

Kristallographische Studie zum
Gewebefaktor (*Tissue Factor*),
dem Kofaktor von Faktor VIIa

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"Dr. rer. nat."

vorgelegt
dem Fachbereich Chemie, Biologie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von Diplom–Physikerin
Katja Fälber
geboren in Bad Hersfeld

Berlin, im Februar 2002

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 1998 bis Dezember 2001 in der Forschungsgruppe Kristallographie (Leiter: Univ.-Prof. Dr. Udo Heinemann) am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch unter Betreuung von Herrn Dr. habil. Yves Muller erstellt.

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. U. Heinemann
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Oschkinat

Die Disputation erfolgte am 30. April 2002

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
Abstract	9
I Einleitung	12
1 Einleitung	13
II Material und Methoden	20
2 Allgemeines	21
3 Proteinlösungen	22
3.1 Die Fab-Fragmente D3 und D3H44	22
3.2 TF-219, TF-243 und TF-263	22
3.3 Die Mutante TF-263 C245S	23
3.3.1 Zellaufschluß	23
3.3.2 1. Reinigungsschritt: D3-Sepharose	24
3.3.3 2. Reinigungsschritt: SP-Sepharose	25
3.3.4 Die Doppelbande	26
3.3.5 Variation des Protokolls	27
4 Komplexbildung TF · Antikörper	28
5 Kristallisation und Kryoprotektion	30
5.1 Allgemeines	30
5.2 Kryoprotektion	31
5.3 Kristalle von D3, D3H44 und TF-219·D3H44	31

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	3
6 Zur Theorie der Strukturlösung	34
6.1 Das Phasenproblem in der Kristallographie	34
6.2 Methode des Molekularen Ersatzes	36
6.3 Verfeinerung	37
7 Strukturlösung von D3, D3H44 und TF-219·D3H44	40
7.1 Datensammlung und -auswertung	40
7.2 Strukturbestimmung und Interpretation	42
7.3 Datenbankeinträge	44
III Kristallisation von membranständigem TF	45
8 Full length-TF	46
8.1 TF-263	46
8.2 TF-263, Mutante C245S	47
8.3 TF-263 im Komplex mit Fab-Fragment D3	49
9 TF-243	50
9.1 TF-243	50
9.2 TF-243 im Komplex mit Fab-Fragment D3	50
10 Diskussion und Ausblick	52
IV Antikörperbindung von TF-219	54
11 Kristallstrukturen	55
11.1 Das murine Fab-Fragment D3	55
11.2 Das humanisierte Fab-Fragment D3H44	56
11.3 Der Komplex TF-219·D3H44	58
12 Diskussion	60
12.1 Muriner D3 <i>versus</i> humanisierter D3H44	60
12.1.1 Vergleich der Strukturen	60
12.1.2 Wassermoleküle in den Strukturen D3 und D3H44	67
12.1.3 Der Humanisierungsprozeß	68
12.1.4 Antikörper mit demselben humanen Grundgerüst	74
12.2 TF-219 im Komplex mit D3H44	78

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	4
12.2.1 Die Struktur des TF·D3H44–Komplexes	78
12.2.2 Strukturelle Unterschiede zu TF·5G9	81
12.2.3 Die Bindungsstelle in TF·D3H44	83
12.2.4 Vergleich mit der Bindungsstelle von TF·5G9	90
12.2.5 Wassermoleküle in der Bindungsstelle	91
12.2.6 Antigen–Erkennung in TF·D3H44	94
12.2.7 Andere hochaufgelöste Antigen–Antikörper–Strukturen . . .	95
12.2.8 Bewertung der Ergebnisse	97
V Literaturverzeichnis	100

Abkürzungsverzeichnis

ADA	n-(2-Acetamido)iminodiacetatsäure
Bicine	n,n-Bis(2-hydroxyethyl)glycin
C ₈ E ₄	Tetraethylenglykol-Monooctylether
C ₁₂ E ₈	Polyoxyethylen-8-lauryl-Ether
C _L , C _{H1}	konstante Domäne der leichten und der schweren Kette
CDR	<i>complementarity determining region</i> , Bindungsschleifen
CMC	<i>critical micellar concentration</i> , kritische Mizellenkonzentration
CNBr	Bromcyan
CV	<i>column value</i> , Säulenvolumen
Da	Dalton
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
EGF-Domäne	<i>epidermal growth factor domain</i> , Epidermale-Wachstumsfaktor ähnliche-Domäne
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
\vec{F}	Strukturfaktor
F.VIIa	Faktor VIIa
F.IX	Faktor IX
F.X	Faktor X
I	Intensität
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
Na-OAc	Natrium-Acetatpuffer
β -OG	β -Octylglucopyranosid
PDB	Protein-Datenbank
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
RMS	<i>root mean square</i> , mittleres Fehlerquadrat
SAS	<i>solvent accessible surface</i> , Lösungsmittel-zugängliche Fläche
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TF	<i>Tissue Factor</i> , Gewebefaktor
TF-219	TF, Aminosäuren 1-219
TF-243	TF, Aminosäuren 1-243
TF-263	<i>full length</i> -TF, Aminosäuren 1-263
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
FNIII-Domäne	Fibronectin-Typ III-Domäne
Tris/HCL	Tris(hydroxymethyl)aminoethan/Hydrochlorid
V _L , V _H	variable Domäne der leichten und der schweren Kette
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Dr. habil. Yves Muller für die Überlassung des Themas, seine zielgerichtete Betreuung und sein Interesse an diesem Projekt. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Univ.–Professor Dr. Udo Heinemann für seine Unterstützung und die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu dürfen.

Stellvertretend für die ganze FG Kristallographie möchte ich Gisela Sklenar, Annette Feske, Yvette Roske, Andreas Knespel und Dr. habil. Jürgen Müller für die gute, kollegiale und menschlich angenehme Zusammenarbeit sowie die vielen kleinen, aber doch so wertvollen Tipps und Tricks danken.

Mein Dank gilt auch unseren Kooperationspartnern Dr. Len Presta, Dr. Robert F. Kelley, Dr. Daniel Kirchhofer und Dr. Charles Eigenbrot bei Genentech, Inc., für die Bereitstellung von Material und die anregende Diskussion über dieses Projekt.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Albrecht Otto, Dr. Eva Müller und Susanne Kostka aus der FG Proteinchemie am MDC, die mit großer Sorgfalt die Sequenzierungen und Massenspektroskopie–Experimente durchführten.

Mein tiefer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, die immer für mich da waren. Gleiches gilt für meinen Freund Wolf und meine Freundin Vera und deren Familien.