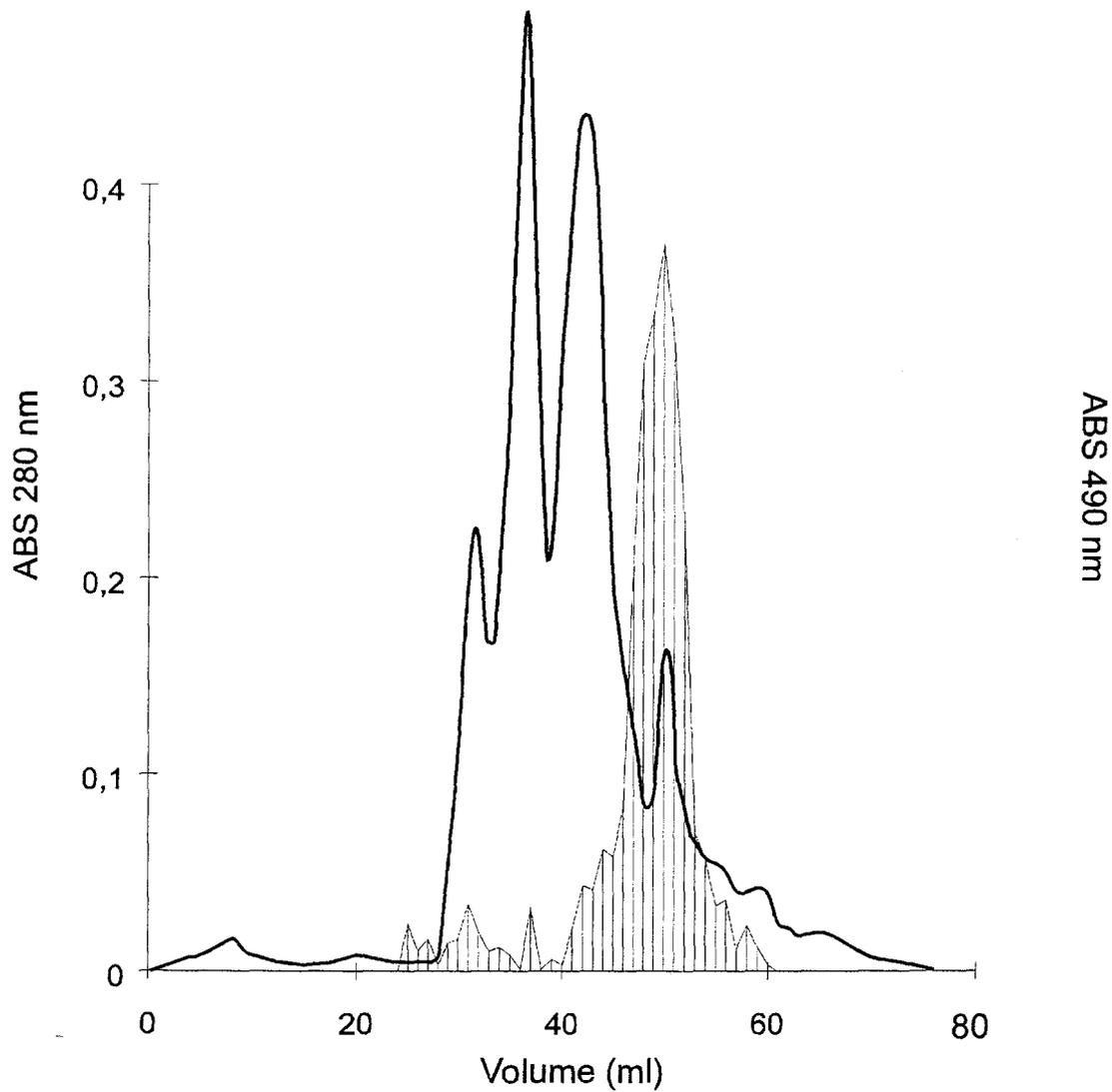
Le but de ce travail a été de purifier la CyPB à partir du lait de Femme. La CyPB est une protéine très basique ( $\text{pI} > 9,5$ ). L'utilisation de plusieurs étapes de chromatographies d'échange de cations a permis son isolement. La faible concentration de CyPB dans le lait (100 ng/ml) impose l'utilisation d'un grand volume de lait de Femme au départ (20 l). Il apparaît donc indispensable de trouver un moyen fiable et sensible pour suivre la CyPB au cours de la purification. Le développement de la méthode ELISA utilisant des anticorps dirigés contre les 15 résidus d'acides aminés C-terminaux de la CyPB a fourni un outil puissant pour la purification de cette protéine.

Les premiers travaux concernant la purification de la CyPB à partir du lait de Femme montraient une activité facteur de croissance de la CyPB vis à vis de fibroblastes [Delmas (1998)]. La technique d'immunodétection de la CyPB utilisée précédemment a permis d'obtenir une fraction purifiée spécifique dépourvue de toute activité mitogène. La CyPB recombinante exprimée chez *Escherichia coli* ne possède pas non plus d'activité mitogène. Cette activité préalablement observée est probablement liée à la co-purification d'une protéine à activité facteur de croissance avec la CyPB. Cependant, il est à noter que Caroni *et al.* (1991) ont montré une activité mitogène de la CyPB de poulet, exprimée par des cellules d'insectes, vis à vis de fibroblastes et de cellules cardiaques à des concentrations très élevées par rapport aux facteurs de croissance.

La présence de CyPB dans un fluide biologique n'est pas surprenante. Elle possède une séquence signal lui permettant de rejoindre la voie de sécrétion et, bien que sa localisation précise ne soit toujours pas clairement définie, son transit tout au long de la voie de sécrétion et sa sécrétion ont été décrits [Price *et al.* (1994); Smith *et al.* (1995)]. De plus, sa présence dans le sang, un autre fluide biologique, a également été signalée [Allain *et al.* (1995)]. Parallèlement, il a été montré que la CyPB pouvait aussi avoir une localisation intracellulaire définie dans des vésicules dérivés du réticulum endoplasmique [Arber *et al.* (1992); Bram et Crabtree (1994)]. La suite de ce travail de purification consiste donc en la caractérisation de la forme sécrétée de la CyPB.



Annexe 1 : Protocole de purification de la cyclophiline B à partir du lait de Femme



**Annexe 2 :** Chromatographie de gel filtration sur Sephacryl S200 HR (100 cm x 5 cm) de la fraction éluée à 0,6M en acétate de sodium de la chromatographie d'échange de cations sur S-Sepharose Fast Flow. L'élution des protéines est suivie à 280 nm (trait plein). L'élution de la CyPB est suivie à 490 nm par méthode ELISA à l'aide des anticorps dirigés contre la partie C-terminale de la CyPB (histogramme).

**Etude de la forme sécrétée  
de la cyclophiline B**

---

## I. Introduction

L'isolement de la CyPB à partir du lait de Femme nous a montré que cette protéine, ou tout au moins une fraction, pouvait être sécrétée dans le milieu extracellulaire. Les différents travaux se rapportant à la localisation de la CyPB montrent que celle-ci peut être multiple. D'une part, les travaux de Arber *et al.* (1992), confortés par ceux de Bram et Crabtree (1994), indiquent que la CyPB est séquestrée à l'intérieur de la cellule dans les calciosomes, des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique et s'accumulant autour du noyau. Mais d'un autre côté, la CyPB est montrée comme une protéine suivant la voie de sécrétion [Price *et al.* (1994); Smith *et al.* (1995)] jusqu'à sa sécrétion dans le milieu extracellulaire [Caroni *et al.* (1991); Spik *et al.* (1991); Price *et al.* (1994)].

Parallèlement, certaines propriétés de la CyPB nécessitent sa sécrétion. Par exemple, la CyPB de poulet possède une activité facteur de croissance pour les fibroblastes [Caroni *et al.* (1991)]. Mais surtout, c'est la présence d'un récepteur spécifique de la CyPB à la surface des lymphocytes T [Allain *et al.* (1994)] qui justifie le mieux l'existence d'une forme sécrétée de la CyPB.

Afin de mieux comprendre quelles sont les particularités de la forme sécrétée dans le lait, nous avons cherché à caractériser les propriétés structurales de cette forme sécrétée. Nous avons également comparé les propriétés de fixation au récepteur de la CyPB de cette forme sécrétée avec celles de la CyPB recombinante qui avait jusque là servi à mettre en évidence le récepteur. Ces résultats ont donné lieu à la publication suivante :

## II. Résultats

### **Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form**

**Christophe Mariller, Fabrice Allain, Mostafa Kouach  
and Geneviève Spik**

**1995 *Biochem. Biophys. Acta*, sous presse**

## **Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form**

Christophe Mariller<sup>a</sup>, Fabrice Allain<sup>a</sup>, Mostapha Kouach<sup>b</sup> and Geneviève Spik<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, (France)*

<sup>b</sup>*Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse, Faculté de Médecine, 59045 Lille Cedex, (France)*

Correspondence: G. Spik, Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tel: (33) 20.43.41.55; Fax: (33) 20.43.65.55

Key words: cyclophilin, cyclosporin A, secretion

## Abstract

Cyclophilin B (CyPB) is a member of the cyclophilin family (cyclosporin A-binding proteins) with specific N-terminal and C-terminal extensions. In contrast to cyclophilin A, CyPB owns a signal sequence leading to its translocation in the endoplasmic reticulum. CyPB was reported to be present in human blood and milk, suggesting it is secreted. For this purpose, CyPB was purified to homogeneity from human milk and compared to recombinant CyPB expressed in *E. coli*. Ion spray mass spectrometry revealed that CyPB secreted in human milk exhibits a lower molecular mass than the one expected. Identification of phenylalanine as the C-terminus amino acid residue of human milk CyPB indicates that the difference in molecular mass may be explained by the absence of the five C-terminal amino acid residues AIAKE. These results suggest that in the sequence VEKPF AIAKE known to be responsible for retention of CyPB in the endoplasmic reticulum, the sequence AIAKE is more particularly necessary. Our findings raise the possibility that the CyPB may be processed to promote its release. As recombinant CyPB was shown to bind specifically to Jurkat cells, a lymphoblastic T-cell line, we then wanted to investigate the binding of human milk CyPB to these cells. Despite lacking the five C-terminal amino acids residues, human milk CyPB is able to inhibit the binding of recombinant CyPB to Jurkat T cells.

**Abbreviations:** BSA, bovine serum albumin; CAML, calcium-signal modulated cyclophilin ligand; CsA, cyclosporin A; CyPA, cyclophilin A; CyPB, cyclophilin B; rCyPB, recombinant cyclophilin B; CyPC, cyclophilin C; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; ER, endoplasmic reticulum; FAPP, furanacroyl-Phe-Phe; HPLC, high pressure liquid chromatography; OPT, *o*-phthaldialdehyde.

## 1.Introduction

The cis-trans isomerization of prolyl peptides is a rate-limiting step in protein folding. An enzyme which catalyzes the rate-limiting proline isomerization has been originally detected in cytoplasmic extracts of porcine kidney [1] and called peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. The sequencing of this enzyme has revealed it to be identical to cyclophilin, the major binding protein for cyclosporin A (CsA) [2, 3]. CsA is a cyclic undecapeptide that has been widely used to prevent allograft rejection. CsA causes immunosuppression by forming a complex with cyclophilin that inhibits calcineurin, a phosphatase essential for T-cell activation [4, 5]. The proteins of the cyclophilin family contain a conserved core domain flanked by variable N- and C-termini [6] that presumably encode subcellular targeting information. While cyclophilin A (CyPA) is a major protein of the cytoplasm, human cyclophilins B and C (CyPB and CyPC) mRNA's encode a cleavable endoplasmic reticulum signal that directs the protein to the secretory pathway [4, 7-10]. A fourth cyclophilin, cyclophilin D with a targeting signal to the mitochondria has also been described [11]. The existence of a C-terminal signal preventing secretion of endoplasmic reticulum (ER) proteins has been highlighted [12] with the discovery of the KDEL signal. Arber et al. [8] have then reported that CyPB is retained in the cell and that the conserved CyPB-specific sequence VEKPF~~A~~I~~A~~KE directs CyPB to specialized portions of the ER. The addition of this sequence to the C-terminus of the secretory protein glia-derived nexin leads to its co-location with the retained CyPB [8]. Moreover, a protein termed calcium-signal modulated cyclophilin ligand (CAML) was identified [13], this protein binds to CyPB and is located in vesicle-like structures scattered throughout the cytoplasm, similar to those observed [8] for CyPB subcellular location. Recently, CyPB has also been described in human milk [9] and in human plasma [14]. Otherwise, Price et al. [15] mentioned a slow rate secretion of CyPB enhanced by CsA.

In this work, we have demonstrated that CyPB secreted in human milk lacks five C-terminal amino acid residues. These five amino acids belong to the sequence VEKPF~~A~~I~~A~~KE described as CyPB retention signal. Therefore, these five amino acids could be necessary for the retention and the secretion of CyPB could result in their absence.

Recently, recombinant CyPB (rCyPB) was shown to bind specifically to Jurkat human T-cells and human peripheral blood lymphocytes, to be internalized and subsequently degraded in the cell [16]. We have investigated the properties of the truncated form of CyPB to Jurkat T cells by competitive assay and demonstrated that despite the absence of the five C-terminus amino acids, it inhibits the binding of rCyPB to Jurkat cells..

## 2. Materials and methods

### 2.1 Materials

PCGF-72 plasmid coding for human CyPB was a generous gift from SANDOZ (Basel, Switzerland). Antibodies to whole CyPB were raised in the rabbit as previously described by Allain et al.[14]. Sephacryl S-200 HR, SP-Sephadex C-50 were purchased from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Furanacroyl-Phe-Phe (FAPP) and Bz-Gly-Arg were from Bale Biochimie (Voisins-Le-Bretonneux, France). *N*-acetyl-L-cysteine was from Sigma Co (St Louis, USA). *O*-phthaldialdehyde was from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). The DIG glycan detection kit was purchased from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany).

### 2.2 Purification of human milk CyPB and human recombinant CyPB

CyPB was purified from human milk as previously described [9] modified as follows. Human milk was obtained from a milk bank pool and stored frozen. Thawed human milk (20 liters) was defatted by centrifugation (10,000 x g for 30 min). Skim milk was stirred overnight with 30g of SP-Sephadex C-50. The resin was eluted with increased concentration sodium acetate solutions (0.22, 0.3, 0.6 and 3 M). The 0.6 M sodium acetate fraction was loaded on a S-Sepharose Fast Flow column (5 cm x 10 cm) and eluted with solutions containing 0.22, 0.4, 0.6 and 1.5 M sodium acetate. From there on, purification was monitored by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using a polyclonal antiserum against the whole CyPB [14]. The immunoreactive fraction eluted with 0.4 M sodium acetate was applied to a Sephacryl S-200 HR column (100 cm x 3.5 cm) equilibrated and eluted with 0.1 M ammonium bicarbonate. Immunoreactive fractions were pooled and dialyzed against 20 mM sodium phosphate, (pH 6.5). Final purification step was performed on a fast protein liquid chromatography Mono S HR 10/10 column (Pharmacia).

Purification of human rCyPB was performed as previously described [9] using the ELISA method to monitor the elution of CyPB.

### 2.3 Protein analysis

SDS-PAGE was performed using the Pharmacia Phast-Gel system and preformed 8-25% and 10-15% polyacrylamide gradients gels. Amino acids sequence analysis of human milk CyPB was carried out by automated degradation using an Applied BioSystem 470A sequencer equipped with a model 120A on-line phenylthiohydantoin analyser. Amino acids compositions were established using the assay described in [19]. Free amino acids from rCyPB and human milk CyPB released by acidic hydrolysis were derivatized with PITC and separated on a Pico Tag™ Waters column using a 8100 Spectra Physics HPLC system.

Determination of proteolytic activities in human milk were also performed. Furanacroyl-Phe-Phe (substrate for carboxypeptidase A) hydrolysis was assayed out [17]. Bz-Gly-Arg was used to assay carboxypeptidase B and N activities [18]. Assays were carried out using a Cary Model 219 spectrophotometer.

The molecular model of CyPB was built from crystallographic data using the program Insight II (Biosym, USA) on an Indigo Silicon Graphics system at the CRESIMM (Centre de Recherche en Simulation et Modélisation Moléculaire, Université des Sciences et Technologies de Lille).

### 2.4 Determination of the C-terminus amino acid residue of human milk CyPB

The C-terminus of human milk CyPB and human rCyPB (50 $\mu$ g) were digested with bovine carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1) at substrate to enzyme ratio of 20:1 (w/w) at 37°C in Tris 50 mM, (pH 8.0), buffer for 4 and 8h respectively. Derivatization of amino acids with *o*-phthaldialdehyde (OPT)/*N*-acetyl-L-cysteine was based on the methods described in [20, 21]. OPT was dissolved in methanol to a concentration of 0.4 M. One volume of this solution was mixed with nine volumes of 0.4 M sodium borate buffer (pH 9.5), and *N*-acetyl-L-cysteine was added to a final concentration of 4 mM. 40  $\mu$ l of the OPT/ *N*-acetyl-L-cysteine reagent was mixed ( $t=0$  sec) with 10  $\mu$ l of sample containing 150-250 pmoles of individual amino acids. Derivatized amino acids were separated by reverse phase chromatography on a Beckman 5  $\mu$ m octadecyl silica C<sub>18</sub> column using a 8700 Spectra Physics HPLC system. The sample was loaded onto the column at  $t=120$  sec.

### 2.5 Surface binding assay of $^{125}\text{I}$ -CyPB

Jurkat cell line, a human lymphoblastic cell line, was obtained from the Institut Pasteur (Lille, France). Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Inc.) containing 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , gentamycin (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (pH 7.3), supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum. Culture was diluted every 2 days, in order to maintain cell concentration from 0.5 to  $1 \times 10^6$  cells/ml.  $^{125}\text{I}$ -CyPB was obtained by incubating 100  $\mu\text{g}$  of protein with 0.3 mCi of carrier-free  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (ICN Biochemicals, Costa Mesa, USA) in presence of 100  $\mu\text{g}$  of Iodo-Gen (Pierce, Rockford, USA) for 15 min at room temperature. Free iodine was removed by gel filtration on a Sephadex G-25 PD-10 column. The specific radioactivity ranged over  $2\text{-}3 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{g}$ . Cells were washed twice and diluted in DPBS-BSA to a final concentration of  $4 \times 10^6$  cells/ml. Specificity of human milk CyPB binding was studied by incubating cells ( $2 \times 10^6$  cells/sample) with 25 mM  $^{125}\text{I}$ -CyPB and molar excess of human milk CyPB for 1 h at 4 °C. After incubation, cells were centrifuged (400 x g, 5 min) and washed three times with 3 ml of cold DPBS. Cell-associated radioactivity was measured using a model 1282 Compugamma LKB-Wallac counter.

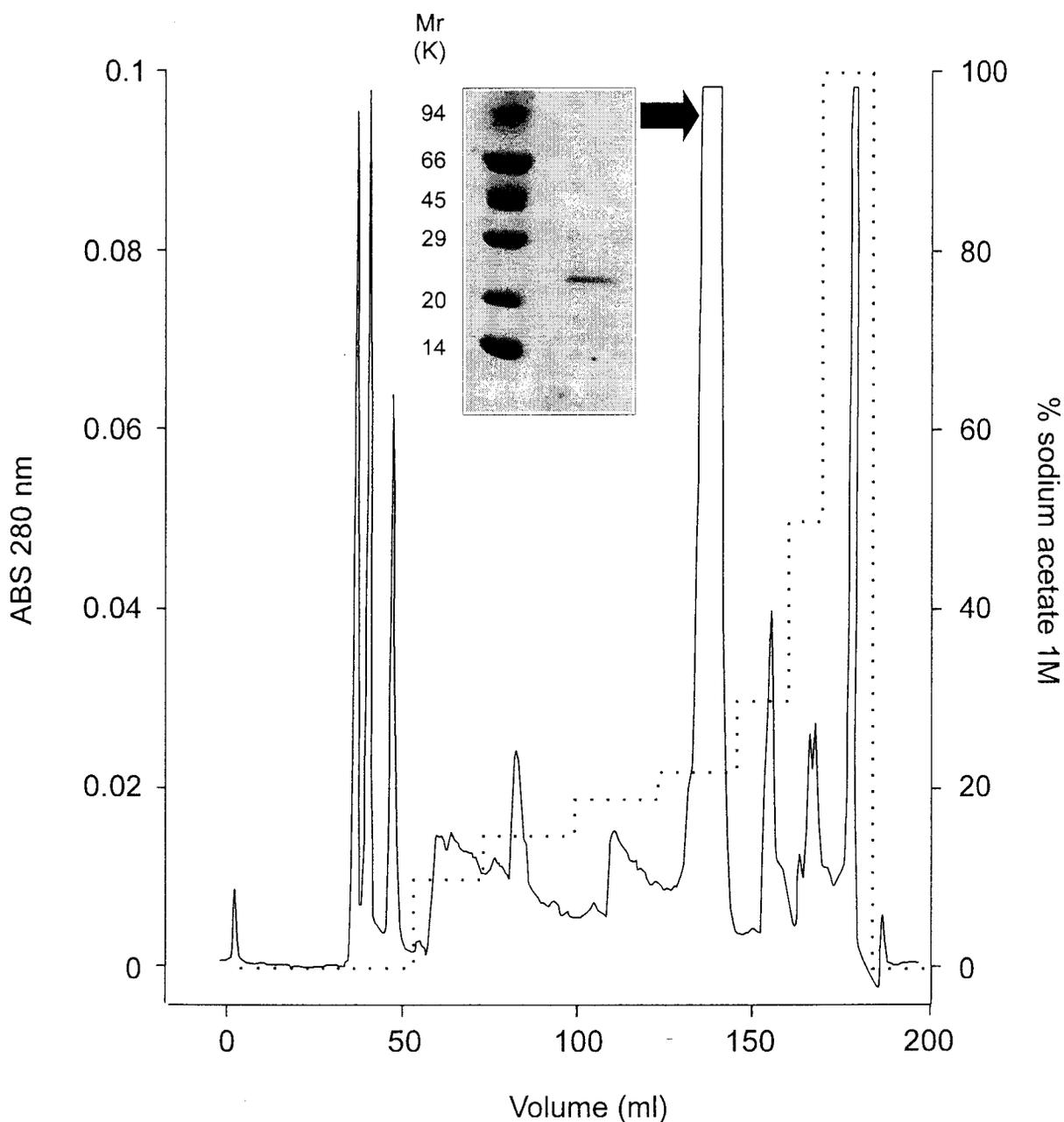
### 2.6 Ion spray mass spectrometry

Samples were dissolved in acetonitrile 20% in water,  $\text{HCOOH}$  0.1% (20 pmol/ $\mu\text{l}$ ). Ion spray mass spectra were recorded on a simple-quadrupole mass spectrometer API I (Perkin-Elmer Sciex) equipped with an ion-spray (nebulizer-assisted electrospray) source (Sciex, Toronto, Canada) [22]. The solutions were continuously infused with a medical infusion pump (Model 11, Harvard Apparatus, South Natick, USA) at a flow rate of 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Poly Propylen Glycol (PPG) was used to calibrate the quadrupole. Ion spray mass spectra were acquired at unit resolution by scanning from  $m/z$  400 to 1400 with a step size of 0.1 Da and a dwell time of 2 ms. The potential of the spray needle was held at +5 kV. Spectra were recorded at an orifice voltage of +60 V. The computer program was Mac Biospec for the calculation of the samples molecular masses.

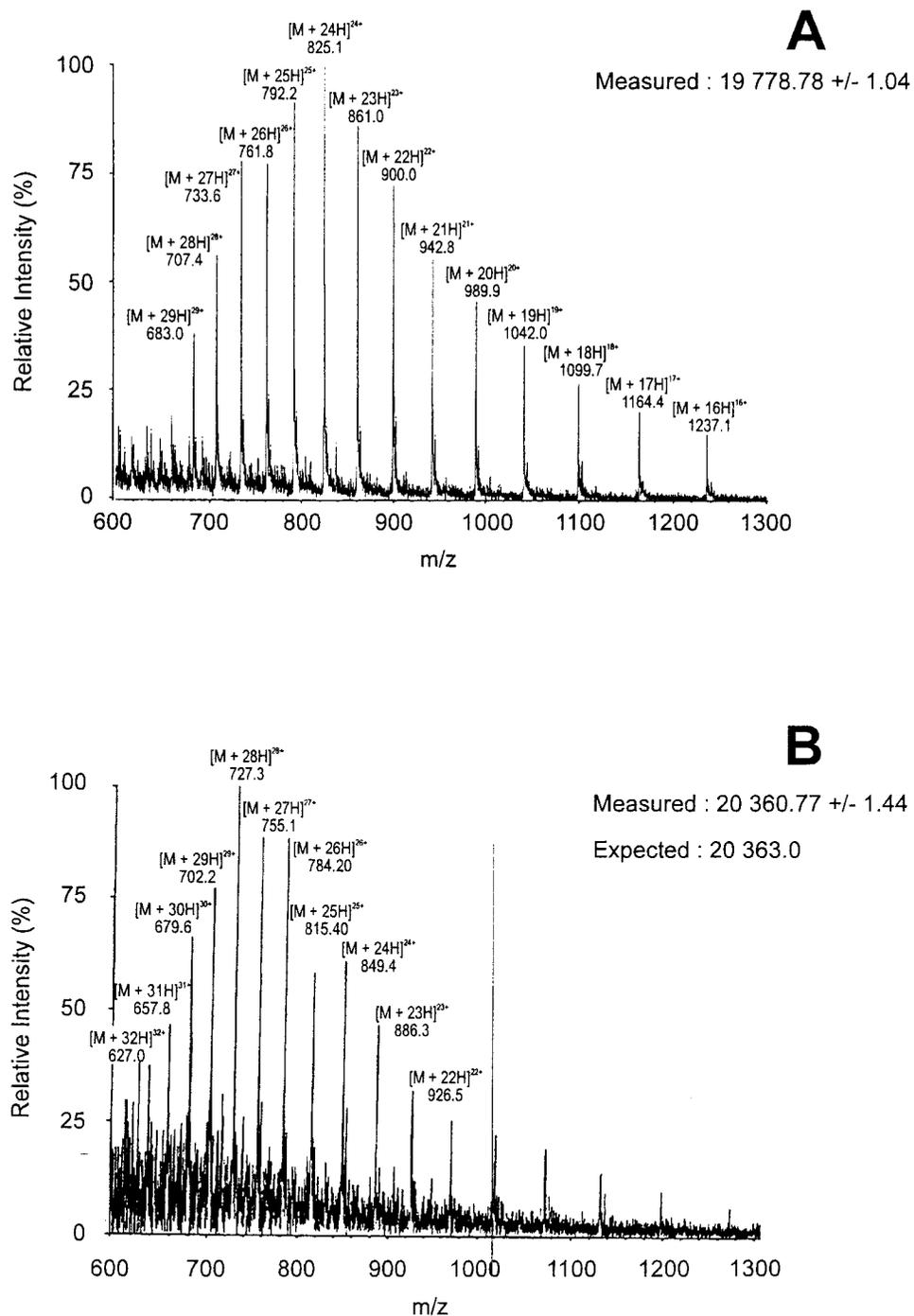
### 3. Results and discussion

CyPB was purified from human milk using a four step protocol. Large volumes of human milk were initially processed via batch chromatography using SP-Sephadex C-50. The second step of the purification was then performed using Fast Flow S-Sepharose to yield a single immunoreactive fraction. This fraction was then purified by gel filtration on a Sephacryl S-200 followed by cation-exchange chromatography on a Mono S column. The enzyme-linked immunosorbent assay previously described [14] was used to monitor CyPB throughout the four stages of the procedure. A single active fraction containing a homogeneous 21 kDa protein was obtained on a 10-15% polyacrylamide gradient gel (Fig. 1) and the recovery of CyPB from 20 l of pooled human milk was found to be 1.2 mg.

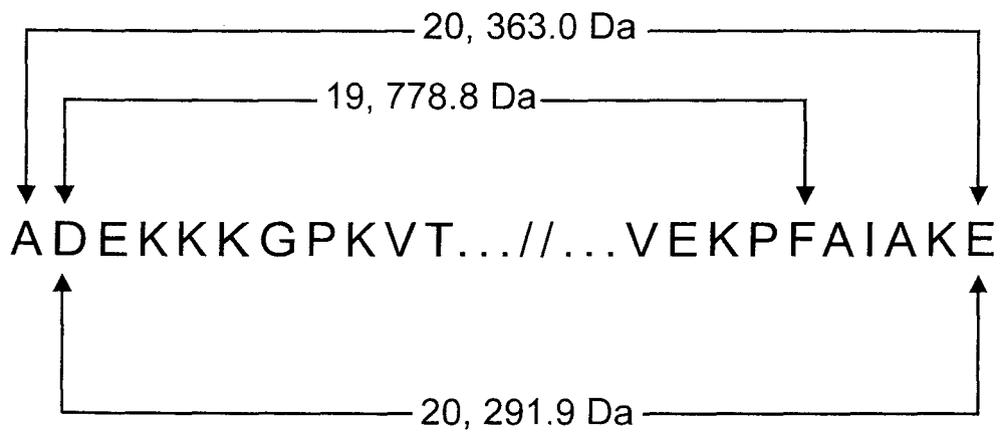
Partial N-terminal amino acid sequencing of the human milk CyPB indicated that the protein has the sequence DEKKK previously described for native CyPB [10]. Ion spray mass spectrometry allows very precise molecular mass measurements and was used to display potential post-translational modifications [23]. The ion spray mass spectra of human milk CyPB and rCyPB are given in Fig. 2. The human milk CyPB has a mass of 19,778.78 +/- 1.04 Da. This value is considerably lower than rCyPB's observed at 20,360.77 +/- 1.44 Da (theoretical value: 20,363.0). It should be noted that rCyPB and native CyPB differ in their N-terminal extremity. To obtain rCyPB without any amino acid participating to the signal peptide, the expression must start with the ADEKKK sequence. Unlike the rCyPB, the native CyPB starts with an aspartic acid residue after removal of the signal peptide. Therefore, the predicted masses for these two cyclophilins are shifted by 71.1 Da (Fig. 3). The difference of 581.99 Da observed between human milk CyPB and rCyPB could be interpreted as the absence of the five C-terminal amino acids (AIAKE) (Fig. 3) in addition to the absence of the N-terminal aspartic residue shown by the partial sequencing. Despite the presence of one potential N-glycosylation site (amino acids positions 116-118), human milk CyPB does not seem to contain a glycan moiety as demonstrated by the molecular mass differences shown by mass spectrometry. Detection of sugars was also performed by use of a DIG glycan detection kit based on the covalent binding of digoxigenin to oxidated



**Figure 1** : Elution of the CyPB on a fast protein liquid chromatography Mono S HR 10/10 column equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer, (pH 6.5). The column was eluted at a flow rate of 1ml/min using a discontinuous NaCl gradient (dotted line) (0-1M). The elution profile was monitored at 280 nm (solid line). The arrow indicates the fraction containing a single 21 kDa protein as demonstrated in the 10-15% polyacrylamide gradient gel



**Figure 2 :** Ion spray mass spectra of human milk CyPB (A) and rCyPB (B). The full scan spectra were displayed as relative signal intensity vs. mass/charge ( $m/z$ ). The charge states  $16^+$  to  $32^+$  are indicated in exponent. For each spectrum, one series of multiply charged ions (from 16 to 29 charges for human milk CyPB and 22 to 32 charges for rCyPB) is detected.



**Figure 3 :** Predicted masses of rCyPB (20, 363.0 Da), native CyPB (20, 291.9 Da) and a secreted CyPB lacking the 5 C-terminal amino acids (19, 778.8 Da).

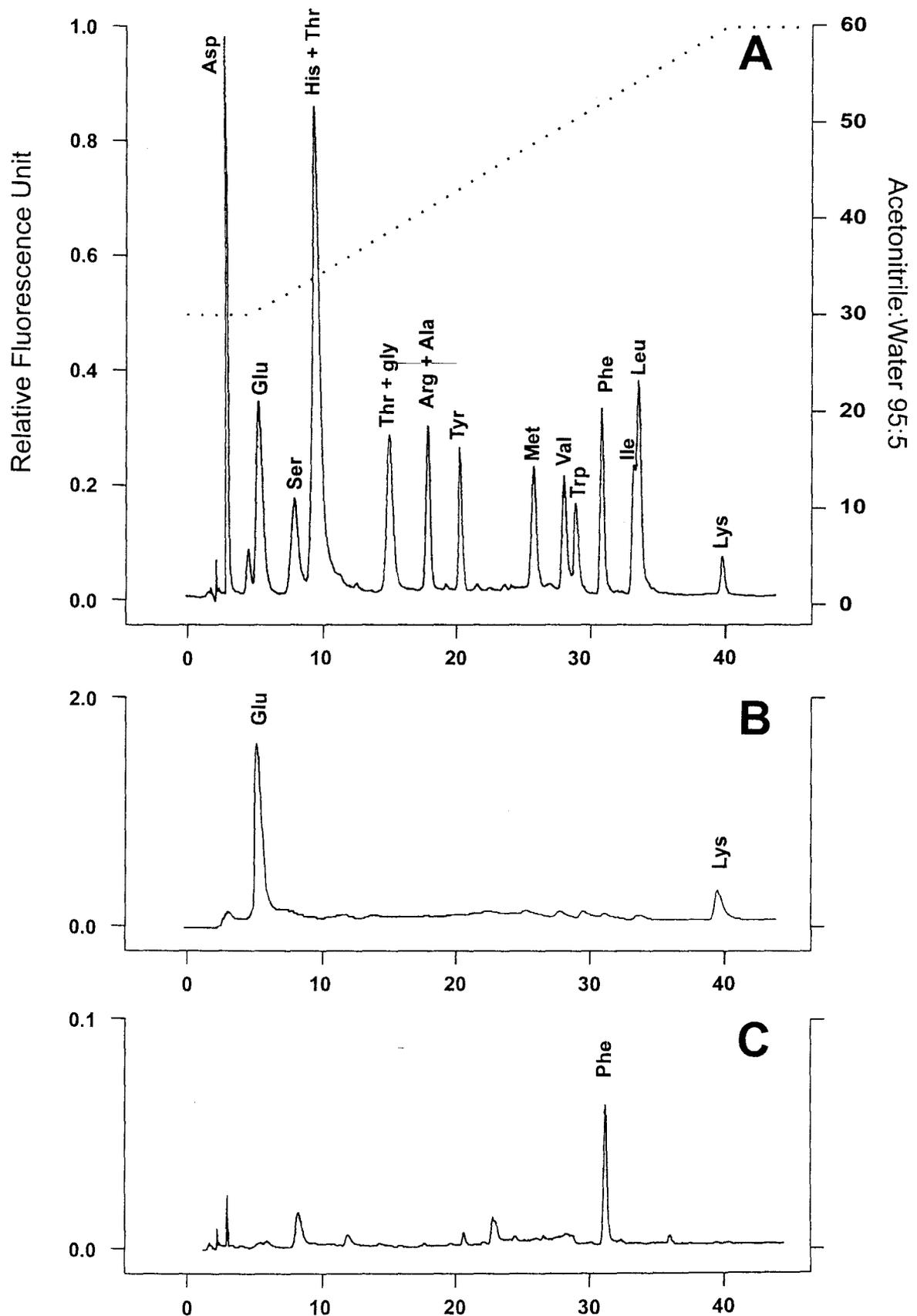
sugars and detection by anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate. No glycosylation of human milk CyPB was demonstrated by this way (data not shown).

The hypothesis that human milk CyPB lacking the last five C-terminal amino acid residues is supported by the amino acid analysis (Table I). Indeed recombinant and human milk CyPB amino acid compositions differ slightly, notably as regard alanine. Human milk CyPB exhibits 6 alanine residues per molecule instead of 9 in recombinant cyclophilin. Differences in the levels of isoleucine and glutamine/glutamic acid also support, although a lesser extent, the hypothesis of a human milk CyPB lacking the sequence AIAKE. Release of the C-terminus amino acid residue of human milk CyPB was performed using carboxypeptidase A. Optimal conditions combined with a very sensitive method for detecting amino acid residues using *o*-phthaldialdehyde/*N*-acetyl-L-cysteine as derivatization agent were employed to observe the release of the C-terminus residue. After 8 h of hydrolysis, a single peak corresponding to Phe was observed on the chromatogram (Fig. 4). By comparison with known standards, the level of phenylalanine was calculated at 40-50 pmoles, representing less than 2% of hydrolysis of human milk CyPB. Despite the presence of a proline in the penultimate position, carboxypeptidase A is able to cleave the C-terminus amino acid residue albeit at a very slow rate [24,25]. Release of the C-terminal residue was performed for rCyPB under the same conditions as for human milk CyPB. Glycine and lysine were the amino acids released after 4h of hydrolysis. This indicates strongly that the C-terminus amino acid residue of human milk CyPB is different from that of rCyPB.

To determine whether the truncated form of CyPB does or does not result from a proteolytic cleavage, FAPP and Bz-Gly-Arg were used to assay carboxypeptidases A, B and N activities in pooled human milk. However no significant degradation of these substrates was observed. Consequently human milk CyPB does not seem to be the resultant product of a proteolytic degradation. Moreover, the purification of a single form of CyPB was not consistent with the idea of a proteolytic degradation of the C-terminus by proteases.

**Tableau 6 :** Amino acid compositions of recombinant human CyPB and human milk CyPB

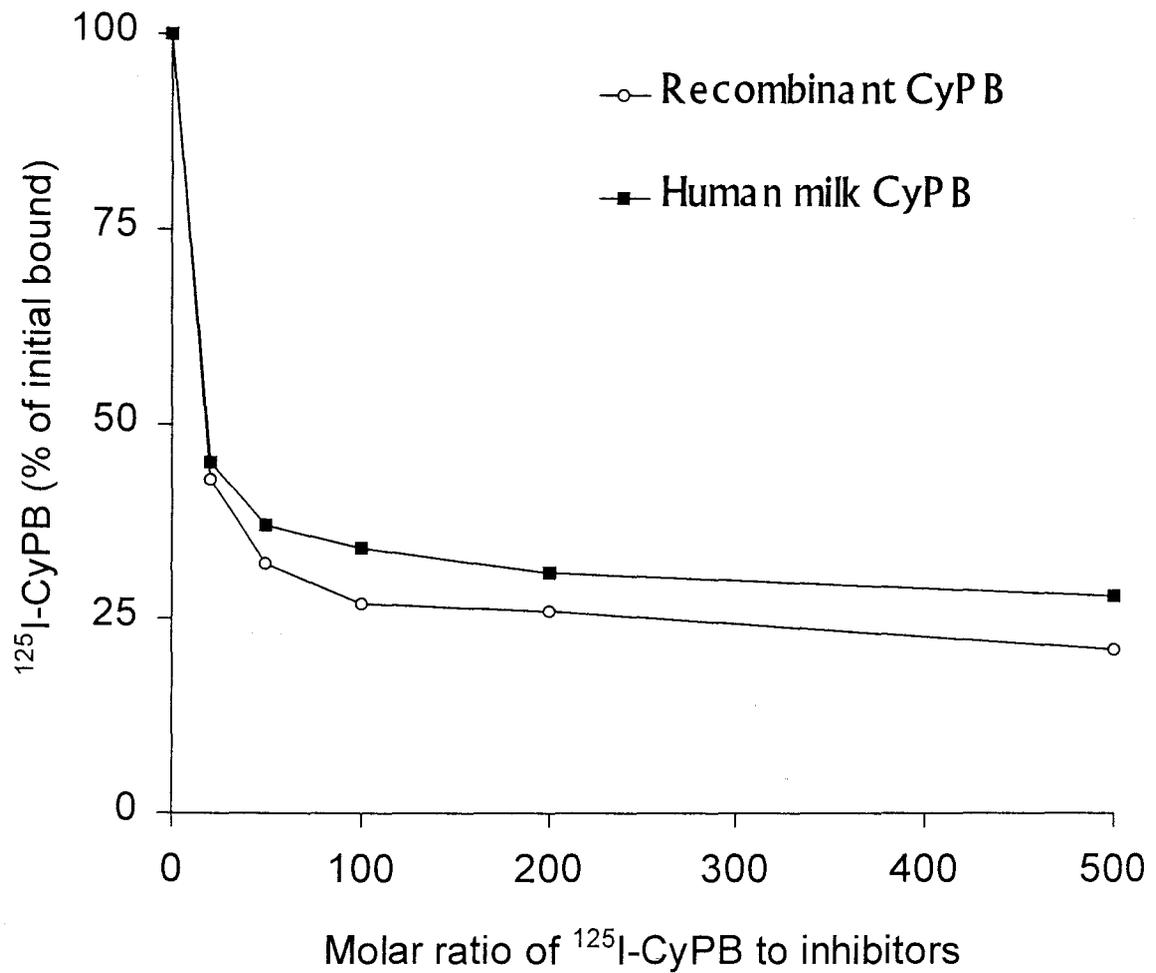
Amino acids	Recombinant Human CyPB		Human Milk CyPB	
	Determined residues/mol	Expected residues/mol	Determined residues/mol	Expected residues/mol
Asx	19,7	20	19,8	20
Thr	12,2	12	11,5	12
Ser	5,6	6	5,7	6
Glx	13,9	13	12,5	12
Pro	5,8	6	6,4	6
Gly	22,7	23	22,9	23
Ala	9,3	9	5,8	6
Val	19,6	19	19,4	19
Met	2,7	3	3,3	3
Ile	9,8	10	8,9	9
Leu	7,7	7	7,3	7
Tyr	3,8	4	4,2	4
Phe	14,1	14	15,0	14
Lys	25,8	25	25,1	24
His	2,6	3	2,7	3
Cys	0,1	1	0,2	1



**Figure 4 :** Elution profile of OPT derivatives of amino acids. Reverse phase liquid chromatography was performed on a Beckman 5  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> column (250 x 4.6mm i.d.). (A) amino acids standards (250 pmoles each). (B) result of the human rCyPB digestion by carboxypeptidase A (C) result of the human milk CyPB digestion by carboxypeptidase A. The gradient (dotted line) was formed between water [TFA 0.1%] and acetonitrile/water [95:5; TFA 0.08%]. The flow rate was 1 ml/min.

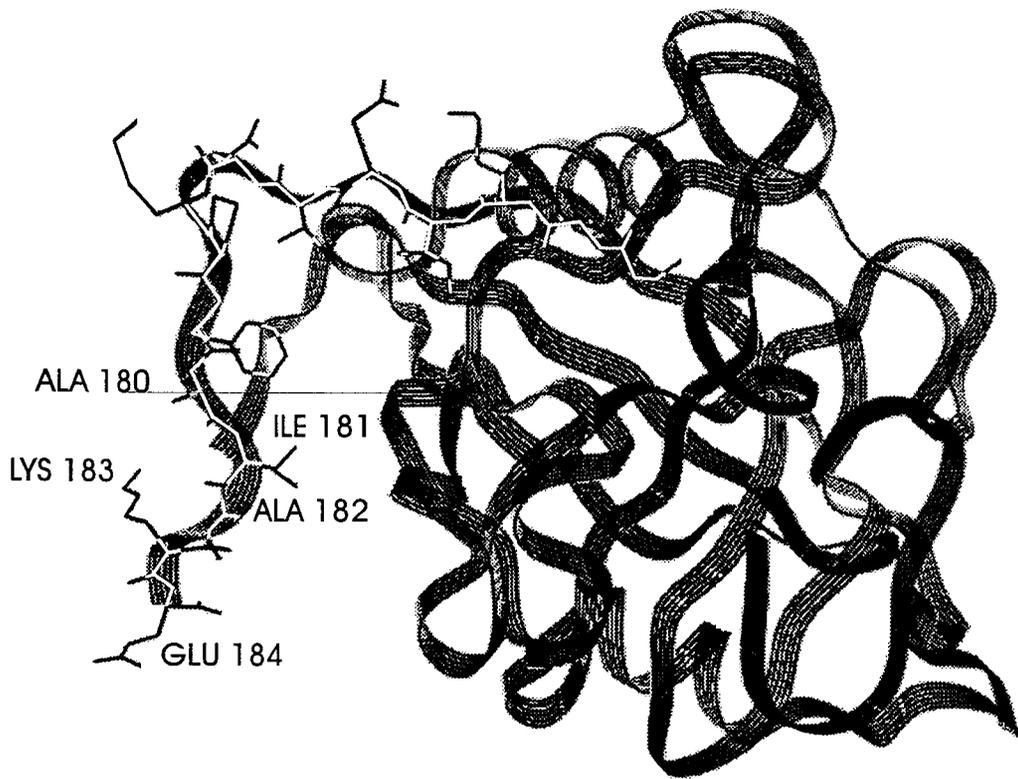
The study of the binding parameters of CyPB to Jurkat T cells were first carried out using rCyPB [16]. We then wish to determine whether the truncated CyPB secreted in human milk is able to interact specifically with target cells in milk or blood. The specificity of CyPB binding was examined by competitive binding to Jurkat T-cells (Fig. 5). Cells were incubated with recombinant  $^{125}\text{I}$ -CyPB in the presence of unlabeled rCyPB or human milk CyPB.  $^{125}\text{I}$ -CyPB binding was specifically inhibited up to 85% in the presence of 20 to 500 molar excess of unlabeled human milk CyPB. The level of inhibition observed was the same as that observed with rCyPB, suggesting that there is no differences between them. The molecular model of rCyPB, shown in Fig. 6, was built up using its crystallographic data[26]. CypB shares the same  $\beta$  barrel structure as CyPA but the N- and C-termini ends of CyPB are aggregated and point away from the molecular bulk. Furthermore, the extra C-terminus of CyPB extends to outside of the barrel and may serve as a sequence to interact with components of the ER membrane.

The C-terminus sequence VEKPF~~A~~I~~A~~KE has been proposed as a retention signal for CyPB in an ER compartment, leading to a co-location with the soluble  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein calreticulin [8]. Bram and Crabtree [13] have suggested that CAML may bind to CyPB in a subspecialized region of the ER known as calciosome. As proposed by these authors, the binding of CyPB to the CAML may regulate intracellular calcium release or generate the signal responsible for opening the plasma membrane calcium channels. The absence of five C-terminal amino acid residues in the secreted CyPB of human milk suggests that the retention signal of CyPB may be restricted to the C-terminal tail AIAKE and if this signal is responsible for the protein targeting to vesicular ER-like structures [8], the lack of this small sequence may result in the secretion of CyPB. The AIAKE sequence could be removed by a specific peptidase within the ER or a sub-ER compartment which promote the secretion of CyPB. This mechanism may explain the existence of intracellular targets like CAML [13] as well as extracellular targets like specific receptors on lymphocytes [16] for CyPB. This sequence is not involved in the specific binding of CyPB to Jurkat T-cells, since, as we have previously stated, the human milk CyPB retains its ability to inhibit the binding of rCyPB. This is consistent with the hypothesis with regard



**Figure 5** : Cold ligand competition for binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat cells. Competitive binding experiments were performed by incubating cells in presence of 25 nM of  $^{125}\text{I}$ -CyPB and molar excess of unlabeled rCyPB (O) or human milk CyPB (■).

to the nature of CyPB secretion in milk or blood and the means by which it should interact with specific receptors on target cells. From this point of view, the hypothesis of a dual targeting of CyPB differs from the KDEL system by the switch between secretion and retention. Our data led to a novel conclusion about the possible mechanism of distribution throughout the intracellular organelle network. A good extent of this work would be to demonstrate that a CyPB construct lacking the residues AIAKE is not retained intracellularly in transfected cells.



**Figure 6 :** Model of the rCyPB illustrating the C-terminus extension. The protein is shown as a ribbon diagram. The 15 C-terminus residues are superimposed as a wireframe. The five amino acid residues lacking in the human milk CyPB are labeled from Ala 180 to Glu 184.

## Acknowledgements

This investigation was supported in part by CNRS Unité Mixte de Recherche n°111 (Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires; Director: Pr A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille, and by grants from the European Economic Community (Biomed Program Contract BMH1-CT93-1748).

We wish thank Dr. G. Briand for mass spectrometry analysis and C. Brassart for amino acid compositions. We also thank Dr. V. Mikol for the atomic coordinates of CyPB and Pr G. Vergoten for his skilful help in molecular modelling.

## References

- 1 Fischer, G., Bang, H. and Mech, C. (1984) *Biomed. Biochim. Acta* 43, 1101-1111.
- 2 Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F.X. (1989) *Nature* 337, 476-478.
- 3 Takahashi, N., Hayano, T. and Suzuki, M. (1989) *Nature* 337, 473-475.
- 4 Friedman, J. and Weissman, I. (1991) *Cell* 66, 799-806.
- 5 Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S.L. (1991) *Cell* 66, 807-815.
- 6 Gething, M.J. and Sambrook, J. (1992) *Nature* 355, 33-45.
- 7 Hasel, K.W., Glass, J.R. Godbout, M. and Sutcliffe, J.G. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 3484-3491.
- 8 Arber, S., Krause, K.H. and Caroni, P. (1992) *J. Cell. Biol.* 116, 113-125.
- 9 Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., Stedman, K., Kocher, H.P., Keller, R., Hiestand, H.P., and Movva, N.R. (1991) *J. Biol. Chem* 266, 10735-10738.
- 10 Price, E.R., Zydowsky, L.D., Jin, M., Baker, C.H., McKeon, F.D. and Walsh, C.T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1903-1907.
- 11 Inoue, T., Yoshida, Y., Isaka, Y. and Tagawa, K. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 857-863.
- 12 Munro, S. and Pehlam, H.R.B. (1987) *Cell* 48, 899-907.
- 13 Bram, J.B. and Crabtree, G.R. (1994) *Nature* 371, 355-358.
- 14 Allain, F., Boutillon, C., Mariller, C. and Spik, G. (1994) *J. Immunol. Meth.* 178, 113-120.
- 15 Price, E.R., Mingjie, M., Lim, D., Pati, S., Walsh, C.T. and McKeon, F.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3931-3935.
- 16 Allain, F., Denys, A. and Spik, G. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 16537-16540.

- 17 Peterson, L.M., Holmquist, B. and Bethune, J.L. (1982) *Anal. Biochem.* 125, 420-426.
- 18 McKay, T.J., Phelan, A.W. and Plummer, T.H. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 487-492.
- 19 Blidingmeyer, B.A., Cohen, S.A. and Tarvis, T.L. (1984) *J. Chromatog.* 336, 93-104.
- 20 Burbach, J.P.H., Prins, A., Lebrouille, L.M., Verhoef, J. and Witter, A. (1982) *J. Chromatog.* 237, 339-343.
- 21 Fujiwara, M., Ishida, Y., Nimura, N., Toyama, A. and Kinoshita, T. (1987) *Anal. Biochem.* 166, 72-78.
- 22 Covey, T.R., Bonner, R.F., Shushan, B.I. and Henion, J.D. (1988) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 249-256
- 23 Kouach, M. Belaïche, D. Jacquinod, M., Couppez, M., Kmiecik, D., Ricart, G., van Dorsselaer A., Sautière, P. and Briand, G. (1994) *Biol. Mass Spectrom.* 23, 283-294
- 24 Ambler, R.P. (1972) in *Methods in Enzymology* (Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., eds.), Vol. 25, pp.143-154, Academic Press, New York.
- 25 Harris, J.I. and Li, C.H. J. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 499-506.
- 26 Mikol, V., Kallen, J. and Walkinshaw, M.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5183-5186.

### III. Conclusion

La spectrométrie de masse en mode electrospray est un outil d'investigation des protéines très puissant. Elle nous a permis de montrer l'absence de l'extrémité C-terminale de la forme sécrétée de la CyPB. Par contre, cette protéine ne possède pas d'autres caractéristiques que on retrouve chez les protéines sécrétées comme la présence de ponts disulfures (la CyPB ne possède qu'un seul résidu de cystéine) ou de glycanne bien qu'elle présente une séquence glycosylable en position 116-118.

De nombres séquences conduisant à la rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi ou des vésicules ont déjà été décrites. C'est ainsi que la présence en position C-terminale de la séquence KDEL (ou d'une séquence apparentée) provoque la rétention des protéines solubles dans la lumière du réticulum endoplasmique. Les motifs KK (ou RR) en avant dernière position assurent quant à eux la rétention des protéines membranaires du réticulum endoplasmique. On retrouve aussi une séquence C-terminale SKL pour les protéines des péroxysomes. Tous ces motifs nécessitent une localisation C-terminale et impliquent une lysine, sauf le motif RR des protéines membranaires du golgi de type II. La séquence AIAKE proposée pour la CyPB pourrait donc satisfaire à ces critères.

Le clivage de l'extrémité C-terminale d'une protéine par une protéase spécifique (souvent appelée dans ce cas enzyme de conversion) est aussi un phénomène souvent décrit, notamment pour l'activation de précurseurs protéiques. La coupure des cinq résidus d'acides aminés C-terminaux de la CyPB par une protéase localisée dans la voie de sécrétion pourrait ainsi constituer un mécanisme conduisant à la sécrétion de la CyPB. Une autre explication pourrait être l'épissage alternatif de l'ARN messenger de la CyPB. Un tel cas de figure est déjà rencontré pour une autre cyclophiline, le NK-TR, pour laquelle on retrouve trois transcripts différents.

**Etude du site d'interaction  
de la cyclophiline B avec  
son récepteur lymphocytaire**

---

## I. Introduction

Comme il a été montré précédemment, la CyPB possède une forme sécrétée retrouvée dans les fluides biologiques tels que le lait ou le sang. L'existence de cette CyPB extracellulaire suggérait qu'elle pouvait interagir avec des protéines membranaires spécifiques à la surface des cellules cibles. La présence de CyPB dans le sang a orienté la recherche de ces protéines vers les cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes. Il a ainsi été montré que la CyPB se fixait spécifiquement à la surface des lymphocytes T mais pas des lymphocytes B. Cette fixation est aussi observée sur les lymphocytes provenant du sang ou de lignées cellulaires lymphoblastiques (Jurkat, Molt-4, HSB2) avec des paramètres de fixation équivalents ( $K_d = 12 \pm 2$  nM,  $35000 \pm 1700$  sites/cellule) [Allain *et al.* (1994)]. Après fixation au récepteur, la CyPB est internalisée puis dégradée. La présence de CsA complexée à la CyPB ne gêne pas sa fixation ou son internalisation. Mais à la différence de la CyPB, la CsA internalisée n'est pas dégradée mais s'accumule dans la cellule sous une forme encore active. Dans une gamme de concentration inférieure à la capacité de fixation des cellules, la CyPB entraîne un ciblage préférentiel de la CsA dans les lymphocytes T. Les variations de concentration de la CyPB dans le plasma pourraient être à l'origine des sensibilités différentes à la CsA suivant les individus [Allain *et al.* (1995b)].

## II. Résultats

Dans le travail qui suit, nous avons recherché quelle était la région de la CyPB responsable de son interaction avec le récepteur lymphocytaire. La CsA n'empêchant pas cette fixation, il semblait que l'interaction avec le récepteur était indépendante du site catalytique de la CyPB.

Dans un premier temps, nous avons vérifié la spécificité de la fixation de la CyPB par rapport à d'autres CyPs. Puis à partir de ces données, nous avons recherché le site d'interaction par des expériences de compétition utilisant des peptides de synthèse ou des modifications chimiques d'acides aminés cibles sur la CyPB. Ces travaux font l'objet de la publication suivante :

**Involvement of the N-terminal part of cyclophilin B in the  
interaction with its receptor on Jurkat T-cells**

**Christophe Mariller, Bernard Haendler, Fabrice Allain, Agnès Denys and  
Geneviève Spik**

***Soumis à publication dans Biochem. J.***

## **Involvement of the N-terminal part of cyclophilin B in the interaction with its receptor on Jurkat T-cells**

**Christophe Mariller\***, **Bernard Haendler†**, **Fabrice Allain\***, **Agnès Denys\*** and **Geneviève Spik\***

\*Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, (France)

†Research Laboratories of Schering AG, Pharmaceutical Research, D-13342 Berlin, (Germany)

*Correspondence address:* G. Spik, Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tel: (33) 20.43.41.55; Fax: (33) 20.43.65.55;

E-mail: Spik@pop.univ-lille1.fr

**Abstract:** First characterized within the endoplasmic reticulum, it is now well established that cyclophilin B (CyPB) is also secreted in biological fluids such as blood and milk. Surface binding sites for CyPB were described on Jurkat cells, a human lymphoblastic cell line, and on human peripheral blood lymphocytes. The complex CyPB-cyclosporin A binds to these cells and is internalized as well as free CyPB, suggesting a correlation with the selectivity of the immunosuppressive action of cyclosporin A. The present study was intended to specify the areas of CyPB that are involved in the interaction with the receptor. A synthetic peptide corresponding to the first 24 amino acid residues of CyPB was shown to specifically recognize the receptor. Moreover, modification of Arg<sup>18</sup> by *p*-hydroxyphenylglyoxal leads to a dramatic loss of CyPB affinity to its receptor. But when this residue is replaced by an alanine residue by site directed mutagenesis, no modification of binding properties was shown suggesting that Arg<sup>18</sup> is sufficiently closed to the interaction site to inhibit the binding when modified. The use of a chimeric protein made up of the first 24 amino acid residues of CyPB placed onto the CyPA sequence has confirmed the importance of the N-terminal extremity of CyPB.

**Key words:** cyclophilin, cyclosporin A, receptor, (Jurkat T-cells)

**Abbreviations:** AMCA-HPDP, N-[6-7-amino-4-methylcoumarin-3-acetamido) hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio) propionamide; BSA, bovine serum albumin; CyPA, cyclophilin A; CyPB, cyclophilin B; CsA, cyclosporine A; DPBS, Dulbecco's phosphate buffered saline; PBS, phosphate buffered saline.

## INTRODUCTION

Cyclophilins were first identified as the high affinity binding proteins for the immunosuppressive drug cyclosporin A (CsA). CsA is a cyclic undecapeptide which was isolated over 20 years ago based on its ability to inhibit a mixed lymphocyte reaction [1]. Its clinical introduction greatly improved the outcome of solid organ and bone marrow transplantation and, despite toxic side effects, it remains a useful immunosuppressive agent [2]. Cyclophilins are members of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase family, which includes also the FK506 Binding Proteins (FKBPs) [3] and the parvulins [4]. The FKBP are able to bind the macrolide FK506 which is also used to prevent graft rejection but structurally unrelated to CsA [5]. All these proteins catalyse the prolyl bond isomerisation rate of synthetic peptides and the refolding of a few denatured proteins [3, 6-8]. CsA inhibits cyclophilin prolyl isomerase activity [8], while FK506 inhibits FKBP prolyl isomerase activity [3].

Several cyclophilin isoforms with distinct subcellular localisations have been described in various prokaryotic and eukaryotic organisms. The first form characterized is cyclophilin A (CyPA), a soluble, abundant and cytosolic protein which is probably the main target of CsA *in vivo* [9]. Indeed, the complex formed by the immunosuppressive drug and CyPA binds and modulates the activity of calcineurin [10], a critical intermediate in the signal transduction pathway recruited upon T-cell activation [11]. Cyclophilin B [12-14] and cyclophilin C [15] (CyPB and CyPC) are related to CyPA but they contain an amino terminal signal sequence thought to mediate translocation into the endoplasmic reticulum (ER). Such sequences might target secretory proteins to any location in the secretory pathway. Mitochondrial cyclophilin (CyPD) is the fourth member of the human cyclophilin family [16].

CyPB has been reported as being retained in specialised portions of the endoplasmic reticulum [17] but also as a protein which follows the secretory pathway until its secretion [18]. Its purification from human milk has provided the evidence that CyPB is secreted in this medium [14]. Specific antibodies against peptides corresponding to the most divergent parts of CyPA and CyPB have shown that CyPB, but not CyPA, is also present in human

blood [19]. The binding capacity of CyPB to cells of the immune system was furthermore investigated and indeed surface binding sites characterized on both Jurkat T-cells and human peripheral blood T-lymphocytes. A dissociation constant  $K_d$  of 12 nM was calculated and the number of binding sites estimated to 35,000 / cell [20]. The CyPB/CsA complex binds to the T-lymphocytes with similar  $K_d$  values and approximatively the same number of sites. At 37°C, both the CyPB/CsA complex and free CyPB are internalised after binding. But, while CyPB is subsequently degraded in acidic compartments, CsA is accumulated within the cell. Thus, in a defined range of CyPB concentration, the CyPB/CsA complex may target the drug to lymphocytes and increase its cellular concentration [21]. The presence of these surface binding sites is consistent with the hypothesis that CyPB is secreted into biological fluids such as milk or blood [14, 19] and then interacts with specific receptors on target cells.

In an attempt to specify the areas of CyPB that interact with the surface binding sites of Jurkat cells, several competition binding assays have been carried out. By comparing the amino acid sequence of CyPA and CyPB, it appears that the N- and C-terminal parts of CyPB are specific of this protein and are suitable to contain the interaction site. We have therefore investigated the possible involvement of the N- and C-terminal extremities of CyPB in the interaction with the Jurkat receptor by competition experiments using synthetic peptides corresponding to these regions. CyPB modified at specific locations, either chemically or by site-directed mutagenesis, were furthermore used to gain information on the sites involved in the interaction with the specific receptor.

## EXPERIMENTAL

### Materials

CyPA, CyPC and the PCGF-72 plasmid coding for human CyPB were a generous gifts from Sandoz (Basel, Switzerland). *N*-[6-7-amino-4-methylcoumarin-3-acetamido] hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio) propionamide (AMCA-HPDP) and *p*-hydroxyphenylglyoxal were purchased from Pierce (Rockford, USA).

### Construction of CyPB mutants

The CyPB/A chimera was constructed in two steps. Firstly the region coding for 27 N-terminal amino acids of mature CyPB was amplified by PCR while adding a flanking *Nco*I site, including the ATG initiator codon, at the 5' side; and flanking *Aat*I, *Mlu*I and *Hind*III restriction sites at the 3' end. The *Aat*I and *Mlu*I sites were selected because they were compatible with the desired final amino sequence and not present in the original CyP coding sequences. The *Hind*III site was used, together with *Nco*I, for subcloning into the pKK233-2 vector, after purification on a low-melting agarose (FMC) gel. Secondly, the region coding for residue 20 to stop signal of CyPA was amplified by PCR while introducing flanking *Mlu*I and *Hind*III restriction sites. After gel purification and digestion with the appropriate enzymes this fragment was subcloned downstream of the CyPB coding portion in pKK233-2.

For the CyPB<sup>L17I; R18A</sup> construct, the region coding for the 26 N-terminal residues of CyPB was amplified with PCR using the same 5' primer as above and a 3' primer designed so as to introduce the desired mutations while adding a flanking *Aat*I restriction site. After gel purification and digestion with *Nco*I and *Hind*III, the DNA fragment was introduced into the CyPB/A construct described above and previously treated with the same enzymes.

All the constructs were verified by complete DNA sequencing on the CyP-coding part and the flanking regions, and then used for transformation of competent *E. coli*. A single colony was picked in each case for the expression studies. 1.5 to 3 liters culture of

transformed *E. coli* were grown at 37 °C to an absorbance at 550 nm of 2. Induction was with 1 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside for 4 hours before harvesting.

### **Preparation of recombinant wild type and mutants CyPB**

Purifications of recombinant wild type CyPB and CyPB<sup>L17I; R18A</sup> were performed using the procedure described in [14]. Purification of CyPB/A chimera was performed using the same procedure but the ion exchange chromatography step on Mono S column was realized at pH 6.0 instead of pH 6.5 due to the lower pI of the protein.

### **Peptide synthesis**

Peptides were synthesized using the conventionnal solid phase 'Boc-benzyl strategy' [22] on 'PAM' resins [23] in an automated Applied BioSystem 470A peptide synthesizer, using *N*, *N*-dicyclohexylcarbodiimide/hydroxybenzotriazole based coupling procedure. After fluorohydric acid cleavage from the resin in the presence of scavengers, crude deprotected peptides were purified by trifluoroacetic acid/diethylether precipitation followed by gel permeation.

### **Derivatization of recombinant CyPB with *p*-hydroxyphenylglyoxal and AMCA-HPDP**

#### **Labelling of CyPB with AMCA-HPDP**

0.536 mg of AMCA-HPDP were dissolved in 1 ml of dimethylsulfoxide (1.55 mM final concentration). CyPB was diluted in PBS/EDTA (1mM) to a final concentration of 0.5 mg/ml. CyPB was conjugated with AMCA-HPDP at a molar ratio of reagent to CyPB of 10:1. Incubation was performed at room temperature for 90 min. The reaction of AMCA-HPDP with the sulfhydryl group of CyPB was followed with spectrophotometry since the reaction leaving group, pyridine-2-thione, has a characteristic absorption at 343 nm. Free AMCA-HPDP was removed by gel-filtration on a Sephadex G-25 PD10 column

(Pharmacia). The ratio of AMCA-HPDP to CyPB was estimated by measuring the absorbance at 280 nm and 345 nm according to instructions of the manufacturers.

### Modification of arginine residues with *p*-hydroxyphenylglyoxal

0.5 mg of CyPB (or CyPB<sup>L17->I; R18->A</sup> or <sub>1</sub>DEKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sub>24</sub> peptide) was reacted with 0.5 mg of *p*-hydroxyphenylglyoxal in 0.5 ml of 0.1M sodium borate buffer, pH 9.0. The reaction mixture was incubated for 1 h at 25 °C in the dark. The excess of *p*-hydroxyphenylglyoxal was eliminated by gel filtration on a Sephadex G-25 PD10 column (Pharmacia) for CyPB and on a Sephadex G-10 column (1.5 cm x 10 cm) for the <sub>1</sub>DEKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sub>24</sub> peptide. The content of modified arginine residues was assayed by use of the molar absorption coefficient for the product. Modified arginine residues exhibit a maximum absorbance at 335 nm with a molar absorption coefficient of  $1.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  at pH 9.0 [24].

### Cells

The human lymphoblastic T-cell line Jurkat was routinely cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Inc.) containing 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, gentamycin (5 µg/ml), (pH 7.3), supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum. The culture was diluted every 2 days in order to maintain cell concentration ranging between 0.5 and  $1 \times 10^6$  cells/ml.

### Competition binding assays

<sup>125</sup>I-CyPB was obtained by incubating 100 µg of protein with 0.3 mCi of carrier-free Na<sup>125</sup>I (ICN Biochemicals, Costa Mesa, USA) in presence of 100 µg of Iodo-Gen (Pierce, Rockford, USA) for 15 min at room temperature. Free iodine was removed by gel filtration on a Sephadex G-25 PD-10 column. The specific radioactivity ranged over  $2\text{-}3 \times 10^6$  cpm/µg.

The cells were washed twice and diluted in DPBS-BSA to a final concentration of  $4 \times 10^6$

cells/ml. The specificity of human milk CyPB binding was studied by incubating cells ( $2 \times 10^6$  cells/sample) with 25 nM  $^{125}\text{I}$ -CyPB and a molar excess of competitors for 1 h at 4 °C. After incubation, the cells were centrifuged (400 x g, 5 min) and washed three times with 3 ml of cold DPBS. Cell-associated radioactivity was finally measured using a model 1282 Compugamma LKB-Wallac counter.

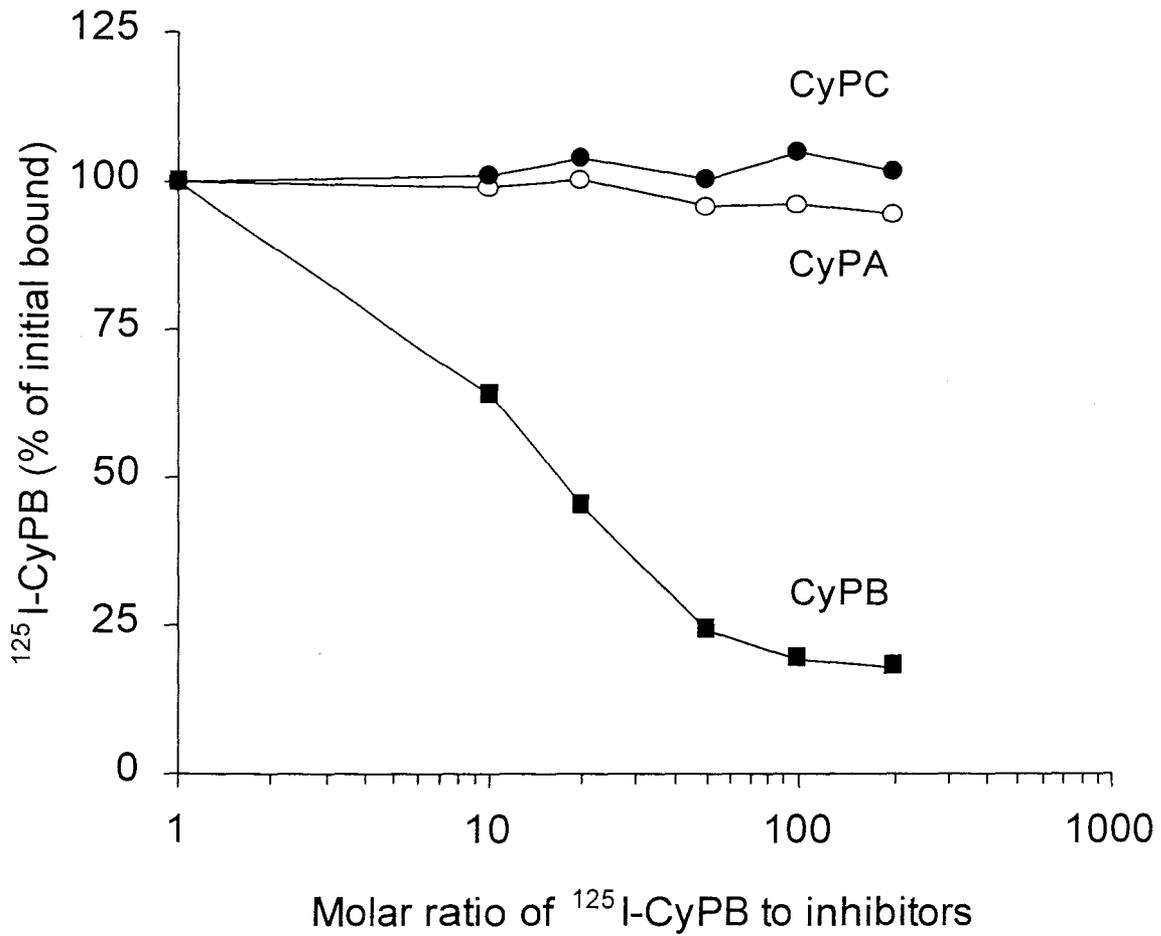
## RESULTS

### Competition binding assays with cyclophilins isoforms

The specificity of CyPB binding was examined by competition binding experiments to Jurkat T-cells with two other cyclophilins, CyPA and CyPC. Unlabelled CyPA, CyPB and CyPC were tested for their ability to compete with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for binding to the receptor. To this end, cells were incubated with recombinant  $^{125}\text{I}$ -CyPB in the presence of increasing concentrations of unlabelled cyclophilins (Figure 1). As expected,  $^{125}\text{I}$ -CyPB binding was inhibited by 80% in presence of 500 molar excess of unlabelled CyPB. But neither CyPA nor CyPC had a competitive effect on the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells showing that these two proteins have no affinity for the CyPB receptor present on these cells.

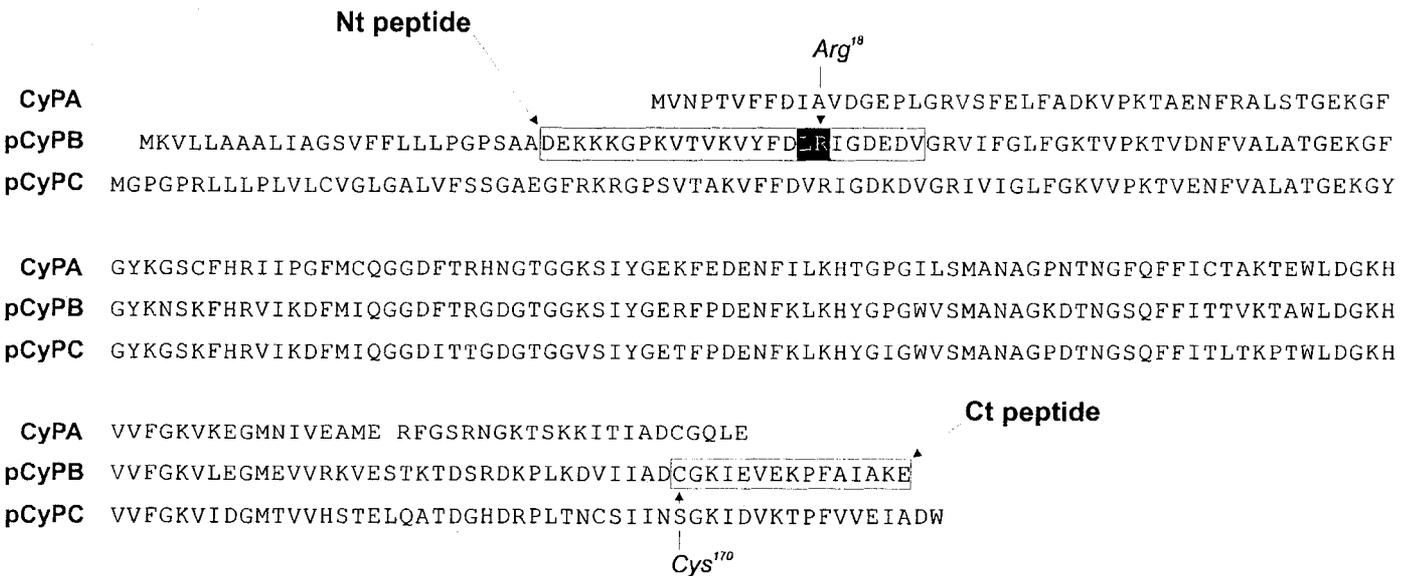
### Competition binding assays with the synthetic peptides corresponding to CyPB extremities

The interaction of the synthetic peptides corresponding to the first 24 Nt amino acid residues ( $_{1}\text{DEKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV}_{24}$ ) and to the last 15 Ct amino acid residues ( $_{170}\text{CGKIEVEKPFAlAKE}_{184}$ ) (Figure 2) was characterized by competition binding experiments using Jurkat T-cells. Cells were incubated with recombinant  $^{125}\text{I}$ -CyPB in the presence of various concentrations of unlabelled peptides (Figure 3). The binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat cells was specifically inhibited by addition of the Nt corresponding peptide but not by the Ct corresponding peptide. Increased concentrations of the Nt corresponding peptide from 10 to 500 molar excess inhibited the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB up to 38%. The



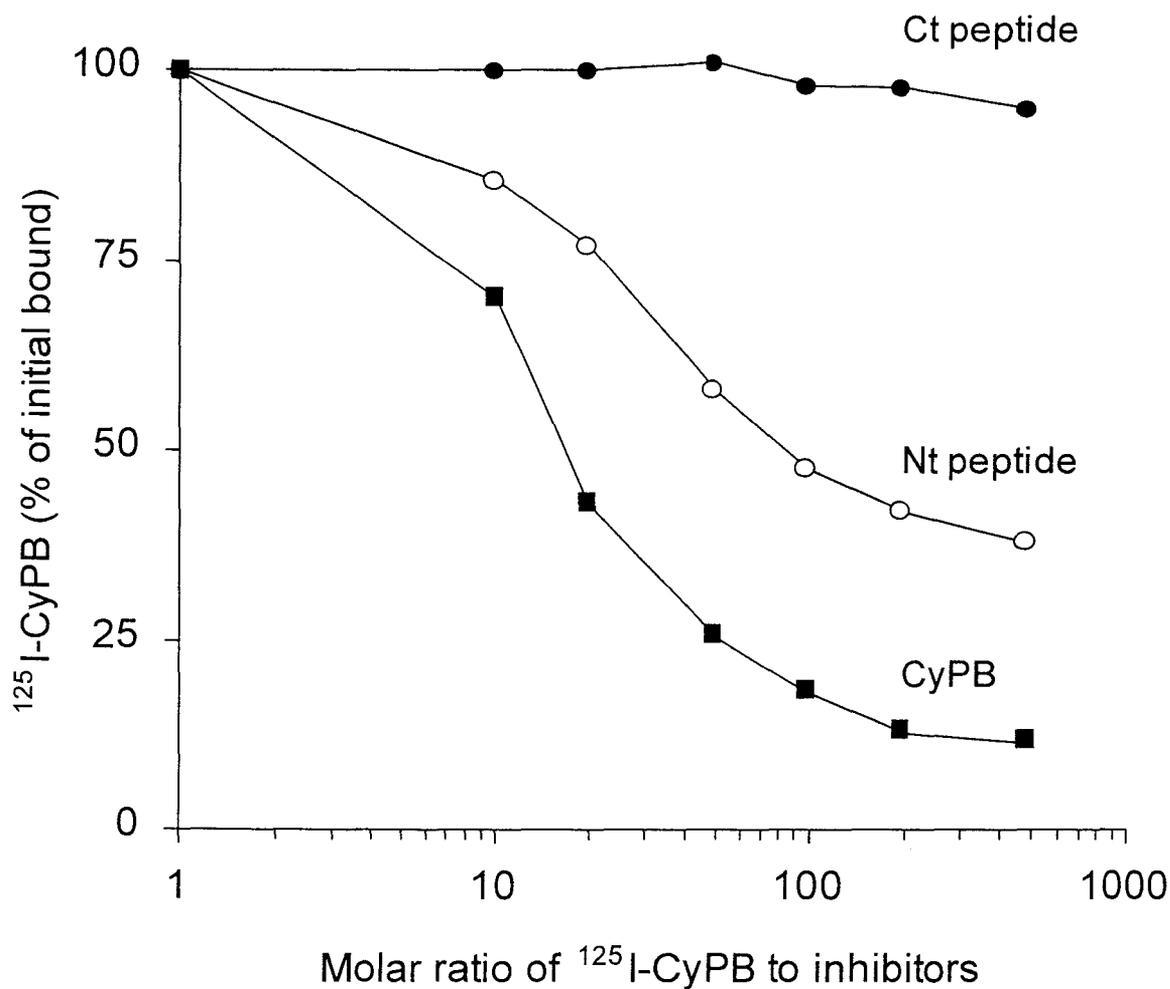
**Figure 1 Competition binding assay of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells with other cyclophilins**

Jurkat T-cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for 1 h at 4 °C together with increasing concentrations of CyPA (○), CyPB (■) or CyPC(●). The amount of bound  $^{125}\text{I}$ -CyPB, as a percentage of  $^{125}\text{I}$ -CyPB bound in the absence of unlabelled CyPB, is plotted against the molar ratio of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to the competitors.



**Figure 2 Amino acid sequence of CyPB**

The <sub>1</sub>DEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV<sub>24</sub> and <sub>170</sub>CGKIEVEKPF<sub>184</sub> peptides are boxed and respectively termed Nt peptide and Ct peptide . The <sub>17</sub>LR<sub>18</sub> sequence which is replaced by <sub>17</sub>LA<sub>18</sub> is typed in white on black. Arg<sup>18</sup> and Cys<sup>170</sup>, which are modified by respectively *p*-hydroxyphenylglyoxal and AMCA-HPDP, are indicated by arrows.



**Figure 3 Competition binding assay of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells with synthetic peptides corresponding to CyPB extremities**

Jurkat T-cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for 1 h at 4 °C together with increasing concentrations of CyPB (■),  $_1\text{DEKKKGPKVTVKVYFDLRI GDEDV}_{24}$  peptide (○)(Nt peptide) and  $_{70}\text{CGKIEVEKPF AIAKE}_{184}$  (●)(Ct peptide). The amount of  $^{125}\text{I}$ -CyPB, as a percentage of  $^{125}\text{I}$ -CyPB bound in the absence of unlabelled CyPB, is plotted against the molar ratio of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to the competitors.

concentration of unlabelled Nt corresponding peptide required for half maximal inhibition of  $^{125}\text{I}$ -CyPB binding to cells ( $\text{IC}_{50}$ ) was  $2.2 \mu\text{M}$ .

## Competition binding assays with modified CyPB and modified Nt peptide

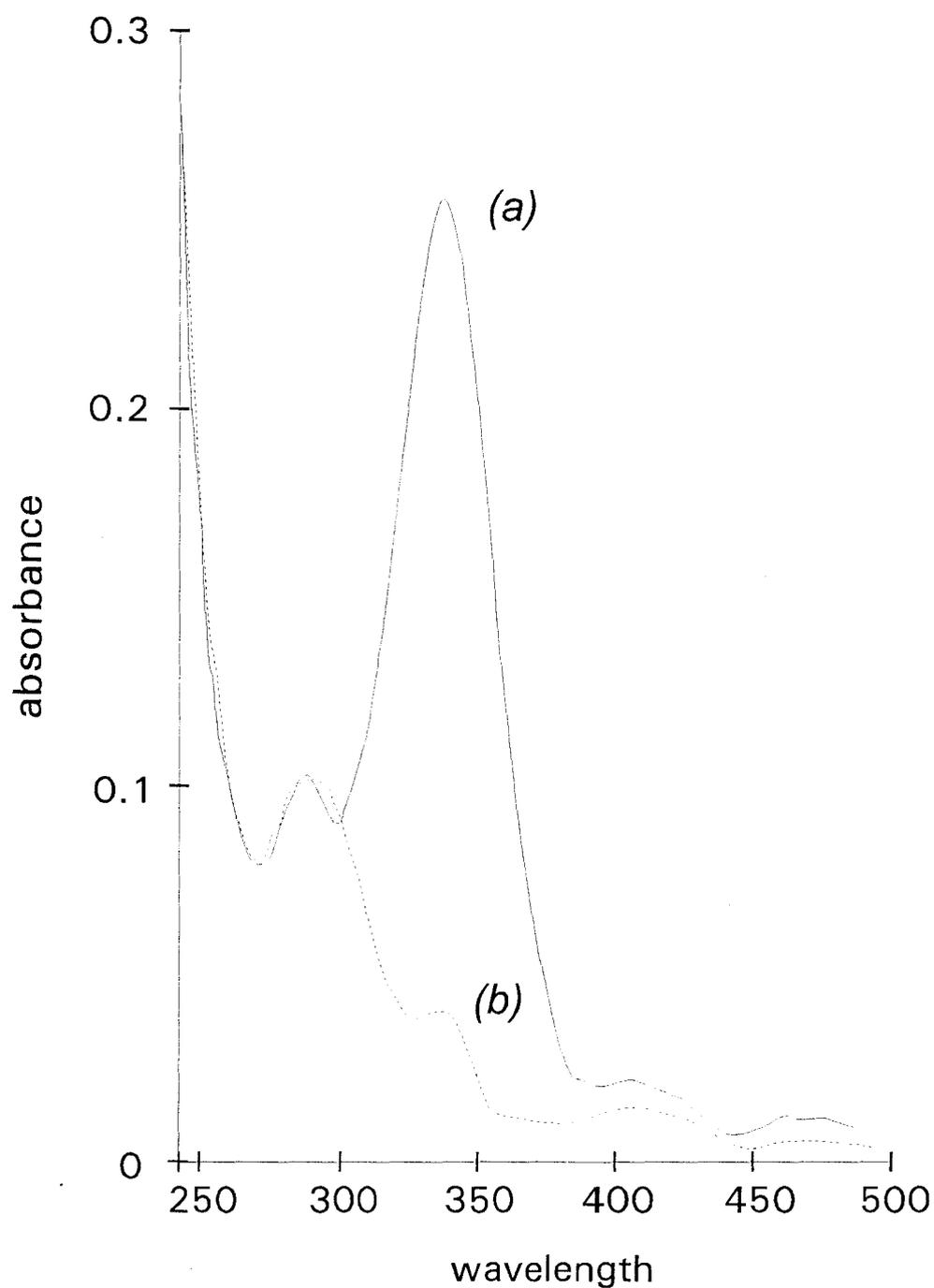
CyPB was modified either by AMCA-HPDP for targeting the single cysteine residue or by *p*-hydroxyphenylglyoxal for the arginine residues. Both modified CyPB were then used as competitors in competition experiments carried out as described above.

## Modification of cyclophilins with *p*-hydroxyphenylglyoxal

To investigate the possible involvement of arginine residues in the recognition of CyPB by Jurkat T-cells, CyPB was treated with *p*-hydroxyphenylglyoxal. This compound modifies proteins by reacting highly selectively with the guanidinyll group of the arginine residues to a stable complex [24]. The *p*-hydroxyphenylglyoxal reaction with arginine residues in proteins is accompanied by a marked spectral change. Figure 4 shows the U.V. absorption spectra of *p*-hydroxyphenylglyoxal treated CyPB and CyPB<sup>L17I; R18A</sup>. The CyPB spectrum has a maximum absorption at 335 nm as expected for a *p*-hydroxyphenylglyoxal modified protein. A molar absorption coefficient of  $1.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  at pH 9.0 was used to assay the amount of modified arginine residues [24]. The extent of reaction of arginine residues with *p*-hydroxyphenylglyoxal calculated using this value and the  $A_{335\text{nm}}$ , was 1.15 residues per molecule. In contrast, the modified CyPB<sup>L17I; R18A</sup> spectrum, which lacks the Arg<sup>18</sup>, showed only a weak absorption at 335 nm, corresponding to 0.2 modified arginine residue per molecule.

## Competition binding assays with modified CyPB, CyPB<sup>L17I; R18A</sup> or Nt peptide

The effect of the modification of CyPB with *p*-hydroxyphenylglyoxal on the association to



**Figure 4** U.V. absorption spectra of *p*-hydroxyphenylglyoxal treated cyclophilins

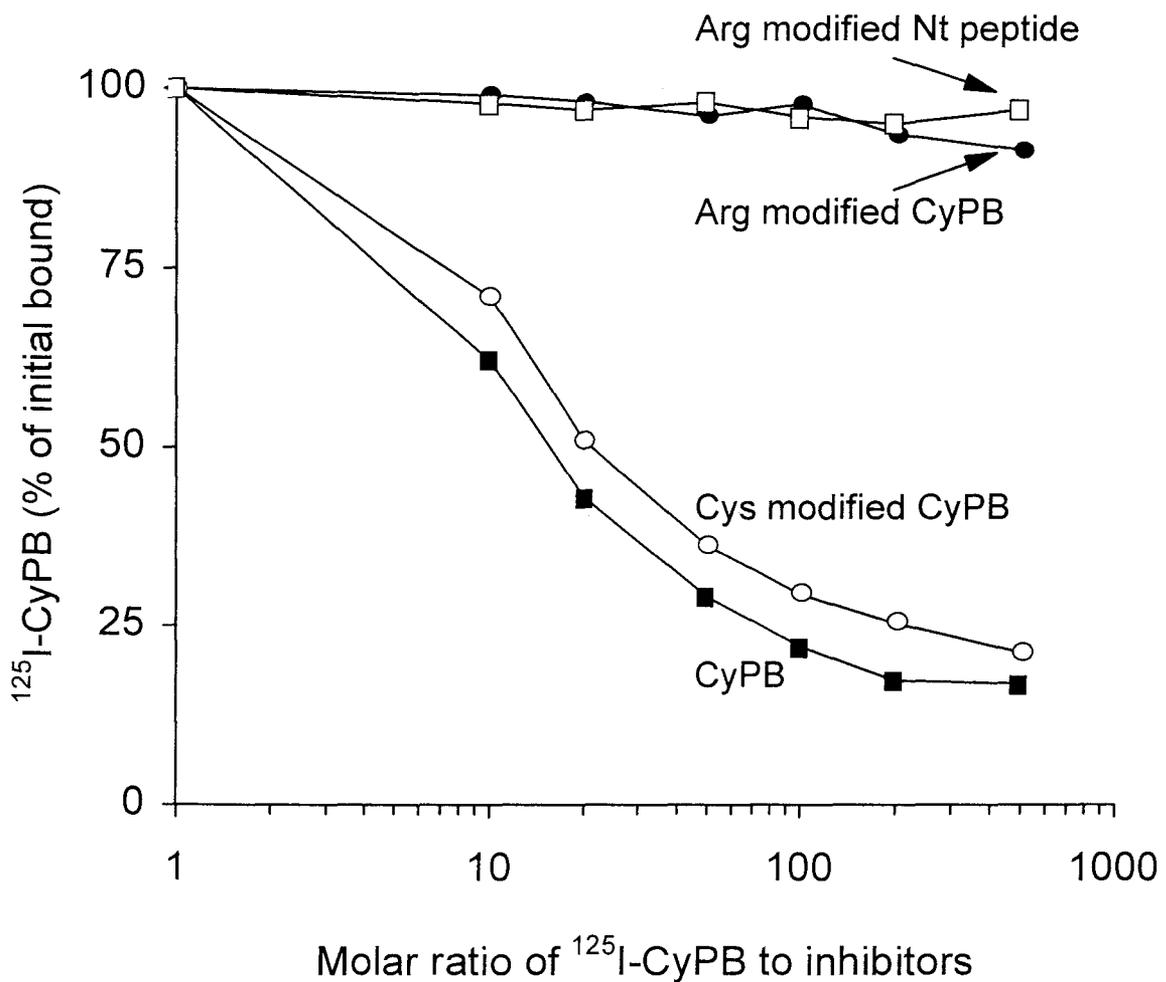
(a) CyPB treated with *p*-hydroxyphenylglyoxal at pH 9.0 for 1 h at 25 °C. (b) CyPB<sup>L17I; R18A</sup> treated with *p*-hydroxyphenylglyoxal at pH 9.0 for 1 h at 25 °C. The spectra were recorded at pH 9.0 and at room temperature.

the Jurkat T-cells is shown in Figure 5. The data clearly demonstrates that the modification of CyPB is accompanied by a loss of the binding to Jurkat T-cells. This indicates a sensitivity to the reagent of one arginine residue crucial for the binding of CyPB. Confirmation was obtained by modifying the only arginine residue of the  $_1\text{DEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV}_{24}$  peptide. The modified peptide also failed to compete with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for binding to its receptor.

The efficiency of the CyPB labelling by AMCA-HPDP was controlled by the measurement of absorbances at 280 nm and 345 nm. A fluorochrome/protein ratio of 0.82 was obtained, consistent with the fact that CyPB has only one cysteine residue, localized at position 170. As shown in Figure 5, derivatization of CyPB with AMCA-HPDP did not significantly interfere with its binding to Jurkat T-cells. Less than 20% of deviation of the  $\text{IC}_{50}$  value was observed using AMCA-HPDP labelled CyPB as a competitor up to a 500 molar excess.

### Competition binding assays with CyPB mutants

In order to further confirm the importance of the N-terminus of CyPB in the interaction with the receptor, two mutant forms were engineered and tested. In one mutant the 17 N-terminal amino acids of CyPA were replaced by the 24 N-terminal residues of mature CyPB to give a CyPB/A chimera. In the second mutant, the  $_{17}\text{LR}_{18}$  residues of CyPB were exchanged for the IA residues located at equivalent positions in the N-terminal region of CyPA, to give the  $\text{CyPB}^{\text{L17I; R18A}}$  mutant. Competition binding experiments were carried out to test the affinity of these CyPB mutants for Jurkat receptor T-cell receptor (Figure 6). The CyPB/A chimera was able to inhibit the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB but only to a certain extent. The  $\text{IC}_{50}$  of CyPB/A chimera was estimated to be 21  $\mu\text{M}$  and corresponds to a 70-fold lower affinity for the receptor than CyPB. In contrast, the  $\text{CyPB}^{\text{L17I; R18A}}$  mutant inhibited the  $^{125}\text{I}$ -CyPB binding as well as CyPB did. The  $\text{IC}_{50}$  values of CyPB and  $\text{CyPB}^{\text{L17I; R18A}}$  binding to the specific receptor differ by less than 20 %.



**Figure 5** Competition binding assay of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells with modified CyPB or Nt peptide

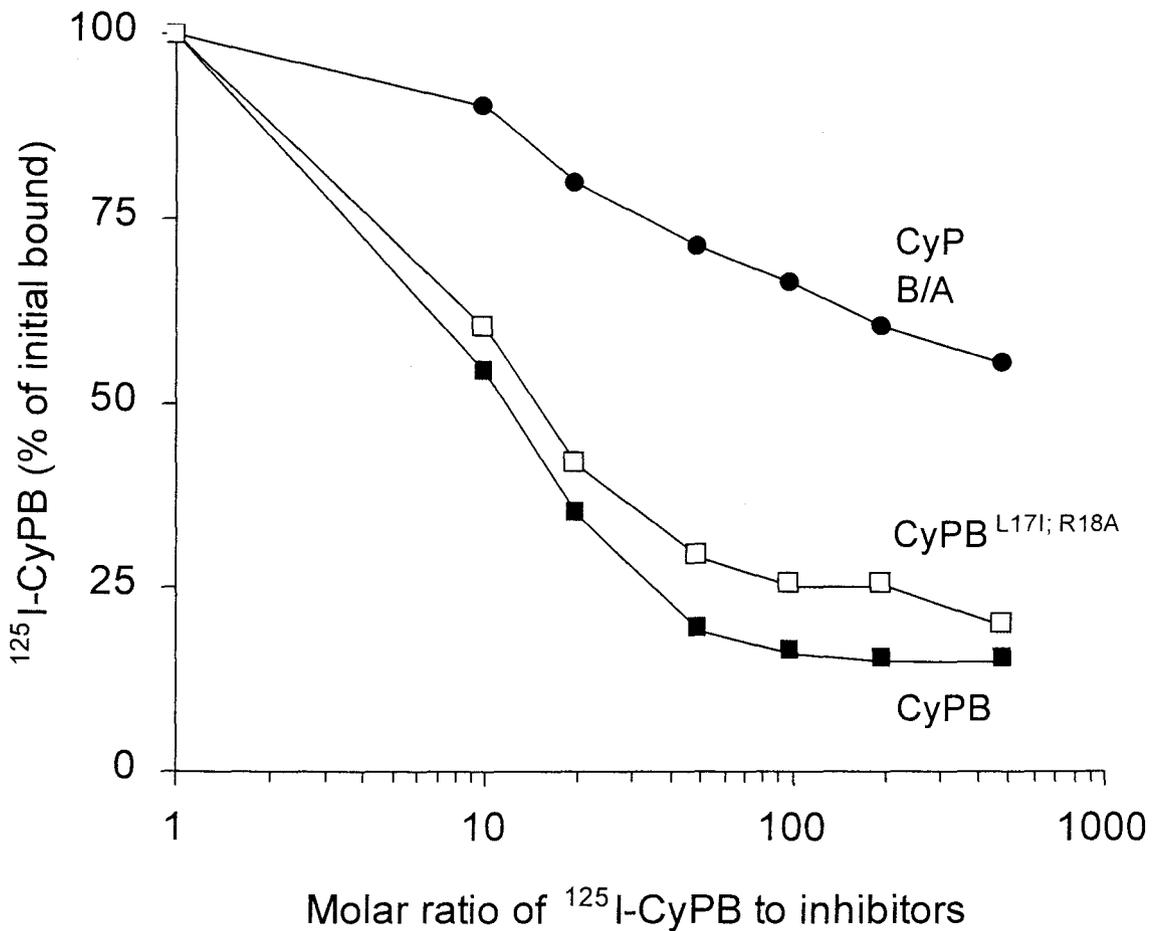
Jurkat T-cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for 1 h at 4 °C together with increasing concentrations of CyPB (■), AMCA-HPDP labelled CyPB (○)(Cys modified CyPB), *p*-hydroxyphenylglyoxal modified CyPB (●)(Arg modified CyPB) and *p*-hydroxyphenylglyoxal modified  $_1\text{DEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV}_{24}$  peptide (□)(Arg modified Nt peptide). The amount of  $^{125}\text{I}$ -CyPB, as a percentage of  $^{125}\text{I}$ -CyPB bound in the absence of unlabelled CyPB, is plotted against the molar ratio of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to the unlabelled cyclophilins.

## DISCUSSION

Allthough CyPA and CyPC are closely related to CyPB, they do not bind to the Jurkat T-cell receptor. This is accountable for CyPA which is exclusively cytosolic and exhibits several marked structural divergences with CyPB. It is more surprising that CyPC does not bind to the receptor since it shares more than 70% sequence identity with CyPB. It has so far not been demonstrated that CyPC is secreted despite the presence of a signal sequence which allows it to reach the secretory pathway [9, 15]. The only known ligand for CyPC, the CyPC associated protein (CyCAP), is also a protein which follows this secretory pathway [25]. Our results demonstrate the fine specificity of the interaction between CyPB and its receptor on Jurkat T-cells.

Major sequence differences between CyPA and CyPB are located in the N- and C-terminal regions which were therefore good candidates for use in competition experiments. Antibodies raised against the corresponding peptides ( $_1$ DEKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sub>24</sub> and  $_{170}$ CGKIEVEKPFAlAKE<sub>184</sub>) do not recognize CyPA [19] testifying to the specificity of these peptides. While the  $_{170}$ CGKIEVEKPFAlAKE<sub>184</sub> peptide had no inhibitory effect on the binding of  $^{125}$ I-CyPB to Jurkat T-cell, the  $_1$ DEKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sub>24</sub> peptide inhibited the binding up to 38%. The lower inhibition observed for this peptide (a 5-fold increase of IC<sub>50</sub>) could be explained by secondary-structure modifications and/or by the fact that all the residues involved in the interaction with the receptor are not included in this peptide.

The comparison of the X-ray structures of CyPA and CyPB shows that the proteins share the same overall conformation excepting for two loops, one of them located between the residues 19 to 24 of CyPB. The CyPA N-terminus is characterized by an extended  $\beta$ -strand (residues 1-11). However in the corresponding  $\beta$ -strand of CyPB (residues 12-19) the residue 12 is bent towards the barrel of the protein. Even though the loop connecting the two first  $\beta$ -strands of CyPA (residues 11-16) is a type I'  $\beta$ -turn structure, the CyPB equivalent loop (residues 19-24) has twisted to give a type II'  $\beta$ -turn structure with a different angle from CyPA [26]. It's interesting to notice that one of the two main structural differences between CyPA and CyPB is located in the area corresponding to the  $_1$ DEKKKGPKVTVKVFYDLRIGDEDV<sub>24</sub> peptide. This is consistent with the fact that CyPA does not bind to Jurkat T-cells [20].



**Figure 6 Competition binding assay of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells with CyPB mutants**

Jurkat T-cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -CyPB for 1 h at +4 °C together with increasing concentrations of competitors such as CyPB (■), CyPB<sup>L17I; R18A</sup> (□) and CyPB/A (●). The amount of labelled CyPB, as a percentage of  $^{125}\text{I}$ -CyPB bound in the absence of  $^{125}\text{I}$ -CyPB, is plotted against the molar ratio of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to the unlabelled cyclophilins.

In our study, we also modified the arginine residues of CyPB with *p*-hydroxyphenylglyoxal. This compound specifically neutralizes the positive charge of arginine by complexation with the guanidinyll group but leaves the other amino acids unchanged. Chemical modification of arginine residues has been proved valuable in understanding structure-function relationships in proteins [27]. Our results clearly demonstrate that the derivatization of one arginine residue in CyPB abolishes its capacity to inhibit the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells. The  $_{1}\text{DEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV}_{24}$  peptide possesses a single arginine residue. When this residue is derivatized by *p*-hydroxyphenylglyoxal, the peptide becomes unable to inhibit the binding of  $^{125}\text{I}$ -CyPB to Jurkat T-cells. Therefore the arginine residue modified by *p*-hydroxyphenylglyoxal in CyPB might also be Arg<sup>18</sup>, since only one arginine residue is modified in the protein under mild conditions. Another piece of evidence that Arg<sup>18</sup> is the modified arginine residue is provided by the fact that the *p*-hydroxyphenylglyoxal treated CyPB<sup>L17I; R18A</sup> shows only 0.2 modified arginine residue. We surmise that this residue is particularly exposed at the surface of the molecule and then easily modified by chemical agents. There is no corresponding arginine residue in CyPA. Under the above observations, it is likely that Arg<sup>18</sup> may be involved in the interaction with the receptor or is close enough to the interaction of CyPB site to prevent binding by steric hindrance of the modified arginine. Actually, two molecules of *p*-hydroxyphenylglyoxal react with one arginine residue to form a high size complex [24].

Labeling a protein in the vicinity of the receptor-binding site by a fluorophore is a good tool to inhibit protein-protein interaction by masking the interaction site. CyPB has a single cysteine residue located at position 170 just before the C-terminal extension. Furthermore, the N- and C-terminus ends of CyPB are aggregated together and point away from the molecular bulk to form a  $\beta$ -strand. To hide this part of the protein, AMCA-HPDP was used because of its high specificity for sulfhydryl groups and the presence of a six carbons arm creating a high steric hindrance. But, despite a fluorophore/protein ratio of 0.82, the labelling of CyPB by AMCA-HPDP has only minor effect on the binding to Jurkat T-cell receptor indicating that the receptor binding site is not in the area close to the cysteine residue, also found in the  $_{170}\text{CGKIEVEKPFIAIAKE}_{184}$  peptide. The absence of inhibitory effect of the  $_{170}\text{CGKIEVEKPFIAIAKE}_{184}$  peptide perfectly agrees with this finding. The use of molecular modelling will allow us to define a large region of CyPB

around Cys<sup>170</sup> that is not involved in the interaction with the receptor. In conjunction with the other results, it will make a better characterization of the CyPB binding site easier.

Two CyPB mutants were designed in order to check the results obtained above. In the CyPB/A chimera, the N-terminus of CyPB (<sub>1</sub>DEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV<sub>24</sub>) was exchanged for the corresponding region of CyPA. This protein binds to the Jurkat receptor with a 70-fold lower affinity than CyPB. There are at least two possible explanations for this. Firstly, the lower affinity might be due to a different conformation of <sub>1</sub>DEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV<sub>24</sub>, when placed in CyPA instead of CyPB. This is supported by the fact that the free <sub>1</sub>DEKKKGPKVTVKVYFDLRIGDEDV<sub>24</sub> peptide IC<sub>50</sub> is 10-fold higher than the one obtained for the CyPB/A chimera. Secondly, another part of the CyPB may be involved in the interaction with the receptor. This is observed for instance with IL-8 binding to both its A and B type receptors. While the <sub>4</sub>ELR<sub>6</sub> sequence is necessary for the binding, the Tyr<sup>13</sup> and Lys<sup>15</sup> residues are required for a high affinity binding [28]. There is some convergences between cyclophilins and IL-8. In fact, like the cyclophilins, IL-8 is able to specifically bind CsA. IL-8 was described as a dimeric molecule which has striking similarities with the three-dimensionnal structure of cyclophilins [29]. Moreover, the <sub>16</sub>DLR<sub>18</sub> sequence of CyPB is quite similar to the <sub>4</sub>ELR<sub>6</sub> consensus sequence of IL-8 suggesting that these residues may be important for the CyPB interaction with the receptor. The CyPB<sup>L17I; R18A</sup> mutant was used to confirm the importance of this sequence including the Arg<sup>18</sup>. Because CyPA does not bind to the Jurkat receptor, the <sub>16</sub>DLR<sub>18</sub> sequence was mutated to the corresponding sequence of CyPA (<sub>9</sub>DIA<sub>11</sub>). Surprisingly and despite the results obtained when using *p*-hydroxyphenylglyoxal, the CyPB<sup>L17I; R18A</sup> mutant binds to the Jurkat receptor as well as CyPB. This clearly indicates that neither Leu<sup>17</sup> or Arg<sup>18</sup> directly interact with the receptor. The best explanation is probably that the complex formed by the modified Arg<sup>18</sup> is sufficiently large and close to the binding site to prevent the interaction with the receptor.

In conclusion, our results demonstrate that the first 24 amino acid residues of CyPB are involved in the binding to Jurkat T-cell line. This sequence contains a single arginine residue, critical to the interaction to the receptor when this residue is modified. This observation confirms the specificity of CyPB for the receptor binding and is related with the fact that CyPB is secreted in biological fluids such as blood and milk, and that CyPA is

exclusively cytosolic. The absence of CyPC binding on Jurkat T-cells provide us with a good model for a fine analysis of the differences between these two proteins. The use of molecular modelling to visualise the significance of the chemical modifications of arginine and cysteine residues will be a first step towards a better characterization of the CyPB binding site. Site-directed mutagenesis will allow a more precise characterization of the amino acid residues directly implicated in the interaction with the receptor.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This investigation was supported in part by CNRS, Unité Mixte de Recherche n°111 (Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires; Director: Pr. A. Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille, and by the European Economic Community (Biomed Program Contract BMH1-CT93-1748).

We thank Christophe BOUTILLON for providing the synthetic peptides, Eve DAMIENS for her help in cell manipulations and Vincent MIKOL for providing atomic coordinates of CyPB.

## REFERENCES

- 1 Sigal, N.H. and Dumont, F.J.(1992) *Ann. Rev. Immunol.* **10**, 519-560
- 2 Borel, J.F. (1989) *Pharmacol. Rev.* **41**, 259-371
- 3 Siekerka, J.J. Hung, S.H.Y. Poe, M. Lin, C.S. and Sigal, N.H. (1989) *Nature* **341**, 755-757
- 4 Rahfeld, J-U. Schierhorn, A. Mann, K. and Fischer, G. (1994) *FEBS Lett.* **343**, 65-69
- 5 Schreiber, S.L. (1991) *Science* **251**, 283-287
- 6 Fischer, G. and Bang, H. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* **828**, 39-42
- 7 Schonbrunner, E.R. Mayer, S. Tropshug, M. Fischer, G. Takahashi, N. and Schmidt, F.X. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3630-3635
- 8 Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. and Schmid, F.X. (1989) *Nature* **337**, 476-478
- 9 Bram, R.J., Hung, D.T., Martin, P.K., Schreiber, S.L. and Crabtree G.R. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4760-4769
- 10 Liu, J. Farmer, J.D.J. Lane, W.S. Friedman, J. Weissman, I. and Schreiber, S.L. (1991) *Cell* **66**, 807-815
- 11 Clipstone, N.A. and Crabtree G.R.(1992) *Nature* **357**, 695-697
- 12 Hasel, K.W. Glass, J.R. Godbout, M. and Sutcliffe, J.G. (1991) *Mol. Cel. Biol.* **91**, 3484-3491
- 13 Price, E.R. Zydowsky, L.D. Mingjie, J. Hunter Baker, C. McKeon, F.D. and Walsh, C.T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1903-1907
- 14 Spik, G. Haendler, B. Delmas, O. Mariller, C. Chamoux, M. Maes, P. Tartar, A. Montreuil, J. Stedman, K. Kocher, H.P. Keller, R. Hiestand, P.C. and Movva, N.R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10735-10738
- 15 Friedman, J. and Weissman, I. (1991) *Cell* **66**, 799-806

- 16 Inoue, T. Yoshida, Y. Isaka, Y. and Tagawa, K. (1993) *BBRC* **190**, 857-863
- 17 Arber, S. Krause, K. and Caroni, P. (1992) *J. Cell. Biol.* **116**, 113-125
- 18 Price, E.R. Jin, M. Lim, D. Pati, S. Walsh, C.T. and McKeon, F.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3931-3935
- 19 Allain, F. Boutillon, C. Mariller, C. and Spik, G. (1995) *J. Immunol. Meth.* **178**, 113-120
- 20 Allain, F. Denys, A. and Spik, G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16537-16540
- 21 Allain, F., Denys, A. and Spik G. (1995) *J. Biol. Chem.*, in the press
- 22 Merrifield, R.B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2219-2225
- 23 Mitchell, A.R. Erickson, B.W. Ryabtsev, M.N. Hodges, R.S. and Merrifield, R.B. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7358-7362
- 24 Yamasaki, R.B. Vega, A. and Feeney, R.E. (1980) *Anal. Biochem.* **109**, 32-40
- 25 Friedman, J., Trahey, J. and Weissman, I. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6815-6819
- 26 Mikol, V. Kallen, J. and Walkinshaw, M.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5183-5186
- 27 Zierē, G.J. Van Dijk, M. Bijsterbosch, M.K. and Van Berkel, T.J.C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11229-11235
- 28 Schraufstätter, I.U., Min, M., Oades, Z.G., Barrit, D.S. and Cochrane C.G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10428-10431
- 29 Bang, H. Brune K., Nager C. and Feige U. (1993) *Experientia* **49**, 533-538

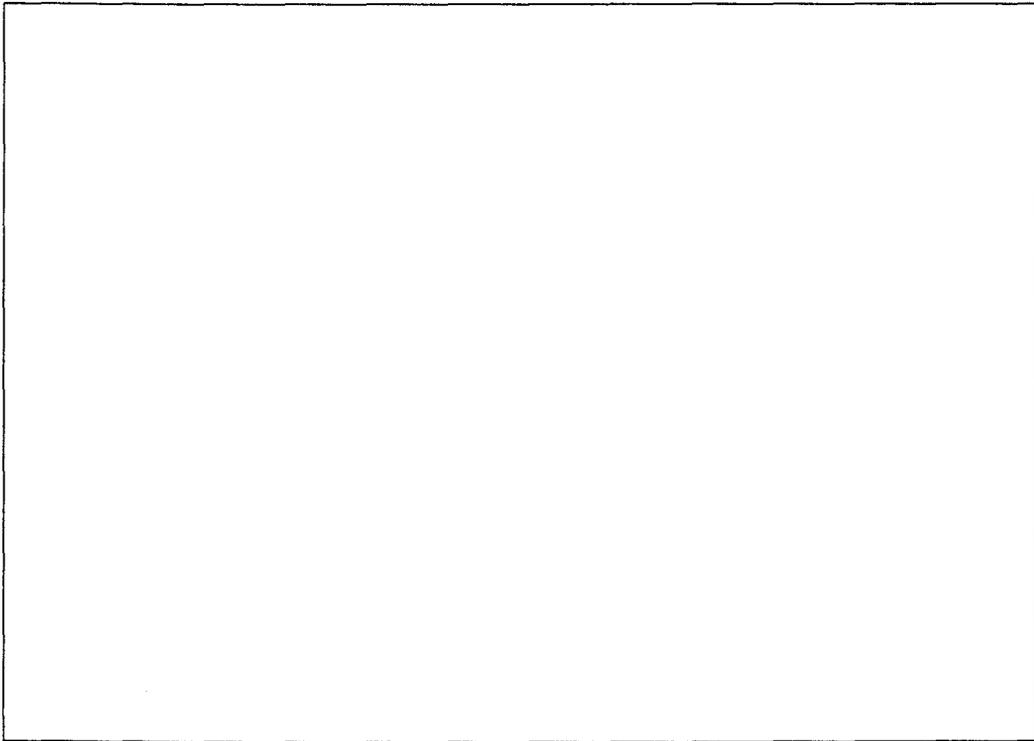
### III. Conclusion

Parmi les CyP A, B et C, seule la CyPB possède une fixation spécifique à la surface des cellules lymphoblastiques Jurkat. La localisation cytosolique de la CyPA concorde avec son absence de fixation sur les cellules Jurkat. Par contre, la CyPC montre une forte homologie de séquence avec la CyPB (70%) et possède un peptide signal lui permettant de rejoindre la voie de sécrétion. Mais elle ne se fixe pas au récepteur lymphocytaire montrant ainsi la spécificité de l'interaction CyPB/récepteur lymphocytaire.

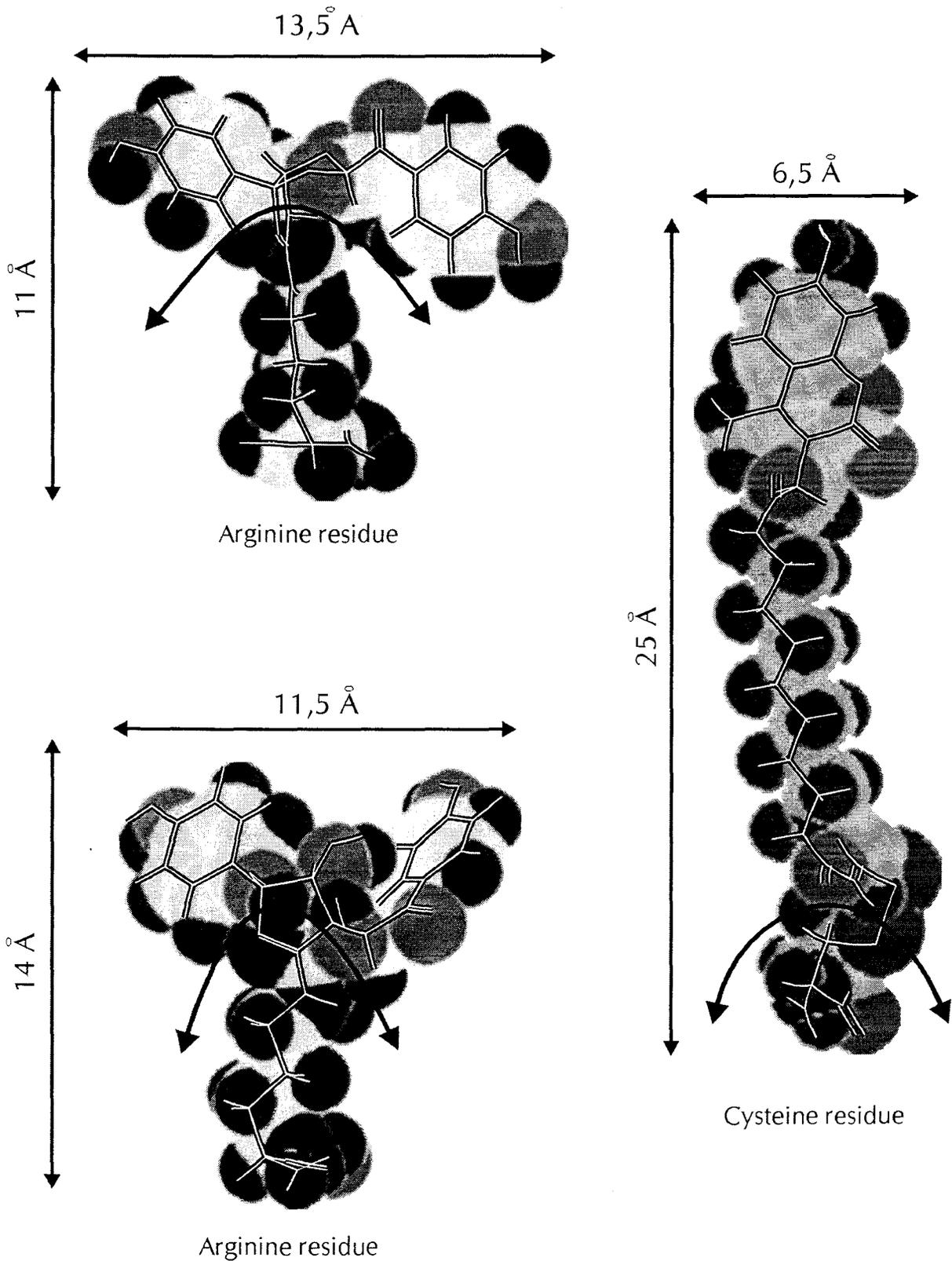
Le fait que des anticorps dirigés contre les extrémités N- ou C-terminales de la CyPB ne reconnaissent que cette CyP [Allain *et al.* (1995a)] montre que ces séquences sont spécifiques de la CyPB et qu'elles peuvent être reconnues à la surface de cette molécule. Des expériences de compétition utilisant des peptides de synthèse représentant ces séquences ont montré que les 25 premiers résidus d'acides aminés de la CyPB interviennent dans la reconnaissance du récepteur [Annexe 1, p. 161]. Une protéine chimérique comprenant ces 25 résidus d'acides aminés fusionnés à la CyPA a confirmé l'importance de cette séquence. L'utilisation de réactifs chimiques spécifiques laissait présager que le résidu Arg18 de la CyPB pouvait être essentiel à l'interaction avec le récepteur. Mais un mutant de la CyPB ne comprenant pas ce résidu n'a pas confirmé ce résultat. Il semble plutôt que ce soit l'encombrement stérique apporté par la modification chimique qui empêche la fixation [Annexe 2, p. 162].

La CyPB possède une séquence  $_{16}\text{DLR}_{18}$  proche de la séquence  $_{4}\text{ELR}_6$  nécessaire à la fixation de l'IL-8 à son récepteur. La CyPB partage d'ailleurs d'autres similitudes avec l'IL-8 notamment une homologie structurale qui fait que le dimère d'IL-8 est capable de fixer spécifiquement la CsA. Les acides aminés des cyclophilines impliqués dans la fixation de la CsA ont leur pendant dans l'IL-8. Malheureusement, le remplacement de la séquence  $_{16}\text{DLR}_{18}$  de la CyPB par la séquence DIA n'altère pas la fixation de cette protéine au récepteur. Il est à remarquer que la fixation de l'IL-8 à son récepteur nécessite la présence de deux sites d'interaction : la séquence  $_{4}\text{ELR}_6$  nécessaire à l'interaction et une séquence  $_{13}\text{YX}_{aa}\text{H}_{15}$  qui permet la fixation avec une forte affinité. Les travaux actuellement en cours sur la recherche du site d'interaction de la CyPB semble aussi montrer la présence d'une

seconde région de la protéine interagissant avec le récepteur. La détermination des résidus d'acides aminés de la séquence N-terminale impliqués et de l'éventuel second site d'interaction de la CyPB avec son récepteur constituent la suite de cette étude.



**Annexe 1 :** Molecular model of CyPB. The N-terminal sequence corresponding to the 25 first amino acid residues of CyPB is drawn in red.



**Annexe 2 :** Size of the modified amino acids arginine and cysteine. (a) and (b) are the two possible complexes formed by treatment of arginine with p-hydroxyphenylglyoxal. (c) Complex formed by labelling cysteine with AMCA-HPDP. In comparison, the overall shape of CyPB is globular with a dimension of 34 x 33 x 30 Å.

# Conclusion générale

---

La recherche d'une activité enzymatique pouvant catalyser l'isomérisation cis-trans des liaisons prolyls a débuté suite à la découverte de l'importance des résidus de proline dans la mise en conformation des protéines. Ainsi, en 1984 Fischer *et al.* mettent en évidence une activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique dans le rein de porc grâce à une technique basée sur la spécificité conformationnelle de la chymotrypsine. A la suite de ces travaux de nombreuses peptidyl prolyl cis-trans isomérases ont été identifiées et classées en différentes familles. Ainsi, la classe des peptidyl prolyl cis-trans isomérases se décline en trois familles de protéines : les cyclophilines, les FKBP(s) et les parvulines. Ces dernières récemment découvertes sont encore mal connues. Il n'existe que peu de données les concernant. Par contre, les cyclophilines et les FKBP(s) ont déjà fait l'objet de nombreuses investigations. Ainsi, il est clairement établi que la famille des cyclophilines comprend de nombreuses isoformes dont les séquences sont très conservées, tout au moins pour les cyclophilines solubles.

Indépendamment de leur activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique, les cyclophilines et les FKBP(s) en formant un complexe immunosuppresseur avec respectivement la CsA et le FK506 acquièrent une nouvelle fonction biologique. Ces complexes CyP(s)/CsA et FKBP(s)/FK506 ont permis d'explorer les signaux de transduction conduisant à l'activation des lymphocytes T. Cependant, peu de choses sont encore connues sur les rôles biologiques de ces protéines.

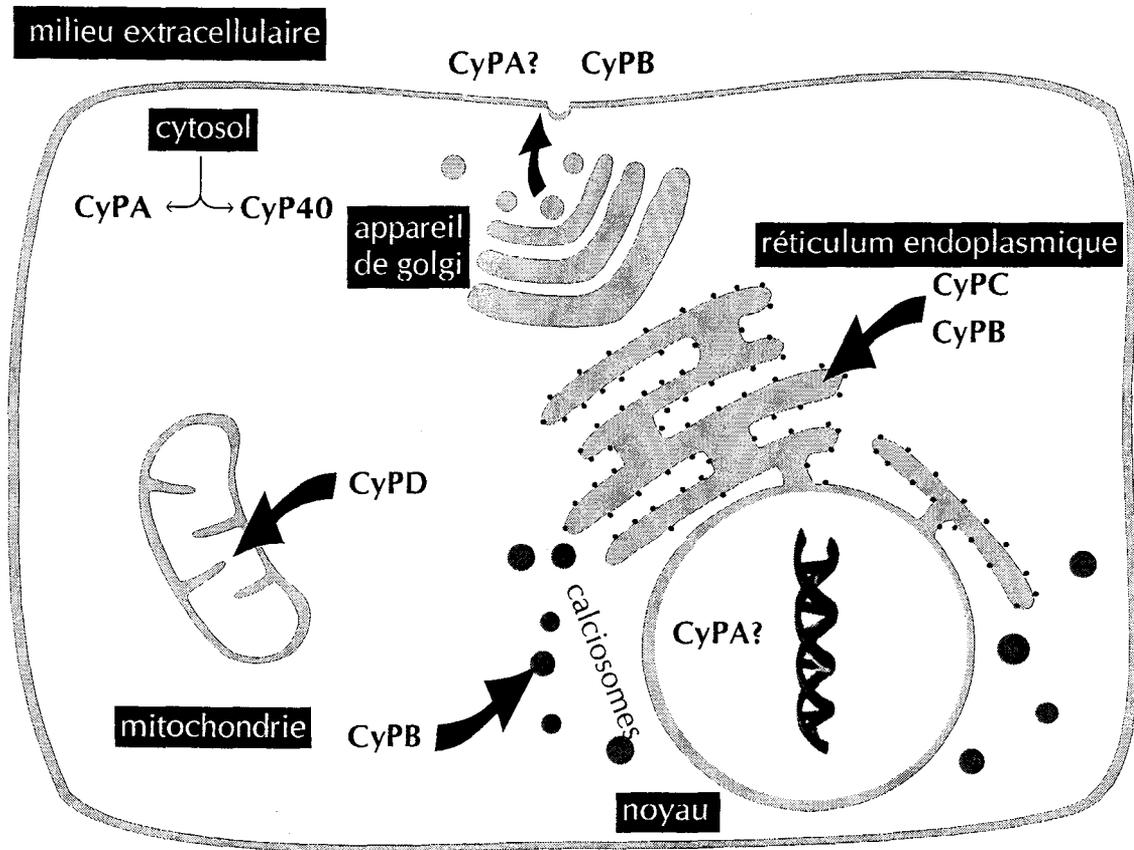
La fonction biologique d'une protéine est directement liée à sa localisation. Dans le cas des cyclophilines, la localisation dépend des différentes isoformes de cette famille. Ainsi, on distingue les cyclophilines solubles des cyclophilines membranaires. Les cyclophilines membranaires, la protéine ninaA et le NK-TR, sont les moins conservées des cyclophilines. Cependant, leur localisation est maintenant bien définie. Elle est en stricte relation avec le rôle qui leur est attribué. Ainsi, en ce qui concerne ninaA, la membrane du réticulum endoplasmique permet d'assurer la stabilité de la rhodopsine. Pour le NK-TR, la localisation au niveau de la membrane cytoplasmique facilite les mécanismes de reconnaissance et d'interaction des cellules NK avec leurs cibles.

En ce qui concerne les cyclophilines solubles, bien qu'elles soient beaucoup plus conservées, leurs rôles ainsi que leurs localisations ne sont pas toujours clairement établis. La CyPA est l'isoforme cytosolique la plus abondante des cyclophilines. Son intervention

dans les mécanismes d'immunosuppression provoqués par la CsA est clairement démontrée. De plus, récemment, Kruse *et al.* ont montré son importance dans la mise en conformation des protéines cytosoliques [Kruse *et al.* (1995)]. Cependant, même dans le cas de cette protéine largement étudiée, des différences concernant sa localisation cytoplasmique sont apparues. En effet, une activité chimiotactile a été montrée pour une forme extracellulaire de la CyPA [Sherry *et al.* (1992); Xu *et al.* (1992)]. De même, la présence de CyPA a été décrite dans le noyau [Ryffel *et al.* (1991)] et une activité nucléasique de la CyPA a été montrée [Montague *et al.* (1994)]. Récemment, il a été montré de nouveau la présence de CyPA dans le noyau de macrophages, les auteurs proposent même une fixation zinc-dépendante de la CyPA à l'ADN [Krummei *et al.* (1995)]. En ce qui concerne la CyPC, autre cyclophiline soluble, son rôle et sa localisation exacte restent inconnus à ce jour. La CyPC possède une séquence signal permettant sa translocation dans le réticulum endoplasmique comme le montrent les travaux de Bram *et al.* (1993). Le seul ligand identifié de la CyPC, la CyCAP, possède toutes les caractéristiques d'une protéine empruntant aussi la voie de sécrétion (séquence signal et glycosylation).

Au cours de nos travaux, nous nous sommes intéressés à la CyPB. Les différentes études visant à caractériser sa localisation et ses propriétés présentent de nombreuses divergences. Elles n'ont pas permis d'établir un modèle unique. La présence d'une séquence signal montre qu'il s'agit d'une protéine rejoignant la voie de sécrétion. Elle peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire comme le montrent nos travaux sur la purification de la CyPB à partir du lait de Femme [Spik *et al.* (1991)]. L'utilisation d'anticorps spécifiques a également permis de montrer sa présence dans le sang [Allain *et al.* (1995a)]. Par ailleurs, d'autres travaux ont clairement démontré la sécrétion de la CyPB par des cellules transfectées [Caroni *et al.* (1991), Price *et al.* (1994)]. Cependant, il semble que la CyPB soit également une protéine résidente d'un compartiment subcellulaire. Par fractionnement, elle a été identifiée dans la fraction correspondant au réticulum endoplasmique (Hasel *et al.* (1991)) et plus particulièrement dans le réticulum endoplasmique rugueux [Bose et Freedman (1994a)]. Toutefois ces techniques ne permettent pas de savoir si la protéine est résidente ou suit la voie de sécrétion. La démonstration du ciblage de la CyPB vers les calciosomes a confirmé l'existence d'un mécanisme de rétention [Arber *et al.* (1992)]. La séquence C-terminale VEKPFIAIKE de la CyPB permettrait le ciblage de la CyPB vers les calciosomes. En effet, lorsque cette séquence est placée à l'extrémité C-terminale d'une

protéine normalement sécrétée, celle-ci est alors localisée dans le même compartiment que la CyPB. L'hypothèse d'une CyPB séquestrée dans des vésicules spécialisées est confortée par la découverte d'un ligand intracellulaire de la CyPB : la CAML [Bram et Crabtree (1994)]. La répartition de la CAML coïncide avec celle observée par Arber *et al.* (1992) pour la CyPB.



**Figure 23 :** Localisation subcellulaire des principales cyclophilines

Dans la seconde partie de nos travaux, nous avons recherché les particularités de la CyPB sécrétée dans le lait de Femme. En effet, la présence de la séquence  $_{116}\text{NGS}_{118}$  suggère qu'elle peut être glycosylée montrant ainsi qu'il s'agit d'une protéine destinée à la sécrétion. La spectrométrie de masse en mode « electrospray » a été choisie comme outil d'investigation car elle permet la mise en évidence de modifications post-translacionnelles des protéines avec une grande précision et une grande sensibilité. Aucune glycosylation de la CyPB n'a été observée. Par contre, il apparaît que la CyPB est sécrétée dans le lait de Femme sous une

forme tronquée. Cette forme tronquée est dépourvue des cinq résidus d'acides aminés C-terminaux AIAKE. L'existence d'une forme extracellulaire de la CyPB sans la séquence AIAKE permet de concilier les deux localisations observées pour la CyPB. La forme résidente de la CyPB posséderait l'extrémité C-terminale AIAKE nécessaire à son ciblage vers les calciosomes. Par contre, la forme sécrétée n'aurait pas ce signal et pourrait suivre la voie de sécrétion jusqu'au milieu extracellulaire. Cela suppose l'existence d'un mécanisme permettant d'obtenir ces deux formes de la CyPB. Il est possible que la sécrétion de la CyPB puisse résulter soit du clivage de l'extrémité C-terminale par une protéase spécifique soit de l'existence d'un épissage alternatif de l'ARN messager de la CyPB. En effet, un tel mécanisme d'épissage alternatif est observé pour la production des trois formes de NK-TR [Rinfret et Anderson (1993)]. Il n'a été observé pour l'instant qu'un seul transcrit pour la CyPB dans les cellules Jurkat [Bergsma *et al.* (1991)].

Les hypothèses concernant la(les) fonction(s) de la CyPB sont nombreuses. Son activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique et sa présence dans le réticulum endoplasmique en font une candidate idéale pour assister la mise en conformation des protéines sécrétées. Le traitement par la CsA de cellules en culture provoque un retard ou une inhibition de la sécrétion de certaines protéines comme le collagène ou la transferrine [Lodish et Kong (1991); Steinmann *et al.* (1991)]. En effet, la CsA en inhibant la CyPB provoquerait un retard de la mise en conformation de ces protéines. De même, la CsA induit une sécrétion accrue de la CyPB. La CyPB pourrait entrer en compétition avec les protéines avec lesquelles interagit la CyPB dans le réticulum endoplasmique favorisant ainsi la sécrétion accrue de la CyPB [Price *et al.* (1994)]. Enfin, ces preuves indirectes ont été confirmées par la mise en évidence d'une association de la CyPB et de la hsp47 avec le procollagène le long de la voie de sécrétion [Smith *et al.* (1995)]. Les mucines sont comme le collagène des protéines riches en résidus de proline et destinées à être sécrétées. Dans le cadre d'une collaboration, nous avons été amené à rechercher une possible action de la CyPB sur la O-glycosylation des mucines car la conformation de la chaîne peptidique pourrait affecter ce mécanisme [Tetaert *et al.* (1994)]. Les premiers travaux n'ont utilisé que des peptides de petite taille représentant des séquences connues d'apomucines et il n'a pas pu, pour l'instant, être montré une influence de la CyPB *in vitro*. L'utilisation de peptides de plus grande taille devrait constituer un modèle plus adéquat.

Par contre, la découverte de la CAML, ligand intracellulaire de la CyPB, suggère une autre fonction pour la CyPB en relation avec une localisation dans les calciosomes. En effet, la CAML est directement impliquée dans la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. La CyPB pourrait intervenir dans la modulation de ce mécanisme. Cette fonction de la CyPB est à mettre en relation avec un rôle du FKBP12 car il est capable de s'associer avec le RyR et l'IP3R, tous deux également impliqués dans la libération de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La mise en évidence d'un récepteur lymphocytaire pour la CyPB [Allain *et al.* (1994b)] confirme la validité d'une forme extracellulaire de la CyPB. Cette découverte permet d'entrevoir de nouvelles fonctions pour la CyPB en tant que protéine délivrant un signal aux cellules cibles.

La troisième partie de nos travaux a donc consisté à caractériser le site d'interaction de la CyPB avec son récepteur lymphocytaire. Cette interaction CyPB/récepteur s'est révélée être réellement spécifique de la CyPB. En effet, ni la CyPA ni la CyPC n'ont d'affinité pour ce récepteur malgré leurs fortes homologues de séquences ou de structures. La recherche des régions spécifiques de la CyPB et l'utilisation de peptides de synthèse a permis de montrer que les 25 premiers résidus d'acides aminés de la CyPB sont impliqués dans l'interaction avec le récepteur de la CyPB. Une cyclophiline chimérique CyP B/A comportant cette séquence a confirmé ce résultat. L'étude de la modification spécifique des résidus d'arginine suggère que le site d'interaction de la CyPB se situe à proximité du résidu Arg18. Cette notion de récepteur spécifique de la CyPB permet d'établir de nombreux parallèles entre la CyPB extracellulaire et l'IL-8 notamment en ce qui concerne la structure tridimensionnelle, la fixation de la CsA et les affinités comparables pour leurs récepteurs respectifs. L'IL-8 se caractérise notamment par la présence de deux sites d'interaction avec son récepteur. Ces deux sites sont nécessaires pour obtenir une fixation de forte affinité. Au vu de la faible affinité obtenue pour la protéine chimérique CyP B/A, cette possibilité n'est pas à exclure pour la CyPB.

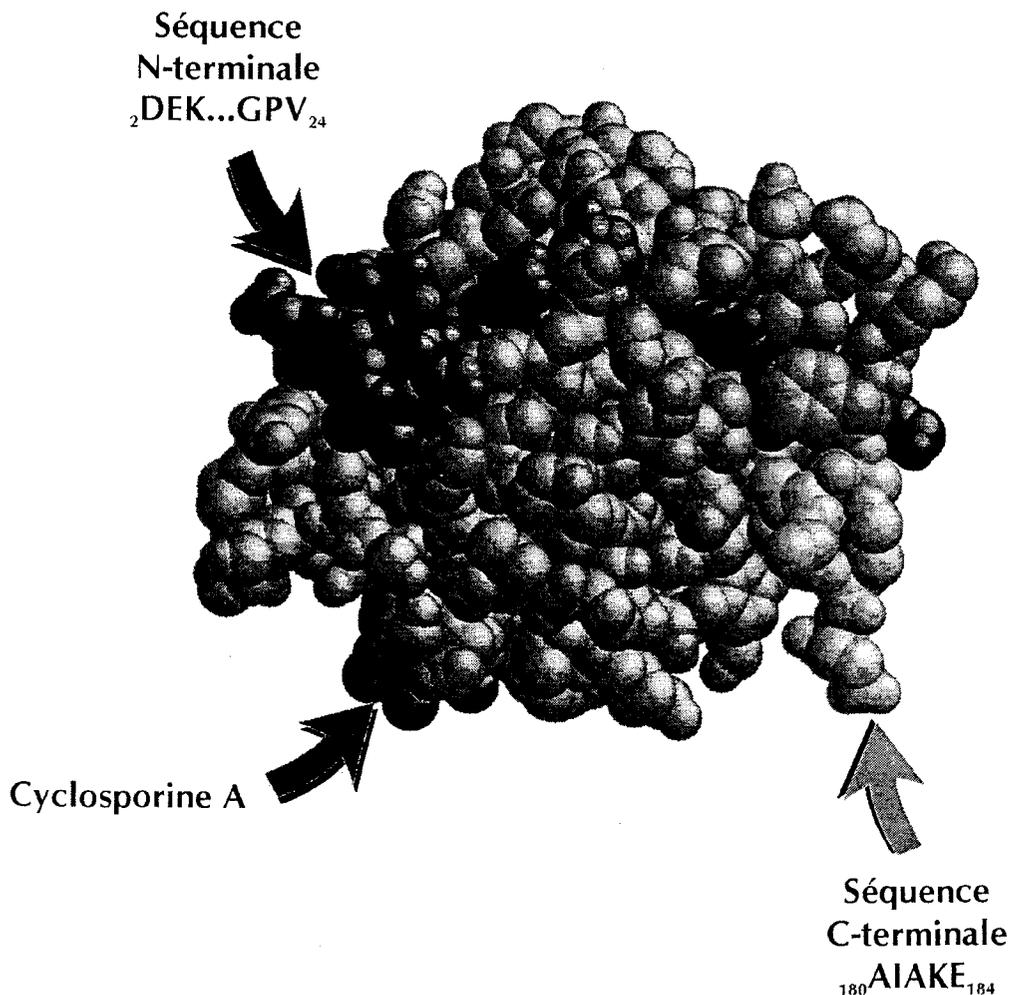
Il existe également une forme extracellulaire du FKBP12, libérée par les mastocytes, capable de provoquer des variations du flux calcique intracellulaire chez les neutrophiles. Il apparaît logique de penser que ce FKBP12 extracellulaire a besoin d'un récepteur membranaire spécifique pour déclencher ces événements intracellulaires [Bang *et al.* (1995)]. Ces observations ouvrent un champ d'investigation considérable pour la recherche

d'événements intracellulaires pouvant être provoqués par la fixation de la CyPB à son récepteur, notamment en ce qui concerne les variations des flux calciques intracellulaires. En effet, il est à remarquer que dans plusieurs cas, l'interaction de peptidyl prolyl cis-trans isomérase avec d'autres protéines implique des modifications du flux calcique intracellulaire.

En conclusion, nos travaux ont montré que la CyPB peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire. Cette protéine se caractérise d'abord par son activité peptidyl prolyl cis-trans isomérasique. D'autre part, il semble que La CyPB possède d'autres propriétés impliquant différentes régions de la protéine. Tout d'abord, l'extrémité C-terminale de la CyPB conduit à une rétention de la CyPB dans des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique, les calciosomes. En accord avec les travaux de Arber *et al.* (1992), nous proposons la séquence AIAKE comme signal de rétention de la CyPB car la forme sécrétée de cette protéine ne possède pas cette séquence. Cette CyPB extracellulaire possède un récepteur spécifique à la surface des lymphocytes. Le site d'interaction de la CyPB avec ce récepteur semble quand à lui localisé dans la partie N-terminale de la CyPB. Ces observations font que la CyPB apparaît comme une protéine comportant plusieurs régions impliquées dans des rôles distincts et complexes [Figure 24, p. 169].

De nombreux travaux restent à réaliser concernant la caractérisation de l'interaction CyPB/récepteur. Une meilleure connaissance du mécanisme de reconnaissance pourrait permettre de rapprocher ce système d'autres modèles connus. Il apparaît pour cela nécessaire de caractériser complètement le site d'interaction de la CyPB. Les résidus d'acides aminés de l'extrémité N-terminale de la CyPB directement impliqués dans l'interaction avec le récepteur peuvent être caractérisés grâce à la mutagenèse dirigée. Ces travaux de mutagenèse dirigée ont déjà été engagés. De même, l'utilisation de CyPB chimériques devrait nous permettre de vérifier l'existence d'un deuxième site d'interaction sur la CyPB comme cela a déjà été montré avec plusieurs cytokines telles que l'IL-1 ou l'IL-8.

La suite logique de ces travaux consiste en la recherche des événements déclenchés par la fixation de la CyPB sur son récepteur. La détermination des signaux de transduction induits tels que l'augmentation de la concentration cytosolique en  $\text{Ca}^{2+}$  ou la phosphorylation de protéines devrait permettre d'orienter la recherche d'un effet biologique de la CyPB. Une meilleure caractérisation du récepteur apparaît également nécessaire pour déterminer la fonction de la CyPB. Sa purification en quantité suffisante pour réaliser un séquençage chimique partiel devrait, dans un premier temps, nous permettre de rechercher des homologues avec des récepteurs connus puis ensuite d'entreprendre son clonage. Le site enzymatique de la CyPB ne semble pas impliqué dans l'interaction avec le récepteur. Cependant, il n'est pas exclu que l'activité peptidyl prolyl cis-trans isomérisique de la CyPB puisse servir à la transmission d'une information. L'utilisation d'inhibiteurs tels que la CsA devrait permettre la mise en évidence de mécanismes utilisant cette activité.



**Figure 24 :** Modèle moléculaire de la cyclophiline B représentant les différentes régions importantes de la protéine

# **Appendice technique**

---

Cet appendice technique a pour but de décrire les techniques employées au cours des travaux présentés et qui ne sont pas ou partiellement décrites dans les matériels et méthodes des articles présentés.

## I. Purification de la cyclophiline B à partir du lait de Femme

Le lait humain provient du Lactarium régional (Institut Pasteur, Lille). Il a été collecté à partir de mères à différents stades de lactation et congelé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pour le fractionnement, 20 l de lait de Femme sont décongelés lentement à  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  puis délipidés par centrifugation à 10 000 g pendant 30 min. Le lait délipidé est mis sous agitation par hélice pendant 1 nuit avec 50 g de SP-Sephadex C50 (Pharmacia). La résine est récupérée par filtration sur Büchner et rincée par une solution d'acétate de sodium 0,22 M. Elle est ensuite éluée par des fractions discontinues d'acétate de sodium de concentration 0,3 M, 0,6 M et 3 M. Le repérage de la fraction contenant la CyPB est réalisé grâce à la méthode ELISA décrite plus loin dans ce chapitre. La fraction intéressante (normalement la fraction 0,3 M) est chromatographiée sur une colonne de S-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) (5 x 10 cm). L'élution est obtenue par des fraction de 500 ml d'acétate de sodium 0,22 M, 0,4 M, 0,6 M et 1,5 M. La fraction contenant la CyPB est repérée de même manière que précédemment, il s'agit généralement de la fraction 0,6 M. Elle est ensuite concentrée par ultrafiltration sur membrane Amicon YM-5 (seuil de coupure : 5 kDa) jusqu'à un volume compris entre 10 et 15 ml. L'échantillon concentré est chromatographié par gel filtration sur une colonne de Sephacryl S200 HR (Pharmacia) (3,5 x 100 cm) dans le tampon  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,1 M. L'élution des protéines totales est suivie à 280 nm et celle de la CyPB est suivie grâce à la méthode ELISA. Les fractions renfermant de la CyPB sont rassemblées et dialysées contre du tampon phosphate 20 mM, pH 6,5. La solution de protéines est déposée en continu sur une colonne Mono S 10/10 (Pharmacia). L'élution est réalisée par un gradient de tampon phosphate 20 mM, NaCl 1M à l'aide d'un appareil FPLC (Pharmacia). La fraction contenant la CyPB est repérée par la méthode ELISA. L'identification de la CyPB est ensuite confirmée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et électrotransfert sur nitrocellulose pour immunorévélation. Toutes les étapes de la purification à l'exception de la chromatographie par FPLC sont réalisées à  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## II. Production de la cyclophiline B recombinante et des cyclophilines B mutantes

### A. Cultures des bactéries transformées

Une collaboration entreprise avec le lycée technique Valentine Labbé a permis la culture de la souche d'*Escherichia coli* produisant la CyPB en fermenteur de 2l (Biolafitte). Le plasmide d'expression de la CyPB est le pKK233-2 (Pharmacia) et sa construction est décrite dans la première partie des travaux personnels. La bactérie compétente EC682 provient des Laboratoires Sandoz. Elle est sensible à l'ampicilline et déficiente dans l'opéron lactose.

Les bactéries transformées sont cultivées dans le milieu LB (tryptone : 10 g/l; extrait de levure; NaCl : 5 g/l; MgSO<sub>4</sub> : 2,46 g/l), en présence d'ampicilline à 10 mg/ml. La culture est réalisée à 37 °C et à pH 7,2 sous une alimentation continue en glucose stérile. Le suivi de la culture est obtenu par la mesure de l'absorbance à 600 nm. Quand cette absorbance est de 3, l'induction de l'expression est provoquée par addition d'IPTG jusqu'à une concentration finale de 10<sup>-3</sup> M. La fermentation est poursuivie pendant trois heures dans les mêmes conditions.

Les protéines mutantes CyPB<sup>L17I; R18A</sup> et CyP B/A ont été produites de la même manière sauf que les cultures ont été réalisées en flacon de 1,5 l sous agitation. L'addition d'IPTG est effectuée lorsque la culture atteint une absorbance de 3 à 600 nm, puis cette culture est poursuivie pendant quatre heures.

### B. Purification de la cyclophiline B recombinante

Le moût de fermentation est centrifugé pendant 30 min à 3000 g. Le culot de bactéries est resuspendu dans le tampon PBS/EDTA 1 mM, pH 7,2 pour être centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions. La manipulation est répétée trois fois. Le culot bactérien est récupéré dans 40 ml de tampon PBS/EDTA 10 mM, pH 7,4. Les structures membranaires des bactéries sont détruites par quatre cycles d'ultrasons de trois minutes réalisés sur glace. Le lysat est centrifugé à 10 000 g pendant 60 min pour pouvoir récupérer le surnageant libre de débris cellulaires. Le surnageant est dialysé pendant 72 h à 4 °C contre un tampon phosphate 20 mM, pH 6,5. La solution de protéines est de nouveau centrifugée à 10 000g pendant 60 min puis filtrée sur filtre Millipore 0,22 µm. Cette solution est passée sur une

colonne Mono S HR 10/10 et est ensuite éluée par un gradient discontinu en NaCl 1M grâce à un appareil FPLC . Les différentes fractions sont testées par une méthode ELISA utilisant des anticorps anti-CyPB décrite plus loin dans cet appendice. La présence de la cyclophiline est confirmée par électrophorèse en gel de polyacrylamide et électrotransfert sur nitrocellulose pour immunorévélation. Les protéines mutantes CyPB<sup>L17I, R18A</sup> et CyP B/A ont été purifiées suivant le même protocole à la légère différence que pour la CyP B/A le pH du tampon de dialyse et d'élution sur la colonne Mono S a été ajusté à 6,0 car la CyPA possède un pI inférieur à celui de la CyPB.

### III. Analyse des protéines

#### A. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les échantillons sont préparés par précipitation des protéines par l'acide trichloroacétique à 10 %. Le culot est lavé deux fois par de l'éthanol distillé puis séché sous azote. Les échantillons sont repris dans un tampon échantillon d'électrophorèse Tris/HCl 10 mM, pH 8,8, SDS 10 %, glycérol 10 %, bleu de bromophénol et chauffés à 100 °C pendant cinq minutes avant analyse.

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont réalisées dans un appareil vertical en plaques (1,5 x 140x 160 mm) (Hoeffer Scientific Instruments) dans le système tampon décrit par Laemmli (1970). Le gel de séparation possède une réticulation de 15 % (tampon Tris/HCl, pH 8,8) et celui de concentration une réticulation de 5 % (tampon Tris/HCl , pH 6,8). Le tampon de migration et les gels contiennent 0,1 % de SDS. L'électrophorèse est réalisée à 150 V sous réfrigération dans un tampon Tris/glycine/SDS (25 mM/200 mM/0,1%), pH 8,6. Après migration, les protéines sont révélées par le bleu de Coomassie ou transférées sur membrane de nitrocellulose.

#### B. Electrotransfert sur membrane de cellulose

Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose 0,45  $\mu$ M (Schleicher et Schull). selon la technique décrite par Towbin *et al.* (1979) dans un tampon Tris 25 mM, glycine 200 mM, méthanol 20 %, pH 8,4. L'électrotransfert est réalisé à 75 mA pendant une nuit à 4 °C.

### C. Détection des protéines transférées par immunorévélation

La membrane de nitrocellulose est saturée par une solution de PBS/Tween 20 2 %, pH 7,4 pendant 1 h à température ambiante. La membrane est ensuite lavée trois fois pendant cinq minutes par une solution PBS/Tween 20 0,05 %. Elle est ensuite incubée pendant 2h dans une solution PBS/TWEEN 20 %, pH 7,4 contenant le premier anticorps. Le repérage et l'identification de la CyPB au cours de sa purification à partir du lait de Femme ont été réalisés avec l'anticorps anti-CyPB (10 µg/ml). Par contre, pour le repérage lors de la purification de la CyPB recombinante, c'est l'anticorps dirigé contre le peptide C-terminal de la CyPB (10 µg/ml) qui a été utilisé. En effet, l'anticorps anti-CyPB totale a été obtenu à partir de CyPB recombinante exprimée et purifiée à partir d'*Escherichia coli*. Des contaminants de la protéine purifiée, même en très faible quantité, pourrait provoquer l'apparition de faux positifs lors d'un fractionnement à partir d'*Escherichia coli*. Après une nouvelle série de lavages par le PBS/Tween 20 0,05%, la membrane est incubée pendant deux heures en présence d'anticorps anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase (dilution au 1/2500 dans le PBS/Tween 20 0,05%) (Diagnostic Pasteur). Après lavage par le PBS (3 x 5 min), les protéines sont révélées par la diamino-benzidine (DAB) 0,04%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% dans le tampon PBS, pH 7,4.

### D. Détection de la cyclophiline B par la méthode ELISA

Au cours du fractionnement du lait de Femme, l'élution de la CyPB est suivie grâce à une méthode ELISA (« enzyme linked immunosorbent assay ») développée au laboratoire [Allain *et al.* (1995)]. Les fractions à doser sont diluées dans le tampon carbonate de sodium 20 mM, pH 9,6 puis déposées sur plaque ELISA et incubées une nuit à 4 °C. Après rinçage par le tampon PBS/Tween 0,05%, les puits sont saturés par une solution PBS/gélatine 2% pendant une heure à 37°C. Après rinçage, les anticorps anti-CyPB (100 µl) sont ajoutés à chaque puits et incubés pendant deux heures à 37°C. Puis, après rinçage, les anticorps anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase (dilution au 1/2500 dans le PBS/Tween 20 0,05%) sont ajoutés. La révélation est réalisée par l'ortho-phenyl diamine (Sigma Chemical Co) (4 mg dans 10 ml de tampon PBS/citrate pH 5,5, 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L'absorbance est mesurée à 490 nm.

# Bibliographie

---

le signe © indique les revues générales.

- 
- Allain F., Denys A. & Spik G. (1994) Characterization of surface binding sites for cyclophilin B on a human tumor T-cell line *J. Biol. Chem.* **269**, 16537-16540
  - Allain F., Boutillon C., Mariller C. & Spik G. (1995a) Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies *J. Immunol. Meth.* **178**, 113-120
  - Allain F., Denys A. & Spik G. (1995b) Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-lymphocytes through its specific binding to the cell surface *J. Biol. Chem.*, sous presse
  - Altschuh D., Vix O., Rees B. & Thierry J-C. (1992) A conformation of cyclosporin A in aqueous environment revealed by the X-ray structure of a cyclosporin-Fab complex *Science* **256**, 92-94
  - Anderson S.K., Gallinger S., Frey J., Young H.A. & Ortaldo J.R. (1993) A cyclophilin-related protein involved in the function of the natural killer cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 542-546
  - Andreeva L. & Crompton M. (1994) An ADP-sensitive cyclosporin-A binding protein in rat liver mitochondria *Eur. J. Biochem.* **221**, 261-268
  - Andreeva L., Tanveer A. & Crompton M. (1995) Evidence for the involvement of a membrane-associated cyclosporin-A-binding protein in the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated inner membrane pore of heart mitochondria *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **230**, 1125-1132
  - Anfinsen C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains *Science* **181**, 737-749
  - Arber S., Krause K. & Caroni P. (1992) S-cyclophilin is retained intracellularly via a unique COOH-terminal sequence and colocalizes with the calcium storage protein calreticulin *J. Cell. Biol.* **116**, 113-125
  - Armstrong D.L. (1989) Calcium channel regulation by calcineurin, a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated phosphatase in mammalian brain *TIBS* **12**, 117-122
  - Bächinger H.P. (1987) The influence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase on the *in vitro* folding of type III collagen *J. Biol. Chem.* **262**, 17144-17148

- Baker E.K., Colley N.J. & Zuker C.S. (1994) The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex *in vivo* with its protein target rhodopsin *EMBO J.* 13, 4886-4895
- Bang H., Brune K., Nager C. & Feige U. (1993) Interleukin 8 is a cyclosporin A binding protein *Experientia* 49, 533-538
- Bang H., Müller W., Hans M., Brune K. & Swandulla D. (1995) Activation of Ca<sup>2+</sup> signalling in neutrophils by the mast cell-released immunophilin FKBP12 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3435-3438
- Bergsma D.J., Eder C., Gross M., Kersten H., Sylvester D., Appelbaum E., Cusimano D., Livi G.P., McLaughlin M.M., Kasyan K., Porter T.G., Silverman C., Dunnington D., Hand A., Prichett W.P., Bossard M.J., Brandt M. & Levy M.A. (1991) The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerase *J. Biol. Chem.* 266, 23204-23214
- ✪ Bierer B.E. (1994) Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: Binding to immunophilins and biological action *Chem. Immunol.* 59, 128-155
- Bierer B.E., Holländer G., Fruman D. & Burakoff S.J. (1993) Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology *Curr. Opinion Immunol.* 5, 763-773
- Bierer B.E., Mattila P.S., Standaert R.F., Herzenberg L.A., Burakoff S.J., Crabtree G. & Schreiber S.L. (1990) Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9231-9235
- Bole D.G., Hendershot L.M. & Kearny J.F. (1986) Post-translational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains is nonsecreting and secreting hybridomas *J. Cell. Biol.* 102, 1558-1566
- Bonnefoy-Berard N., Genestier L., Flacher M. & Revillard J-P (1994) The phosphoprotein phosphatase calcineurin controls calcium-dependant apoptosis in B cell lines *Eur. J. Immunol.* 24, 325-329

- 
- ⊛ Borel J.F., Feurer C., Gubler H.U. & Stähelin H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent *Agents & Actions* **6**, 468-475
  - Bose S. & Freedman R.B. (1994a) Peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity associated with the lumen of the endoplasmic reticulum *Biochem. J.* **300**, 865-870
  - Bose S., Mucke M. & Freedman R.B. (1994b) The characterization of a cyclophilin-type peptidyl prolyl cis-trans isomerase from the endoplasmic reticulum *Biochem. J.* **300**, 871-875
  - Bossard M.J., Bergsma D.J., Brandt M., Livi G.P., Eng W.-K., Johnson R.K. & Levy M.A. (1994) Catalytic and ligand binding properties of the FK506 binding protein FKBP12: Effects of the single amino acid substitution of Tyr82 to Leu *Biochem. J.* **297**, 365-372
  - Bram R.J., Hung D.T., Martin P.K., Schreiber S.L. & Crabtree G.R. (1993) Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: Roles of calcineurin binding and cellular location *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4760-4769
  - Bram J.B. & Crabtree G.R. (1994) Calcium signalling in T-cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein *Nature* **371**, 355-358
  - ⊛ Brandl C.J. & Deber C.M. (1986) Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 917-921
  - Brandts J.F., Halvorson H.R. & Brennan M. (1975) Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues *Biochemistry* **14**, 4953-4963
  - Breiman A., Fawcett T.W., Ghirardi M.L. & Mattoo A.K. (1992) Plant organelles contain distinct peptidylprolyl cis,trans-isomerases *J. Biol. Chem.* **267**, 21293-21296
  - Brown E.J., Albers M.W., Shin T.B., Ichikawa K., Keith C.T., Lane W.S. & Schreiber S.L. (1994) A mammalian protein targeted by G1-arrested rapamycin-receptor complex *Nature* **369**, 756-758
  - Buchholz W.G., Harris-Haller L., DeRose R.T. & Hall T.C. (1994) Cyclophilins are encoded by a small gene family in rice *Plant Mol. Biol.* **25**, 837-843

- 
- Bush K.T., Hendrickson B.A. & Nigam S.K. (1994) Induction of the FK506-binding protein, FKBP13, under conditions which misfold proteins in the endoplasmic reticulum *Biochem. J.* 303, 705-708
  - Cacalano N.A., Chen B-X., Cleveland L. & Erlanger B.F. (1992) Evidence for a functional receptor for cyclosporin A on the surface of lymphocytes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4353-4357
  - Cafferkey R., Young P.R., McLaughlin M.M., Bergsma D.J., Koltin Y., Sathe G.M., Faucette L., Eng W., Johnson R.K. & Livi G.P. (1993) Dominant missence mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity *Mol. Cell. Biol.* 13, 6012-6023
  - Callebaut I., Renoir J-M., Lebeau M-C, Massol N., Burny A., Baulieu E-E & Mornon J-P (1992) An immunophilin that binds Mr 90, 000 heat shock protein: Main structural features of a mammalian p59 protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6270-6274
  - Calvo V., Crews C.M., Vik T.A. & Bierer B.E. (1992) Interleukin-2 stimulation of p70 kinase activity is inhibited by the immunosuppressant rapamycin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7571-7575
  - Cameron A.M., Steiner J.P., Sabatini D.M., Kaplin A.J., Walensky L.D. & Sneider S.H. (1995) Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor modulates calcium flux *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1784-1788
  - ✪ Cantrel D.G. (1994) G protein in lymphocyte signaling *Curr. Opinion Immunol.* 6, 380-384
  - Cardenas M.A., Heim E. & Heitman J. (1995) Mutations that perturb cyclophilin A ligand binding pocket confer cyclosporin A resistance in *saccharomyces cerevisiae* *J. Biol. Chem.* 270, 20997-21002
  - Caroni P., Rothenfluh A., McGlynn E. & Schneider C. (1991) S-cyclophilin : New member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway *J. Biol. Chem.* 266, 10739-10742
  - Caron-Leslie L. & Cidlowski J. (1991) Similar actions of glucocorticoids and calcium on the regulation of apoptosis in S49 cells *Mol. Endocrinol.* 5, 1169-1179

- Celis J.E., Dejgaard K., Madsen P., Leffers H., Gesser B., Honore B., Rasmussen H.H., Olsen E., Lauridsen J.B., Ratz G., Mouritzen S., Basse B., Hellerup M., Celis A., Puype M., van Damne J. & Vandekerckhove J. (1991) The MRC-5 human embryonal lung fibroblast two-dimensional gel cellular protein database: Quantitative identification of polypeptides whose relative abundance differs between quiescent, proliferating and SV40 transformed cells *Electrophoresis* 11, 1072-1113
- Chazin W.J., Kördel J., Drakenberg T., thulin E., Brodin P., Grundström & Forsen S. (1989) Proline isomerism leads to multiple folded conformations of calbindin D9k: Direct evidence from two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectroscopy *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2195-2198
- Chen H.C., Li X-L & Ljungdahl L.G. (1995) A cyclophilin from the polycentric anaerobic rumen fungus *Orponomyces* sp. strain PC-2 is highly homologous to vertebrate cyclophilin B *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2587-2591
- Chiu M.I., Katz H. & Berlin V. (1994) RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12574-12578
- Chothia C. & Janin J. (1982) Orthogonal packing of  $\beta$ -pleated sheets in proteins *Biochemistry* 21, 3955-3965
- Clipstone N.A. & Crabtree G.R. (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation *Nature* 357, 695-697
- Clipstone N.A., Fiorentino D.F. & Crabtree G.R. (1994) Molecular analysis of the interaction of calcineurin with drug-immunophilin complex *J. Biol. Chem.* 269, 26431-26437
- Clore G.M., Appella E., Yamada M., Matsushima K. & Grononborn A.M. (1990) Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution *Biochemistry* 29, 1689-1696
- Clubb R.T., Thanabal V., Fejzo J., Ferguson S.B., Zydowsky L., Hunter Baker C., Walsh C.T. & Wagner G. (1993) Secondary structure and backbone resonance assignments of the periplasmic cyclophilin type peptidyl-prolyl isomerase from *Escherichia coli* *Biochemistry* 32, 6391-6401

- 
- Clubb R.T., Ferguson S.B., Walsh C.T. & Wagner G. (1994) Three-dimensional solution structure of *Escherichia coli* periplasmic cyclophilin *Biochemistry* **33**, 2761-2772
  - Colley N.J., Baker E.K., Stamnes M.A. & Zuker C.S. (1991) The cyclophilin homolog ninaA is required in the secretory pathway *Cell* **67**, 255-263
  - Connern C.P. & Halestrap A.P. (1992) Purification and N-terminal sequence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin *Biochem. J.* **284**, 381-385
  - Connern C.P. & Halestrap A.P. (1994) Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel *Biochem. J.* **302**, 321-324
  - Crompton M., Ellinger H. & Costi A. (1988) Inhibition of cyclosporin A of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress *Biochem. J.* **255**, 357-360
  - Dalgarno D.C., Harding M.W., Lazarides A., Handschumacher R.E. & Armitage I.M. (1986)  $^1\text{H}$  NMR studies on bovine cyclophilin: Preliminary structural characterization of this specific cyclosporin A binding protein *Biochemistry* **25**, 6778-6784
  - Davis E.S., Becker A., Heitman J., Hall M.N. & Brennan M.B. (1992) A yeast cyclophilin gene essential for lactate metabolism at high temperature *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11169-11173
  - Davis T.R., Tabatabai L., Bruns K., Hamilton R.T. & Nilsen-Hamilton M. (1991) Basic fibroblast growth factor induces 3T3 fibroblasts to synthesize and secrete a cyclophilin-like protein and  $\beta$ 2-microglobulin *Biochem. Biophys. Acta* **1095**, 145-152
  - De Martin R. & Philipson L. (1991) The gene for cyclophilin (peptidyl prolyl cis-trans isomerase) from *Schizosaccharomyces pombe* *Nucl. Acids. Res.* **18**, 4917
  - Delmas O. (1988) Les facteurs de croissance du lait de Femme : Chromatographie d'affinité sur héparine; Chromatographie d'échange de cations : Isolement et caractérisation d'un facteur de croissance analogue à la cyclophiline *Thèse d'université*, Lille

- 
- Denesyuk A.I., Korpela T., Lundell J., Sara R. & Zav'yalov V.P. (1993) Comparison of conformations of cyclosporin A and macrolide FK506 fragments: Localization of putative binding sites with phosphatase calcineurin *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **194**, 280-286
  - Dumont F.J., Melino M.R., Staruch M.J., Koprak S.L., Fischer P.A. & Sigal N.H. (1990) The immunosuppressive macrolides FK506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells *J. Immunol.* **144**, 1418-1424
  - Durette P.L., Boger J., Dumont R., Firestone R., Frankshun R.A., Koprak S.L., Lin C.S., Melino M.R., Pessolano A.A., Pisano J., Schmidt J.A., Sigal N.H., Staruch M.J. & Witzel B.E. (1988) A study of the correlation between cyclophilin binding and *in vitro* immunosuppressive activity of cyclosporine A and analogues *Transplant. Proc.* **20**, 51-57
  - Dutz J.P., Fruman D.A., Burakoff S.J. & Bierer B.E. (1993) A role for calcineurin in degranulation of murine cytotoxic T lymphocytes *J. Immunol.* **150**, 2591-2598
  - ✦ Ellis J. (1987) Proteins as molecular chaperones *Nature* **328**, 378-38
  - Erikson R.L. (1991) Structure, expression and regulation of protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6 *J. Biol. Chem.* **266**, 6007-6010
  - Etzkorn F.A., Chang Z.Y., Stolz L. & Walsh C.T. (1994) Cyclophilin residues that affect noncompetitive inhibition of the protein serine phosphatase activity of calcineurin by the the cyclophilin-cyclosporin A complex *Biochemistry* **33**, 2380-2388
  - ✦ Etzkorn F.A., Stolz L., Chang Z. & Walsh C.T. (1993) Role of the cyclosporin-A-cyclophilin complex, FK506-FK506-binding protein complex and calcineurin in the inhibition of T-cell signal transduction *Current Opinion in Structural Biology* **3**, 929-933
  - Fejzo J., Etzkorn F.A., Clubb R.T., Shi Y., Walsh C.T. & Wagner G. (1994) The mutant *Escherichia coli* F112W cyclophilin binds cyclosporin A in nearly identical conformation as human cyclophilin *Biochemistry* **33**, 5711-5720

- Fesik S.W., Gampe R.T., Eaton J.H.L., Gemmecker G., Olejniczak E.T., Neri P., Holzman T.F., Egan D.A., Edalji R., Simmer R., Helfrich R., Hochlowski J. & Jackson M. (1991) NMR studies of [U-13C]Cyclosporin A bound to cyclophilin: Bound conformation and portions of cyclosporin involved in binding *Biochemistry* 30, 6574-6583
- ⊛ Fischer G. (1994) Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and their effectors *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 1415-1436
- Fischer G., Bang H. & Mech C. (1984) Detection of enzyme catalysis for cis-trans isomerization of peptide bonds using proline containing peptides as substrates *Biochem. Biophys. Acta* 43, 1101-1112
- Fischer G., Wittmann-Liebold B., Lang K., Kiefhaber T. & Schmid F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis trans isomerase are probably identical proteins *Nature* 337, 476-478
- Fliri H., Baumann G., Enz A., Kallen J., Luyten M., Mikol V., Movva R., Quesniaux V., Scheier M., Walkinshaw M., Wenger R., Zenge G. & Zurini M. (1993) Cyclosporins: Structure activity relationships *Annu. N.Y. Acad. Sci. USA* 696, 47-53
- Frommel C. & Preissner R. (1990) Prediction of prolyl residues in cis-conformation in proline structures on the basis of the amino acid sequence *FEBS Lett.* 277, 159-163
- Foor F., Parent S.A., Morin N., Dahl A.M., Ramadan N., Chrebet G., Bostian K.A. & Nielsen J.B. (1992) Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from  $\alpha$ -factor arrest in yeast *Nature* 360, 682-684
- Forrest M.J., Jewell M.E., Koo G.C. & Sigal N.H. (1991) FK-506 and cyclosporin A: selective inhibition of calcium ionophore induced polymorphonuclear leukocyte degranulation *Biochem. pharmacol.* 23, 131-138
- Fox R.O., Evans P.A. & Dobson C.M. (1986) Multiple conformations of a protein demonstrated by magnetization transfer NMR spectroscopy *Nature* 320, 192-194

- 
- Foxwell B., Simon J., Herrero J., Taylor D., Woerly G. & Ryffel B. (1990) Anti-CD3 antibody-induced expression of both p55 and p75 chains of the high affinity interleukin-2 receptor on human T lymphocytes is inhibited by cyclosporin A *Immunology* 69, 104-109
  - Franco L., Jimenez A., Demolder J., Molemans F., Fiers W. & Contreras R. (1991) The nucleotide sequence of a third cyclophilin-homologous gene from *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast* 7, 971-979
  - Franke E.K., Hui Yang H. E. & Luban J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions *Nature* 372, 359-372
  - Frantz B., Nordby E.C., Steffan N., Paya C.V., Kincaid R.L., Tocci M.J., O'Keefe S.J. & O'Neill E.A. (1994) Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I $\kappa$ B/MAD3, an inhibitor of NF $\kappa$ B *EMBO J.* 13, 861-870
  - Freedman R.B. (1989) Protein disulfide isomerase : Multiple roles in the modification of nascent secretory proteins *Cell* 57, 1069-1072
  - Freskgard P.-O., Bergenheim N., Jonsson B.-H., Svensson M. & Carlsson U. (1992) Isomerase and chaperone activity of prolyl isomerase in the folding of carbonic anhydrase *Science* 258, 466-468
  - Fretz H., Albers M.A., Galat A., Standaert R.F., Lane W.S., Burakoff S.J., Bierer B.E. & Schreiber S.L. (1991) Rapamycin and FK506 binding proteins *J. Am. Chem. Soc.* 113, 1409-1410
  - Friedman J. & Weissman I. (1991) Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin : one in the presence and one in the absence of CsA *Cell* 66, 799-806
  - Friedman J., Trahey M. & Weissman I. (1993) Cloning and characterization of cyclophilin C-associated protein: A candidate natural cellular ligand for cyclophilin C *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6815-6819
  - Frigerio G. & Pelham H.R.B. (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* cyclophilin resident in the endoplasmic reticulum *J. Mol. Biol.* 233, 183-188

- 
- Fruman D.A., Klee C.B., Bierer B.E. & Burakoff S.J. (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and cyclosporin A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3686-3690
  - Furue M., Katz S.I., Kawakami Y. & Kawakami T. (1990) Coordinate expression of src family protooncogenes in T cell activation and its modulation by cyclosporine *J. Immunol.* **144**, 736-739
  - Gaido M. & Cidlowski J. (1991) Identification, purification, and characterization of a calcium dependant endonuclease (NUC18) from apoptotic Rat thymocytes: NUC18 is not H2B *J. Biol. Chem.* **266**, 18580-18585
  - Galat A., Lane W.S., Standaert R.F. & Schreiber S.L. (1992) A rapamycin-selective 25-kDa immunophilin *Biochemistry* **31**, 2427-2434
  - ⊛ Galat A. (1993) Peptidylprolyl cis-trans isomérases: Immunophilins *Eur. J. Biochem.* **216**, 689-707
  - Galat A. & Bouet F. (1994) Cyclophilin B is an abundant protein whose conformation is similar to cyclophilin A *FEBS* **347**, 31-36
  - ⊛ Galat A. & Metcalfe S.M. (1995) Peptidylproline cis/trans isomerases *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **63**, 67-118
  - Garcia-Eccheverria C., Kofron J.L., Kuzmic P., Kishore V. & Rich D.H. (1992) Continuous fluorimetric direct (uncoupled) assay for peptidyl prolyl cis-trans isomerase *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 2758-2759
  - Gasser C.S., Gunning D.A., Budelier K.A. & Sherri M.B. (1990) Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9519-9523
  - ⊛ Gething M-J. & Sambrook J. (1992) Protein folding in the cell *Nature* **355**, 33-45
  - Granelli-Piperno A., Andrus L. & Dteinman R.M. (1986) Lymphokine and nonlymphokine mRNA levels in stimulated human T cells. Kinetics mitogen requirements and effects of cyclosporin A *J. Exp. Med.* **163**, 922-937

- 
- Griffiths E.J. & Halestrap A.P. (1991) Further evidence that cyclosporin A protects mitochondria from calcium overload by inhibiting a matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase *EMBO J.* **274**, 611-614
  - Groblewski G.E., Andreas C.C. & Williams J.A. (1994) Cyclosporin A inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependant protein phosphatase and secretion in pancreatic acinar cells *J. Biol. Chem.* **269**, 15111-15117
  - Gschwendt M., Kittstein W. & Marks F (1988) Sequence similarity between cyclophilin and elongation factor 2 *Biochem. J.* **256**, 1061
  - Haddy A., Swanson S.K-H., Born T.L. & Rusnak F. (1992) Inhibition of calcineurin by cyclosporin A-cyclophilin requires calcineurin B *FEBS Lett.* **314**, 37-40
  - Handler B., Hofer-Warbinek R. & Hofer E. (1987) Complementary DNA for human T-cell cyclophilin *EMBO J.* **6**, 947-950
  - Haendler B., Keller R., Hiestand P.C., Kocher H.P., Wegmann G. & Movva N.R. (1989) Yeast cyclophilin: isolation and characterization of the protein, cDNA and gene *Gene* **3**, 39-46
  - Halestrap A.P. & Davidson A.M. (1990) Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase *Biochem. J.* **268**, 153-160
  - Hanschumacher R.E., Harding M.W., Rice J., Drugge R.J. & Speicher D.W. (1984) Cyclophilin : A specific cytosolic binding protein for cyclosporin *Science* **226**, 544-547
  - Harding M.W., Handschumacher R.E. & Speicher D.W. (1986) Isolation and aminoacid sequence of cyclophilin *J. Biol. Chem.* **261**, 8547-8555
  - Harding M.W., Galat A., Uehling D.E. & Schreiber S.L. (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase *Nature* **341**, 758-760

- Harigai M., Hara M., Takahashi N., Kitani A., Hirose T., Suziki K., Kawakami M., Hidaka T., Kawaguchi Y., Ishizuka T., Suziki M., Kawagoe M. & Nakamura H. (1992) Presence of autoantibodies to peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclosporin A-binding protein) in systemic lupus erythematosus *Clin. Immunol. Immunopathol.* 36, 58-65
- Harrison R.K. & Stein R.L. (1990) Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK506 binding protein: Evidence for the existence of a family of distinct enzymes *Biochemistry* 29, 3813-3816
- Harrison R.K. & Stein R.L. (1992) Mechanistic studies of enzymic and nonenzymic prolyl cis-trans isomerization *J. Am. Chem. Soc.* 114, 3464-3471
- Hasel K.W., Glass J.R., Godbout M. & Sutcliffe J.G. (1991) An endoplasmic reticulum-specific cyclophilin *Mol. Cell. Biol.* 11, 3484-3491
- Hashimoto Y., Perrino B.A. & Soderling T.E. (1986) Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin *J. Biol. Chem.* 265, 1924-1927
- Hayano T., Takabushi N., Kato S., Maki N. & Suzuki M. (1991) Two distinct forms of peptidylprolyl-cis-trans-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells *Biochemistry* 30, 3041-3048
- Hemar A. & Dautry-Varsat A. (1990) Cyclosporin A inhibits the interleukin 2 receptor  $\alpha$  chain gene transcription but not its cell surface expression. The  $\alpha$  chain stability can explain this discrepancy *Eur. J. Immunol.* 20, 2629-2635
- ⊕ Hérold C., Elhabazi A., Bensussan A. & Boumsell L. (1995) Implication des molécules "CD" dans la transmission des signaux d'activation des lymphocytes T *M/S* 11, 669-680
- Herold K.C., Lancki D.W., Moldwin R.L. & Fitch F.W. (1986) Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T cells *J. Immunol.* 136, 1315-1321
- Herrler M., Bang H., Brune K., Fischer G. & Marahiel M.A. (1992) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from *Bacillus subtilis* : A prokaryotic enzyme that is highly sensitive to cyclosporin A *FEBS Lett.* 3, 231-234

- Herrler M., Bang H., & Marahiel M.A. (1994) Cloning and characterization of ppiB, a *Bacillus subtilis* gene which encodes a cyclosporin A-sensitive peptidyl prolyl cis-trans isomerase *Mol. Microbiol.* 11, 1073-1083
- Hess A.D. (1985) Effect of interleukin 2 on the immunosuppressive action of cyclosporin *Transplantation* 39, 62-68
- ⊛ Hivroz C., Le Deist F. & Fischer A. (1995) Le déficit en tyrosine kinase ZAP-70 : Un modèle de déficit immunitaire héréditaire pour l'analyse de l'activation et de la différenciation des lymphocytes T *M/S* 11, 268-272
- Hoffman K. & Handschumacher (1995a) Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90 *Biochem. J.* 307, 5-8
- Hoffmann K., Kakalis L.T., Anderson K.S., Armitage I.M. & Hanschumacher R.E. (1995b) Expression of human cyclophilin-40 and the effect of the His141-Trp mutation on catalysis and cyclosporin A binding *Eur. J. Biochem.* 229, 188-193
- Hübner D., Drakenberg T., Forsen S. & Fisher G. (1991) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity as studied by dynamic proton NMR spectroscopy *FEBS Lett.* 284, 79-81
- Hultsch T., Rodriguez J.L., Kaliner M.A. & Hohman R.J. (1990) Cyclosporin A inhibits degranulation of rat basophilic leukemia cells and human basophils. Inhibition of mediator release without affecting PI hydrolysis or  $Ca^{2+}$  fluxes *J. Immunol.* 144, 2659-2664
- Husi H., Luyten M.A. & Zurini M.G.M. (1994a) Mapping of the immunophilin-immunosuppressant site of interaction on calcineurin *J. Biol. Chem.* 269, 14199-14204
- Husi H. & Zurini M.G. (1994b) Comparative binding studies of cyclophilins to cyclosporin A and derivatives by fluorescence measurements *Anal. Biochem.* 222, 251-255
- Inoue T., Yoshida Y., Isaka Y. & Tagawa K. (1993) Isolation of mitochondrial cyclophilin from bovine heart *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 190, 857-863
- ⊛ Israël A. (1994) La vérité sur NF-AT *M/S* 10, 894-895

- Iwai N. & Inagami T. (1990) Molecular cloning of a complementary DNA to rat cyclophilin-like protein mRNA *Kidney Int.* 37, 1460-1465
- Jain J., McCaffrey P.G., Miner Z., Kerppola T.K., Lambert J.N., Verdine G.L., Curran T. & Rao A. (1993) The T-cell transcription factor NF-ATp is a substrate for calcineurin and interact with fos and jun *Nature* 365, 352-3556
- Jayaraman T., Brillantes A-M., Timerman A.P., Fleischer S., Erdjument-Bromage H., Temps P. & Marks A.R. (1992) FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor) *J. Biol. Chem.* 267, 9474-9477
- Jin Y.J., Albers M.W., Bierer B.E., Schreiber S.L. & Burakoff S.J. (1991) Molecular cloning of a membrane-associated human FK506- and rapamycin-binding protein, FKBP13 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6677-6681
- Jin Y.J., Burakoff S.J. & Bierer B.E. (1992) Molecular cloning of a 25 kDa high affinity rapamycin binding protein, FKBP25 *J. Biol. Chem.* 267, 10942-10945
- Jin Y. J. & Burakoff (1993) The 25 kDa FK506-binding protein is localized in the nucleus and associates with casein kinase II and nucleolin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7769-7773
- Johnson J.L. & Toft D.O. (1994) A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23 *J. Biol. Chem.* 269, 24989-24993
- ❖ Jorgensen W.L. (1991) Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding *Science* 254, 254-255
- Kahan B.D., Gibbons S., Tejpal N., Stepkowski S.M. & Chou T.C. (1991) Synergistic interactions of cyclosporine and rapamycin to inhibit immune performances of normal human peripheral blood lymphocytes *in vitro Transplantation* 51, 232-239
- Kappler J.W., Roehm N. & Marrack P. (1987) T cell tolerance by clonal elimination in the thymus *Cell* 49, 273-280
- Kay J.E., Kromwel L., Doe S.E.A. & Denyer M. (1991) Inhibition of of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin *Immunology* 72, 544-549
- Ke H., Zydowsky L.D., Liu J. & Walsh (1991) Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9483-9487

- 
- Ke H. (1992) Similarities and differences between human cyclophilin A and other  $\beta$ -barrel structures: Structural refinement at 1.63 Å resolution *J. Mol. Biol.* **228**, 539-550
  - Ke H., Mayrose D. & Cao W. (1993) Crystal structure of cyclophilin A complexed with substrate Ala-Pro suggests a solvent-assisted mechanism of cis-trans isomerization *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3324-3328
  - Ke H., Zhao Y., Luo F., Weissman I. & Friedman J. (1993) Crystal structure of murine cyclophilin C complexed with immunosuppressive drug cyclosporin A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11850-11854
  - Ke H., Mayrose D., Belshaw P.J., Alberg D/G., Schreiber S.L., Chang Z.Y., Etkorn F.A. Ho S. & Walsh C.T. (1994) Crystal structures of cyclophilin A complexed with cyclosporin A and N-methyl-4-[(E)-2-butenyl]-4, 4-dimethylthreonine cyclosporin A *Structure* **2**, 33-44
  - Kern D., Drakenberg T., Wikström M., Forsén S., Bang H. & Fischer G. (1993) The cis-trans interconversion of the calcium regulating hormone calcitonin is catalysed by cyclophilin *FEBS Lett.* **323**, 198-202
  - Kern G., Kern D., Schmid F.X. & Fisher G. (1994) Reassessment of the putative chaperone function of prolyl-cis/trans-isomerases *FEBS Lett.* **348**, 145-148
  - Kern G., Kern D., Schmid F.X. & Fisher G. (1995) A kinetic analysis of the folding of human carbonic anhydrase II and its catalysis by cyclophilin *J. Biol. Chem.* **270**, 740-745
  - Kessler H., Gehrke M., Lautz J., Koeck M., Seebach D. & Thaler A. (1990) Complexation and medium effects on the conformation of cyclosporin A studied by NMR spectroscopy and molecular dynamics calculations *Biochem. Pharmacol.* **40**, 169-173
  - Kieffer L.J., Thalhammer T. & Handschumacher R.E. (1992) Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein *J. Biol. Chem.* **267**, 5503-5507

- 
- Kieffer L.J., Seng T.W., Osterman D.G., Handschumacher R.E. & Baynay R.M. (1993) Cyclophilin-40, a protein with homology to the p59 component of the steroid receptor complex: Cloning of the cDNA and further characterization *J. Biol. Chem.* 266, 12303-12310
  - Kincaid R.L., Takayama H., Billingsley M.L. & Sitkovsky M.V. (1987) Differential expression of calmodulin-binding proteins in B, T lymphocytes and thymocytes *Nature* 330, 176-178
  - Klaus G. (1988) Cyclosporine-sensitive and cyclosporine-insensitive modes of B cell stimulation *Transplantation* 46, 11-14
  - Knappik A., Krebber C. & Plückthun A. (1993) The effect of folding catalysts on the *in vivo* folding process of different antibody fragments expressed in *Escherichia coli* *Bio/Technology* 11, 77-83
  - Ko S.Y. & Dalvit C. (1992) Conformation of cyclosporine in polar solvents *Int. J. Peptide Protein Res.* 40, 380-382
  - Kofron J.L., Kuzmic P., Kishore V., Colon-Bonilla E. & Rich D. H. (1991) Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay *Biochemistry* 30, 6127-6134
  - Koletsky A.J., Harding M.W. & Handschumacher R.E. (1986) Cyclophilin: Distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues *J. Immunol.* 137, 1054-1059
  - Kosaka H., Matsubara H., Sogoh S., Ogata M. & Fujiwara H. (1990) An *in vitro* model for cyclosporin A-induced interference of intrathymic clonal elimination *J. Exp. Med.* 172, 395-398
  - Krummrei U., Bang R., Schmidtchen R., Brune K. & Bang H. (1995) Cyclophilin-A is a zinc-dependant DNA binding protein in macrophages *FEBS Lett.* 371, 47-51

- 
- Koser P.L., Bergsma D.J., Cafferkay R., Eng W-K., McLaughlin M.M., Ferrara A., Silverman C., Kasyan K., Bossard R.J., Johnson R.K., Porter T.G., Levy M.A. & Livi G.P. (1991) The CYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cyclosporin A-sensitive peptidyl prolyl cis-trans isomerase with a N-terminal signal sequence *Gene* 108, 73-80
  - Kratz A., Harding M.W., Craft J., Mackworth-Young C.G. & Handschumacher R.E. (1992) Autoantibodies against cyclophilin in systemic lupus erythematosus and lyme disease *Clin. Exp. Immunol* 90, 422-427
  - Kronke M., Leonard W.J., Depper J.M., Arya S.K., Wong-Staal F., Gallo R.C., Waldman T.A. & Greene W.C. (1984) Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5214-5218
  - Kruse M., Brunke M., Escher A., Szalay A., Tropschug M. & Tropschug M. (1995) Enzyme assembly after *de Novo* synthesis in rabbit reticulocyte lysate involves molecular chaperones and immunophilins *J. Biol. Chem.* 270, 2588-2594
  - Kunz J. & Hall M.N. (1993) Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: More than just immunosuppression *TIBS* 18, 334-337
  - Kuo C.J., Chung J., Fiorentino D.F., Flanagan W.M., Blenis J. & Crabtree G.R. (1992) Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase *Nature* 358, 70-73
  - Lancki D., Kaper B.P. & Fitch F.W. (1989) The requirements for triggering of lysis by cytolytic T lymphocyte clones.II. Cyclosporin A inhibits TCR-mediated exocytosis but only selectively inhibits TCR-mediated lytic activity by cloned CTL *J. Immunol.* 142, 416-424
  - Lane H.A., Fernandez A., Lamb N.J.C. & Thomas G. (1993) p70S6k function is essential for G1 progression *Nature* 363, 170-172
  - Lane S.W., Galat A., Harding M.W. & Schreiber S.L. (1991) Complete amino acid sequence of the FK506 and rapamycin binding protein, FKBP, isolated from calf thymus *J. Prot. Chem.* 10, 151-160

- 
- Lang K., Schmid F.X. & Fischer G. (1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase *Nature* **329**, 298-270
  - Li W. & Handschumacher R.E. (1993) Specific interaction of the cyclophilin-cyclosporin complex with the  $\beta$  subunit of calcineurin *J. Biol. Chem.* **268**, 14040-14044
  - Lilie H., Lang K., Rudolph R. & Buchner J. (1993) Prolyl isomerases catalyse antibody folding *in vitro Protein Sci. USA* **2**, 1490-1496
  - Lin C.S., Boltz R.C., Siekierka J.J. & Sigal N.H. (1991) FK-506 and cyclosporin A inhibit highly similar signal transduction pathways in human T lymphocytes *Cell. Immunol.* **133**, 269-284
  - Lin L-N., Hasumi H. & Brandts J.F. (1988) Catalysis of proline isomerization during protein-folding reactions *Biochem. Biophys. Acta* **956**, 256-266
  - Little R.G., Ebertowski L.A. & David C.S. (1990) Inhibition of alloantigen presentation by cyclosporine *Transplantation* **49**, 937-944
  - Liu J., Albers M.W., Chen C.-M., Schreiber S.L. & Walsh C.T. (1990a) Cloning, expression and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2304-2308
  - Liu J. & Walsh C.T. (1990b) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from *Escherichia coli*: A periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4028-4032
  - Liu J., Farmer J.D.J., Lane W.S., Friedman J., Weissman I. & Schreiber S.L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes *Cell* **66**, 807-815
  - Liu J., Albers M.W., Wandless T.J., Luan S., Alberg D.G., Belshaw P.J., Cohen P. McKintosh C., Klee C.B. & Schreiber S.L. (1992) Inhibition of T cell signalling by immunophilin-complexes correlates with losses of calcineurin phosphatase activity *Biochemistry* **31**, 3896-3901

- 
- Lodish H.F. & Kong N. (1991) Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum *J. Biol. Chem.* **266**, 14835-14838
  - Loosli H., Kessler H., Oschinkinat H., Weber H., Petcher T.J. & Widmer A. (1985) The conformation of cyclosporin A in the crystal and in solution *Helv. Chim. Acta* **68**, 682-704
  - ★ Lorimer G.H. (1992) Role of accessory proteins in protein folding *Curr. Opinion Struct. Biol.* **2**, 26-34
  - Luan S., Albers M.W. & Schreiber S.L. (1994) Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher plant *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 984-988
  - Luban J., Bossolt K.L., Franke E.K., Kalpana G.V. & Goff S.P. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B *Cell* **73**, 1067-1078
  - Luo H., Chen H., Daloz P. & Wu J. (1992) Effects of rapamycin on human HLA-unrestricted cell killing *Clin. Immunol. Immunopathol.* **65**, 60-64
  - Maki N., Sekigushi F., Nishimaki J., Miwa K., Hayano T., Takahashi N. & Suzuki M. (1990) Complementary DNA encoding the human T-cell FK506-binding protein, a peptidyl prolyl cis-trans isomerase distinct from cyclophilin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5440-5443
  - Malek T.R. & Ashwell J.D. (1985) Interleukin 2 upregulates expression of its receptor on a T cell clone *J. Exp. Med.* **161**, 1575-1580
  - Marivet J., Frendo P. & Burkard G. (1992) Effect of abiotic stresses on cyclophilin gene expression in maize and bean and sequence analysis of bean cyclophilin cDNA *Plant Sci. USA* **84**, 171-178
  - Marone G., Trioggiani M., Cirillo R., Giacummo A., Siri L. & Condorelli M. (1988) Cyclosporin A inhibits the release of histamine and peptide leukotriene C4 from human lung mast cell *Ric. Clin. Lab.* **18**, 53-59
  - Matouschek A., Rospert S., Schmid K., Glick B.J. & Schatz G. (1995) Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6319-6323

- McCaffrey P.G., Perrino B.A., Soderling T.R. & Rao A. (1993) NF-ATp: A T-lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drug *J. Biol. Chem.* **268**, 3747-3752
- McDonald M.L., Ardito T., Marks W.H., Kashgarian M. & Lorber M.I. (1992) The effect of cyclosporine administration on the cellular distribution and content of cyclophilin *Transplantation* **53**, 460-466
- McGuinness O., Yafei N., Costi A. & Crompton M. (1990) The presence of two classes of high affinity cyclosporin A binding sites in mitochondria: Evidence that the minor component is involved in the opening of an inner membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore *Eur. J. Biochem.* **194**, 671-679
- Mikol V., Kallen J. & Walkinshaw M.D. (1994) X-ray structure of a cyclophilin B/cyclosporin complex : Comparison with cyclophilin A and delineation of its calcineurin-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5183-5186
- Mikol V., Kallen J., Pflügl G. & Walkinshaw M.D. (1993) X-ray structure of a monomeric cyclophilin A-cyclosporin A crystal complex at 2.1 Å resolution *J. Mol. Biol.* **234**, 1119-1130
- Milan D., Griffith J., Su M., Roydon Price E. & McKeon F. (1994) The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation *Cell* **79**, 437-447
- Montague J.W., Gaido M.L., Frye C. & Cidlowski J.A. (1994) A calcium-dependent nuclease from apoptotic Rat thymocytes is homologous with cyclophilin-Recombinant cyclophilins A,B and C have nuclease activity *J. Biol. Chem.* **269**, 18877-18880
- Mücke M. & Schmid F.X. (1992) Enzymatic catalysis of prolyl isomerization in an unfolding protein *J. Biol. Chem.* **31**, 7848-7854
- Munro S. & Pelham H.R.B. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins *Cell* **48**, 899-907
- Nagashima K., Mitsuhashi S., Kamino K. & Maruyama T. (1994) Cyclosporin A sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase in a halophilic archaeum, *Halobacterium cutirubrum* *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **198**, 466-472

- Neri P., Gemmecker G., Zydowsky L.D., Walsh C.T. & Fesik S.W. (1991) NMR studies of [U-<sup>13</sup>C] cyclosporin A bound to human cyclophilin B *FEBS Lett.* **290**, 195-199
- Nguyen D.T., Eskandari M.K., Deforge L.E., Raiford C.L., Strieter R.M., Kunkel S.L. & Remick D.G. (1990) Cyclosporin A modulation of tumor necrosis factor gene expression and effects *in vitro* and *in vivo* *J. Immunol.* **144**, 3822-3828
- O'Keefe S.J., Tamura J., Kincaid R.L., Tocci M.J. & O'Neill O.A. (1992) FK506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin *Nature* **357**, 692-694
- Ondek B., Hardy R.W., Baker E.K., Stamnes M.A., Shieh B.-H. & Zuker C.S. (1992) Genetic dissection of cyclophilin function: Saturation mutagenesis of the *Drosophila* cyclophilin homolog ninaA *J. Biol. Chem.* **267**, 16460-16466
- Otsuka M., Terada Y., Yang T.X., Nonoguchi H., Tomita K. & Marumo F. (1994) Localization of cyclophilin A and cyclophilin C mRNA in murine kidney using RT-PCR *Kidney Int.* **45**, 1340-1345
- Owens-Grillo J.K., Hoffman K., Hutchinson K., Yem A.W., Deibel M.R., Handschumacher R.E. & Pratt W.B. (1995) The cyclosporin A-binding immunophilin CyP-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hso90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor *J. Biol. Chem.* **270**, 20479-20484
- Pahl A., Ühlein M., Bang H., Schlumbohm & Keller U. (1992) *Streptomyces* possesses peptidyl-prolyl cis-trans isomerases that strongly resemble cyclophilins from eukaryotic organisms *Mol. Microb.* **6**, 3551-3558
- Peattie D.A., Harding M.W., Fleming M.A., DeCenzo M.T., Lippke J.A., Livingston D.J. & Benasutti M. (1992) Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10974-10978
- ★ Pratt W.B. (1993) The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor *J. Biol. Chem.* **268**(29), 21455-21458

- 
- Price E.R., Zydowsky L.D., Mingjie J., Hunter Baker C., McKeon F.D. & Walsh C.T. (1991) Human cyclophilin B : A second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1903-1907
  - Price E.R., Jin M., Lim D., Pati S., Walsh C.T. & McKeon F.D. (1994) Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3931-3935
  - Quesniaux V.F.J., Schreier M.H., Wenger M.H., Hiestand R.M., Harding P.C. & Van Regenmortel M.H.V. (1987) Cyclophilin binds to the region of cyclosporine involved in its immunosuppressive activity *Eur. J. Immunol.* **17**, 1359-1365
  - Radzicka A., Acheson S.A. & Wolfenden R. (1992) Cis-trans isomerization at proline: Desolvation and its consequence for protein folding *Bioorganic Chem.* **20**, 382-386
  - Rahfeld J.U., Rücknagel P., Schelbert B., Ludwig B., Hacker J., Mann K. & Fischer G. (1994a) Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases : Amino acid sequence and recombinant production of parvulin *FEBS* **352**, 180-184
  - Rahfeld J-U., Schierhorn A., Mann K. & Fischer G. (1994b) A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli* *FEBS Lett.* **343**, 65-69
  - Rassow J., Mohrs K., Koidl S., Barthelmess I.B., Pfanner N. & Tropschug M. (1995) Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding with molecular chaperones hsp70 and hsp60 *Mol. Cell Biol.* **15**, 2654-2662
  - Ratajczak T., Carello A., Mark P.J., Warner B.J., Simpson R.J., Moritz R.L. & House A.K. (1993) The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59) *J. Biol. Chem.* **268**, 13187-13192
  - Reed J., Abidi A., Alpers J., Hoover R., Robb R. & Nowell P. (1986) Effect of cyclosporin A and dexamethasone on interleukin 2 receptor gene expression *J. Immunol.* **137**, 150-154

- 
- Renoir J-M, Radanyi C., Faber L.E. & Baulieu E-E (1990) The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kiloDalton protein *J. Biol. Chem.* **265**, 10740-10745
  - Richards F.M., Milner J. & Metcalfe S. (1992) Inhibition of the serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A in lymphocytes: Effect on mRNA levels for interleukin-2, IL-2Ra, krox-24, p53, hsc70 and cyclophilin *Immunology* **76**, 642-647
  - Rinfret A. & Anderson S.K. (1993) IL-2 regulates the expression of the NK-TR gene via an alternative RNA splicing mechanism *Mol. immunol.* **30**, 1307-1313
  - Rinfret A., Collins C., Ménard R. & Anderson S.K. (1994) The N-terminal cyclophilin-homologous domain of a 150-kilodalton tumor recognition molecule exhibits both peptidyl prolyl cis-trans isomerase and chaperone activities *Biochemistry* **33**, 1668-1673
  - Rivière S., Ménez A. & Galat A. (1993) On the localization of FKBP25 in T-lymphocytes *FEBS Lett.* **315**, 247-251
  - Rosen M.K., Standaert R.F., Galat A., Nakatsuka M. & Schreiber S.L. (1990) Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506: Twisted amide surrogate *Science* **248**, 863-866
  - ✪ Rosen M.K. & Schreiber S.L. (1992) Natural products as probes of cellular function: Studies of immunophilins *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31**, 384-400
  - Rosenwirth B., Billich A., Datema R., Donatsch P., Hammerschmid F., Harrison R., Hiestand P., Jaksche H., Mayer P., Peichl P., Quesniaux V., Schatz F., Schuurman H.-J., Traber R., Wenger R., Wolff B., Zenke G. & Zurini M. (1994) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin analog *Antimicrob. Agents chemother.* **38**, 1763-1772
  - Rudd K.E., Sofia H.J. & Koonin E. V. (1995) A new family of peptidyl-prolyl isomerases *TIBS* **20**, 12-14
  - Ryffel B., Tammi K., Grieder A. & Hess A.D. (1985) Effect of cyclosporine on human T cell activation *Transplant. Proc.* **17**, 1268-1270

- 
- Schwartz R.H. (1992) Costimulation of T-lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy *Cell* 71, 1065-1068
  - Segnitz & Gehring U. (1995) Subunit structure of the nonactivated human estrogen receptor *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2179-2183
  - Sherry B., Yarlett N., Strupp A. & Cerami A. (1992) Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3511-3515
  - Shi Y., Sahai B.M. & Green D.R. (1989) Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes *Nature* 339, 625-626
  - Shieh B-H, Stamnes M.A., Seavello S., Harris G.L. & Zuker C.S. (1989) The *ninaA* gene required for visual transduction in *Drosophila* encodes a homologue of cyclosporin A-binding protein *Nature* 338, 67-70
  - Siekerka J.J., Hung S.H.Y., Poe M., Lin C.S. & Sigal N.H. (1989) A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin *Nature* 341, 755-757
  - ✳ Sigal N.H. & Dumont F.J. (1992) Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: Pharmacological probes of lymphocyte signal transduction *Ann. Rev. Immunol.* 10, 519-560
  - Smith D.F., Albers M.W., Schreiber S.L., Leach K.L. & Reibel Jr M.R. (1993) FKBP54, a novel FK506-binding protein in avian progesterone receptor complexes and HeLa extracts *J. Biol. Chem.* 268, 24270-24273
  - Smith T., Ferreira L.R., Herbert C., Norris C. & Sauk J.J. (1995) Hsp47 and cyclophilin B traverse the endoplasmic reticulum with procollagen in pre-golgi intermediate vesicles : A role for Hsp47 and cyclophilin B in the export of procollagen from the endoplasmic reticulum *J. Biol. Chem.* 270, 18323-18328
  - Spik G., Haendler B., Delmas O., Mariller C., Chamoux M., Maes P., Tartar A., Montreuil J., Stedman K., Kocher H.P., Keller R. , Hiestand P.C. & Movva N.R. (1991) A novel secreted cyclophilin-like cyclophilin (SCYLP) *J. Biol. Chem.* 266, 10735-10738

- Ryffel B., Woerly G., Haendler B., Mihatsch M.J. & Foxwell B.M.J. (1991) Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues *Immunology* 72, 399-404
- Ryffel B., Woerly G., Murray M., Eugster H-P & Car B. (1993) Binding of active cyclosporins to cyclophilin A and B, complex formation with calcineurin A *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 194, 1074-1083
- Sabers C.J., Martin M/M/, Brunn G.J., Williams J.M., Dumont F.J., Wiederrecht G. & Abraham R.T. (1995) Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mamalian cells *J. Biol. Chem.* 270, 815-822
- Sarris A.H., Harding M.W., Jiang T-R., Aftab D. & Handschumacher (1992) Immunofluorescent localization and immunochemical determination of cyclophilin-A with specific rabbit antisera *Transplantation* 54, 904-910
- ✪ Schmid F.X. (1993) Prolyl isomerase: Enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 123-143
- Schneider H., Charara N., Schmitz R., Wehrli S., Mikol V., Zurini M.G.M., Quesniaux V.F.J. & Movva N.R. (1994) Human cyclophilin C : Primary structure, tissue distribution, and determination of binding specificity for cyclosporins *Biochemistry* 33, 8218-8224
- Schneuwly S., Shortridge R.D., Larrivee D.C., Ono T., Ozaki M. & Pak W.L. (1989) Drosophila ninaA gene encodes an eye-specific cyclophilin (cyclosporin A binding protein) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5390-5394
- Schönbrunner E.R., Mayer S., Tropschug M., Fischer G., Takahashi N. & Schmid F.X. (1991) Catalysis of protein folding by cyclophilin from different species *J. Biol. Chem.* 266, 3630-3635
- ✪ Schreiber S.L. (1991) Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands *Science* 251, 283-287
- Schuster D.I., Ehrlich G.K. & Murphy R.B. (1994) Purification and partial amino acid sequence of a 28kDa cyclophilin-like component of the rat liver sigma receptor *Life Sciences* 55, 151-156

- Spitzfaden C., Braun W., Wider G., Widmer H. & Wüthrich K. (1994) Determination of the NMR solution structure of the cyclophilin A-cyclosporin A complex *J. Biomol. NMR* 4, 463-482
- Stamnes M.A., Shieh B.-H., Chuman L., Harris G.L. & Zuker C.S. (1991) The cyclophilin homologue ninaA is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of Drosophila rhodopsins *Cell* 65, 219-227
- Standaert R.F., Galat A., Verdine G.L. & Schreiber S.L. (1990) Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP *Nature* 346, 671-674
- Steinmann B., Bruckner P. & Superti-Furga A. (1991) Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation *in vivo*: Indirect evidence for a physiologic role of peptidyl prolyl cis-trans isomerase *J. Biol. Chem.* 266, 1299-1303
- Swanson S.K.-H., Born T., Zydowsky L.D., Cho H., Chang H.Y., Walsh C.T. & Rusnak F. (1992) Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3741-3745
- Sykes K., Gething M.-J. & Sambrook J. (1993) Proline isomerases function during heat shock *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5853-5857
- Tai P.K.K., Albers M.W., Chang H., Faber L.E. & Schreiber S.L. (1992) Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex *Science* 256, 1315-1318
- Takahashi N., Hayano T. & Suzuki M. (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin *Nature* 337, 473-475
- Terada N., Franklin R.A., Lucase J.J., Blenis J. & Gelfand E.W. (1993) Failure of rapamycin to block proliferation once resting cells have entered the cell cycle despite inactivation of p70 S6 kinase *J. Biol. Chem.* 268, 12062-12068
- Teteart D., Soudan B., Lo-Guidice J.-M., Richet C., Degand P., Boussard G., Mariller C. & Spik G. Combination of high-performance anion-exchange chromatography and electrospray mass spectrometry for analysis of the *in vitro* O-glycosylated mucin motif peptide *J. Chromatog.* 658, 31-38



- 
- Thalhammer T., Kieffer L.J., Jiang T. & Handschumacher R.E. (1992) Isolation and partial characterization of membrane-associated cyclophilin and a related 22-kDa glycoprotein *Eur. J. Biochem.* 206, 31-37
  - Thall M., Bukovsky A., Kondo E., Rosenwirth B., Walsh C. T., Sodroski J. & Göttlinger H. G. (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions *Nature* 372, 363-365
  - Thériault Y., Logan T.M., Meadows R., Yu L., Olejniczak E.T., Holzman T.F., Simmer R.L. & Fesik S.W. (1993) Solution structure of the cyclosporin A/cyclophilin complex by NMR *Nature* 361, 88-91
  - Timerman A.P., Ogunbummi E., Freund E.A., Wiederrecht G., Marks A.R. & Fleischer S. (1993) The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein : Dissociation and reconstitution of FKBP12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum *J. Biol. Chem.* 268, 22992-22999
  - Timerman A.P., Wiederrecht G., Marcy A. & Fleischer S. (1995) Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP-ryanodine receptor complex *J. Biol. Chem.* 270, 2451-2459
  - Trandinh C.C., Pao G.M. & Saier M.H. (1992) Structural and evolutionary relationships among the immunophilins/ two ubiquitous families of peptidyl-prolyl cis-trans isomerases *FASEB J.* 6, 3410-3420
  - Trenn G., Taffa R., Hohman R., Kincade R., Shevach E.M. & Sitkovsky M. (1989) Biochemical characterization of the inhibitory effect of CsA on cytolytic T-lymphocyte effector functions *J. Immunol.* 42, 3796-3802
  - Tropschug M., Nicholson D.W., Hartl F-U., Köhler H., Pfanner N., Wachter E. & Neupert W. (1988) Cyclosporin A-binding protein (cyclophilin) of *Neurospora crassa* *J. Biol. Chem.* 263, 14433-14440
  - Tropschug M. (1990) Nucleotide sequence of the gene coding for cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of *Neurospora crassa* *Nucleic acids Research* 18, 190

- 
- Ullman K.S., Flanagan M., Edwards C.A. & Crabtree G.R. (1991) Activation of early gene expression in T lymphocytes by Oct-1 and an inducible protein, OAP40 *Science* **254**, 558-562
  - Van Duyne G.D., Standaert R.F., Karplus P.A., Schreiber S.L. & Clardy J. (1993) Atomic structure of the human Immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin *J. Mol. Biol.* **229**, 105-124
  - Veillette A., Bookman M.A., Horak E.M., Samuelson L.E., & Bolen J.B. (1989) Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane protein tyrosine kinase p56lck *Nature* **338**, 257-259
  - Von Wartburg A. & Traber R. (1986) Chemistry of the natural cyclosporin metabolites *Prog. Allergy* **38**, 28-45
  - Wang T., Donahoe P.K. & Zervos A.S. (1994) Specific interaction of type I receptors of the TGF- $\beta$  family with the immunophilin FKBP-12 *Science* **265**, 674-676
  - Weber C., Wider G., Von Freyberg, Traber R., Braun W., Widmer H. & Wütrich K. (1991) The NMR structure of cyclosporin A bound to cyclophilin in aqueous solution *Biochemistry* **30**, 6563-6574
  - Wenger R.M., France J., Bovermann G., Walliser L., Widmer A. & Widmer H. (1994) The 3D structure of a cyclosporin analogue in water is nearly identical to the cyclophilin-bound cyclosporin conformation *FEBS Lett.* **340**, 255-259
  - Wicker L.S., Boltz R.C., Matt V., Nickols E.A., Peterson L.B. & Sigal N.H. (1990) Suppression of B-cell activation by cyclosporin-A, FK506 and rapamycin *Eur. J. Immunol.* **20**, 2277-2283
  - ⊛ Williams K.A. & Deber C.M. (1991) Proline residues in transmembrane helices: Structural or dynamic role *Biochemistry* **30**, 8919-8923
  - ⊛ Williamson M.P. (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins *Biochem. J.* **29**, 249-260

- 
- Wu J., Matunis M.J., Kraemer D., Blobel G. & Coutavas E. (1995) Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region *J. Biol. Chem.* **23**, 14209-14213
  - Xu Q., Leiva M.C., Fischkoff S.A., Handschumacher R.E. & Lyttle C.R. (1992) Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin *J. Biol. Chem.* **267**, 11968-11971
  - ⊕ Yaron A. & Naider F. (1993) Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 31-81
  - Zeder-Lutz G., Regenmortel M/H.V., Wenger R. & Altschuh D. (1994) Interaction of cyclosporin A and two cyclosporin analogs with cyclophilin: Relationship between structure and binding *J. Chromatog.* **662**, 301-306
  - Zydowsky L.D., Etzkorn F.A., Chang H., Ferguson S.B., Stoltz L.A., Ho S.I. & Walsh C.T. (1992) Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition *Protein Sci. USA* **1**, 1092-1099