

Teil I

Einleitung

Kapitel 1

Einleitung

Gewebefaktor (TF, *Tissue Factor*) ist als Kofaktor von Faktor VIIa (F.VIIa) am ersten Schritt des extrinsischen Reaktionsweges der Blutgerinnungskaskade beteiligt. TF wird normalerweise auf den Zellen der Adventitia präsentiert [1]. Nach Schädigung des Gefäßes werden diese Zellen dem im Blut zirkulierenden F.VIIa ausgesetzt, wodurch der hochaffine, kalziumabhängige Komplex zwischen TF und F.VIIa gebildet wird. Dieser Komplex fördert die Blutgerinnung auf verschiedene Weisen, (Abb. 1.1). Einerseits weist der TF·F.VIIa-Komplex eine im Vergleich zu freiem F.VIIa 10^5 -fach höhere proteolytische Aktivität auf [2], die zur Aktivierung von Faktor X (F.X) führt. Andererseits unterstützt der TF·F.VIIa-Komplex die autokatalytische Aktivierung von F.VII zu F.VIIa, deren Verhältnis im Blut normalerweise 100 : 1 beträgt [3], [4]. Zusätzlich besitzt der TF·F.VIIa-Komplex proteolytische Aktivität für die Aktivierung von Faktor IX (F.IX) und bildet damit eine Verbindung zum intrinsischen Weg der Blutgerinnungskaskade. Die Blutgerinnung endet mit der Bildung eines Fibringerinnsels [5], [6].

TF ist ein integrales Membranprotein, das aus einer extrazellulären Domäne (Aminosäuren 1–219), einer Transmembrandomäne (220–242) und einer zytoplasmatischen Domäne (243–263) besteht [7], [8], [9]. Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus zwei Fibronectin-Typ III-Domänen (FNIII) zusammen.

Die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von TF im Komplex mit F.VIIa zeigt die Wechselwirkung der γ -Carboxy-Glutaminsäure-reichen Domäne und der ersten Epidermalen-Wachstumsfaktor ähnlichen (EGF)-Domäne von F.VIIa mit der C-terminalen FNIII-Domäne von TF. Die zweite EGF-Domäne und die Serin-Protease-Domäne von F.VIIa sind im Kontakt mit der N-terminalen Domäne von TF [10]. Die Verankerung von TF in der Zellmembran könnte die Funktion eines verankerten Gerüsts haben, das F.VIIa mit der Protease-Domäne in den Blutstrom orientiert und

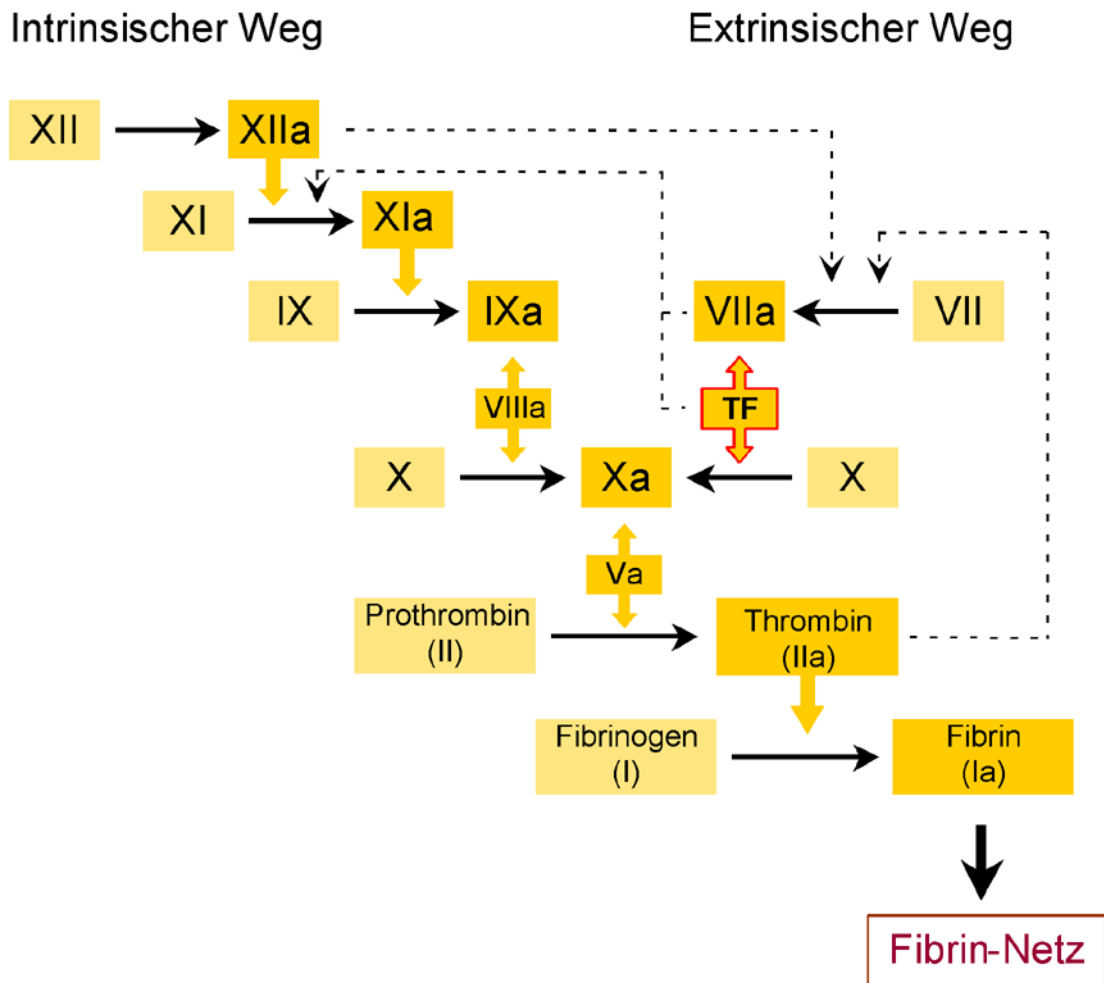


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade. Die Faktoren sind durch ihre Nummer dargestellt. "a" kennzeichnet die aktivierte Form eines Faktors. Quervernetzungen des intrinsichen und des extrinsichen Reaktionsweges sowie Rückkopplungen, die den *Tissue Factor* (TF)–Faktor VIIa Komplex betreffen, sind gestrichelt dargestellt

somit die Aktivierung von F.X und F.IX fördert.

Sequenz- und Strukturanalysen zeigen, daß TF zur Familie der Zytokin-Rezeptoren gehört [11], [12]. Die Familie dieser Rezeptoren ist in zwei Klassen unterteilt [11], die sich in der Anzahl der Disulfidbrücken (3 in Klasse I-, 2 in Klasse II-Rezeptoren), der Orientierung der beiden FNIII-Domänen zueinander (80° versus 120°) und einem in Klasse I konservierten WSXWS-Motiv (Einbuchstaben-Kode für Aminosäuren) unterscheiden. Zur Klasse I gehören beispielsweise der Wachstumshormon-Rezeptor GHR, der Prolactin-Rezeptor PRLR, der Erythropoietin-Rezeptor EPOR, einige der Interleukin-Rezeptoren, die Granulozyten- und Granulozyten-/Macrophagen-Stimulierungsfaktoren G-CSF und GM-CSF sowie der Leukämie-Inhibierungsfaktor. TF wird der Klasse II zugeordnet, wie auch die Interferon- α -, β - und γ -Rezeptoren [11].

Trotz der Zuordnung zur Familie der Zytokin-Rezeptoren ist ein möglicher Weg der Signalübertragung ebenso wie die Funktion der zytoplasmatischen Domäne bislang unbekannt. Es gibt allerdings einzelne Publikationen, die einen solchen Signalübertragungsprozeß suggerieren. Rottingen et al. [13] beschreiben nach der Komplexbildung von TF-F.VIIa eine Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in J82-Zellen, COS-1-Zellen, renalen Kaninchenzellen und humanen Endothelzellen. In einer anderen Studie sind zwei Mutanten von *full length*-TF auf ihre Funktion in der Metastasierung untersucht worden [14], [15]. In der ersten Mutante wurden die drei Serin-Reste in der zytoplasmatischen Domäne durch Alanine ersetzt, um eine Phosphorylierung auszuschließen. Die zweite Mutante hatte 4 Mutationen im extrazellulären Teil, die die F.VIIa-Bindung und damit die Blutgerinnung verhinderten. Beide Mutanten zeigten eine nur schwache Metastasierung in Mäusen im Vergleich zum nativen TF, was bedeutet, daß die Bindung der extrazellulären Domäne von TF an F.VIIa und die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne für die Metastasierung von Bedeutung sein könnten.

Für diese TF-Mutanten wurde auch der Zusammenhang von TF mit der Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in malignen Zelllinien untersucht [15], [16]. Hier zeigte sich, daß TF mit Mutationen in der extrazellulären Domäne, die die F.VIIa-Bindung verhindern, in gleichen Mengen wie VEGF produziert wird. Für TF mit Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne, die die Phosphorylierung verhindern, ist wenig bis gar kein VEGF nachzuweisen. Dies weist auf eine mögliche Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von TF für die Regulation von VEGF in malignen Tumorzellen hin.

Da bisher noch keine Struktur eines Rezeptors der Zytokin-Rezeptor-Familie mit

Transmembrandomäne und zytoplasmatischer Domäne gelöst wurde, ist in dieser Arbeit versucht worden, die Struktur von TF mit den Resten 1–243 bzw. 1–263 als Modellsystem für einen *full length*-Zytokin-Rezeptor zu bestimmen.

TF wird unter anderem mit einer Reihe von Erkrankungen in Verbindung gebracht, die im Zusammenhang mit der Blutgerinnung stehen, u.a. der Thrombose und Atherosklerose [17]. Durch die Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAB) für die Medizin ist eine neue Klasse von Arzneimitteln entstanden, die gezielt an humane Proteine bindet und dadurch deren Funktion inhibiert. Es besteht die Hoffnung, mit der Inhibierung der proteolytischen Aktivität des TF·F.VIIa-Komplexes die oben genannten Krankheiten behandeln zu können.

Es sind mehrere Antikörper gegen TF entwickelt worden, die in *ex vivo*-Koagulationsexperimenten getestet und deren Bindungsepitope auf der TF-Oberfläche mittels Mutagenese-Studien bestimmt wurden [18], [19], [20]. Kirchhofer und Mitarbeiter [18] zeigten, daß die von ihnen verwendeten Antikörper abhängig von ihrer Wirkung in zwei Gruppen aufgeteilt werden können. In der ersten Gruppe ist die Inhibierung der Koagulation abhängig von der F.VIIa-Konzentration und beruht auf einer Überlapung des Bindungsepitops dieser Antikörper mit der Bindungsstelle von F.VIIa auf der N-terminalen TF-Domäne [10]. In der zweiten Gruppe, die sich durch eine erheblich bessere Inhibierung der Blutgerinnung auszeichnet, verhindern die Antikörper D3 und 5G6 nicht die Bindung zwischen TF und F.VIIa, sondern erkennen ein Epitop auf der C-terminalen FNIII-Domäne von TF. Wie die Kristallstruktur des unabhängig von D3 und 5G6 gewonnenen anti-TF Antikörpers 5G9 in Komplex mit TF zeigt [21], ist die Inhibierung der Koagulationskaskade darauf zurückzuführen, daß sich das Bindungsepitop von TF mit der vorhergesagten Kontaktregion für die Substrate F.X und F.IX [22], [23], [24] und für F.Xa [25], [26] überschneidet. Somit konkurrieren die Antikörper der ersten Gruppe mit der hochaffinen Komplexbildung zwischen TF und F.VIIa, wohingegen die Antikörper der zweiten Gruppe den transienten, niederaffinen trimeren Komplex zwischen TF·F.VIIa und dessen Substrat blockieren [22], [26]. Die besseren Ergebnisse der Antikörper der zweiten Gruppe in den *ex vivo*-Koagulationsstudien mögen einerseits darauf beruhen, daß die Bindung dieser Antikörper nicht nur an freien TF, sondern auch an den TF·F.VIIa-Komplex erfolgen kann, womit ein größeres Zeitfenster zur Verfügung steht. Andererseits ist die Konkurrenz eines niederaffinen Substrates um das Bindungsepitop leichter von einem Antikörper zu übertreffen als die eines hochaffinen Substrats.

Der murine Antikörper D3 wurde als potentielles Therapeutikum ausgewählt, und es wurde eine humanisierte Version mit dem Namen D3H44 generiert, die eine 100–

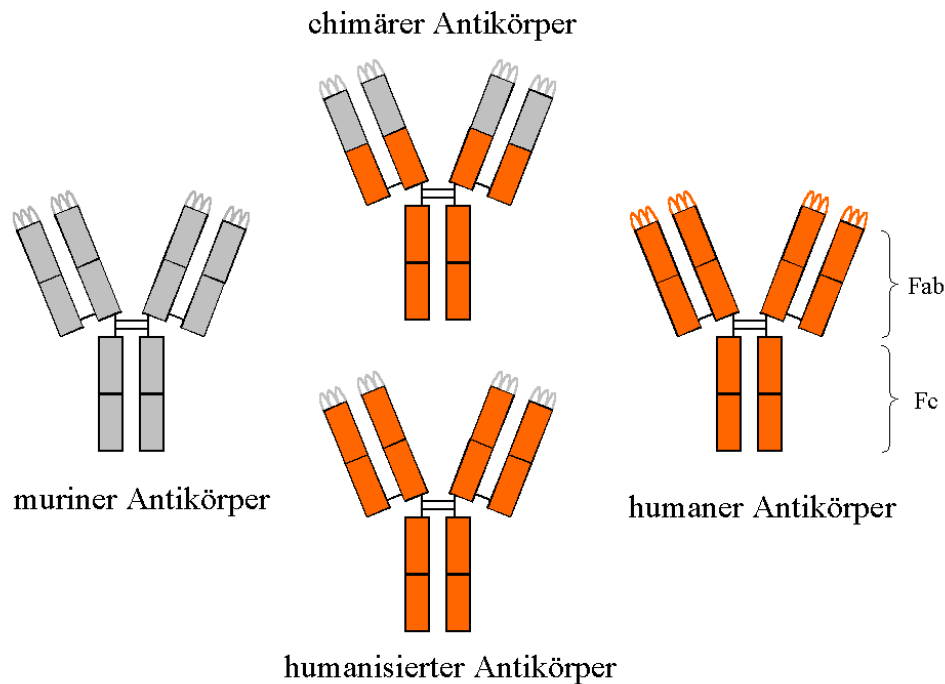


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von natürlich vorkommenden murinen Antikörpern (grau), humanen Antikörpern (orange) und im Labor entwickelten chimären und humanisierten Antikörper mit unterschiedlichen Anteilen des murinen und humanen Antikörpers. Die Farbanteile lassen keine Rückschlüsse auf die Sequenzidentität zu, da murine und humane Antikörper bereits über eine Identität von 60–80 % verfügen

fach erhöhte Bindungsaffinität aufwies [27].

Um die Wahrscheinlichkeit einer Immunreaktion nach Verabreichung von murinen Antikörpern zu verringern, werden die von Mäusen gewonnenen Antikörper an humane Antikörper adaptiert, indem entweder die variable Domäne Fv auf ein humanes Antikörper-Gerüst transplantiert wird, oder lediglich die Bindungsschleifen (CDRs, *Complementarity Determining Regions*) des murinen monoklonalen Antikörpers vom humanen Antikörper übernommen werden. Im ersten Fall wird der Antikörper als chimärer Antikörper, im letzteren als humanisierter Antikörper bezeichnet (siehe Abbildung 1.2).

Nach dem ersten Schritt im Humanisierungsprozeß, der Kombination des humanen Antikörper-Gerüsts mit den murinen Bindungsschleifen, ist in den meisten Fällen keine Bindung an das jeweilige Antigen vorhanden. Erst das Austauschen einzelner Reste im humanen Antikörper-Gerüst anhand von Modellen und das Testen von Mutanten in Bindungsstudien ermöglichen erneut die Antigen-Bindung. Oft ist es aus-

reichend, nach der Identifizierung einer für die Bindung kritischen Aminosäure im humanen Antikörper, diese durch diejenige im murinen Antikörper zu ersetzen [28], [29], [30], [31]. In diesem Zusammenhang wird häufig auch versucht, die Bindung durch die Aminosäure-Zusammensetzung der Bindungsschleifen zu verbessern. Obwohl einzelne Reste außerhalb der CDRs — wie zum Beispiel H71 [32], [33], [34], [35] — häufiger als andere eine Bedeutung für die Bindung haben, gibt es kein allgemeingültiges Schema, nach dem ein muriner Antikörper in einen humanisierten Antikörper überführt werden kann.

Da von vielen humanisierten Antikörpern häufig nur eine Kristallstruktur der murinen oder der humanisierten Variante vorhanden ist, kann die Auswirkung von einzelnen Mutationen nur modelliert werden. Die vollständige Beschreibung des Humanisierungsprozesses durch die murine und die humanisierte Kristallstruktur der Fab-Fragmente ist bisher nur für den Antikörper A5B7, der ein Tumor-assoziiertes Glycoprotein bindet, und CTM01, der gegen polymorphes epithelgebundenes Mucin gerichtet ist, publiziert [36].

Derzeit werden etwa 80 chimäre, humanisierte oder vollständig humane Antikörper untersucht. Unter den 11 Antikörpern, die derzeit (12/2001) zu therapeutischen Zwecken zugelassen sind, sind 4 humanisierte Antikörper, nämlich HerceptinTM (Genentech Inc.) gegen metastasierenden Brustkrebs, ZenapaxTM (Hoffmann-La Roche) gegen Abstoßungsreaktionen nach Transplantation, SynagisTM (Abbott Laboratories) bei Sepsis und CampathTM (Millennium Inc.) zur Therapie von chronisch lymphatischer Leukämie.

Die Kenngrößen im Antigen-Antikörper-Erkennungsprozeß sind Spezifität und Bindungsaffinität des Antikörpers. Aus der Struktur des Antigen-Antikörper-Komplexes können Informationen über verschiedene Parameter wie Form-Komplementarität von Bindungsstelle und Bindungsepitop auf dem Antigen, Größe des zu erkennenden Epitops und allgemeine physiko-chemische Eigenschaften der interagierenden Oberflächen, die die Spezifität eines Antikörpers beschreiben, gewonnen werden [37], [38], [39]. Dabei wird die Frage nach einem generellen Unterschied zwischen Antigen-Antikörper- und Protein-Protein-Wechselwirkungen nach wie vor diskutiert [40].

Bisher sind mehr als 20 verschiedene Antigen-Antikörper-Kristallstrukturen bestimmt worden, in denen das Antigen ein Protein ist (Übersicht in [41], [42]). Prinzipiell ist es eher schwer, aus diesen Strukturen allgemeingültige Schlußfolgerungen über die Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper auszuarbeiten, weil diese Strukturen meist nicht mit der Auflösung bestimmt wurden, die nötig wäre, um die Bindungsstelle im Detail zu charakterisieren. Außerdem fehlen häufig die zu den Antigen-

Antikörper-Komplexen gehörenden Strukturen der nicht aneinander gebundenen Antigene und Antikörper, so daß eine Aussage bezüglich Konformationsänderungen, die durch die Komplexbildung induziert werden, nicht möglich ist.

Die beiden Antikörper D3 und 5G9 sind unabhängig voneinander in unterschiedlichen Immunisierungsprozessen gewonnen worden [18], [19], [43], [44]. Die Auflösung der TF·5G9-Struktur von 3,0 Å und die des freien 5G9-Antikörpers von 2,5 Å limitieren allerdings bislang die Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Bindungsstelle.

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es daher, den Humanisierungsprozeß strukturell nachzuvollziehen und die Bindung des medizinisch relevanten D3H44-Fab-Fragments an TF zu charakterisieren.