

Zusammenfassung

Gewebefaktor (*Tissue Factor*, TF) ist als Kofaktor von Faktor VIIa (F.VIIa) an der Aktivierung des extrinsischen Systems der Blutgerinnungskaskade beteiligt. TF ist ein integrales Membranprotein, das aus einer extrazellulären Domäne (Aminosäuren 1–219), einer Transmembrandomäne (220–242) und einer zytoplasmatischen Domäne (243–263) zusammengesetzt ist. Sequenziell und strukturell gehört TF zur Familie der Zytokin-Rezeptoren.

Gegenstand dieser Arbeit waren Kristallisationsstudien an TF. Für die Kristallisation standen Proteinlösungen von TF-219, TF-243, TF-263 sowie Zellpaste von der Mutante TF-263 C245S und die Fab-Fragmente des murinen D3- und des humanisierten D3H44-Antikörpers zur Verfügung.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Kristallisation von *full length*-TF als Modell für einen Zytokin-Rezeptor. Die Struktur eines *full length*-Zytokin-Rezeptors ist bislang nicht gelöst worden. Da es sich bei *full length*-TF um ein solubilisiertes Membranprotein handelt, erwies sich die Kristallisation als schwierig. Als Ergebnis dieser Arbeit können somit nur Kristalle präsentiert werden, die entweder zu klein sind, um sie weiter kristallographisch zu untersuchen, oder die bei ausreichender Größe nur ein Streuvermögen bis 7 Å zeigten. Mit diesen Kristallen konnten keine Daten gesammelt werden und daraus folgend konnte dieser Teil der Arbeit nicht mit der Struktur des *full length*-TF abgeschlossen werden. Das Ergebnis dieser Studie läßt weitere Möglichkeiten zur Verbesserung der Kristalle erkennen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden (1) die Strukturen der beiden anti-TF Fab-Fragmente des murinen D3- und des humanisierten D3H44-Antikörpers gelöst, miteinander verglichen und bezüglich der strukturellen Aspekte des Humanisierungsprozesses beurteilt, sowie (2) die Antigen-Antikörper-Bindung des Komplexes zwischen D3H44 und TF-219 untersucht und Modifizierungen von D3H44 vorgeschlagen, die zu einer höheren Bindungsaffinität führen könnten.

Die Kristallstruktur des murinen D3 Fab-Fragments ist mit einer Auflösung von

2,4 Å gelöst worden, die des humanisierten Fab-Fragments D3H44 mit 1,85 Å und die des Komplexes zwischen der extrazellulären Domäne von TF und D3H44 mit 1,85 Å.

Der Vergleich der Struktur des murinen D3 mit der des humanisierten D3H44 zeigt, daß trotz verschiedener Antikörper-Gerüste nur geringe Unterschiede vorliegen. Die C_{α} -Atome überlagern sich mit einer Abweichung von 1,27 Å (RMS, *root-mean-square*). Strukturelle Abweichungen in den C_{α} -Atomen der Hauptkette beider Antikörper sind hauptsächlich im "unteren" Bereich der variablen Domäne zu finden, der an die konstante Domäne angrenzt.

Während des Humanisierungsprozesses von D3H44 sind 7 Aminosäuren im Antikörper-Gerüst und 6 Aminosäuren in den Bindungsschleifen (CDRs, *Complementarity Determining Regions*) ausgetauscht worden, um die Komplementarität der Bindungsstelle wiederherzustellen bzw. zu verbessern. Dabei konnte eine 100-fach bessere Bindung an TF im Vergleich zu der des murinen D3 Fab-Fragments erreicht werden. Die wichtigste Mutation, die nach der Kombination des humanen Antikörper-Gerüsts mit den murinen CDRs eine TF-Bindung gewährleistete, war Arg-H71-Ala. Die große Seitenkette von Arginin behindert sterisch die Ausbildung der Konformation von CDR-H1 und -H2, die zur TF-Bindung notwendig ist. Andere Substitutionen verbessern den hydrophoben Kontakt zwischen leichter und schwerer Kette oder führen zu direkten Wasserstoffbrücken zwischen den Bindungsschleifen, die zuvor nur durch Wassermoleküle vermittelt wurden.

Eine große Übereinstimmung ist zwischen der D3H44-Struktur und den Strukturen der Fab-Fragmente anti-VEGF, anti-CD18 und anti-p185Her2 zu finden, die ebenfalls humanisiert wurden und dasselbe humane Antikörper-Gerüst wie D3H44 tragen.

Die Kristallstrukturen des D3H44 Fab-Fragments mit 1,85 Å Auflösung, der Komplex TF·D3H44 mit 1,85 Å Auflösung und die bereits publizierte Struktur des freien TF mit 1,7 Å Auflösung bieten die Möglichkeit, den Antigen-Antikörper-Erkennungsprozeß im Detail zu untersuchen. Die strukturellen Änderungen in D3H44 durch Komplexbildung mit TF sind gering und beschränken sich hauptsächlich auf die Umorientierung von Seitenketten. Die Kontaktfläche von TF und D3H44 zeichnet sich durch eine große Anzahl polarer Interaktionen aus. Zusätzlich sind 46 Wassermoleküle in diesem Kontaktbereich lokalisiert.

Unabhängig von D3 wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ein weiterer muriner anti-TF Antikörper (5G9) entwickelt, der nahezu dasselbe Epitop auf TF erkennt. Die Kristallstrukturen des freien Fab-Fragments 5G9 und des Komplexes zwischen TF und 5G9 (TF·5G9) sind mit 2,5 Å und 3,0 Å Auflösung gelöst worden. Die Untersuchung der Antigen-Antikörper-Bindung von TF an 5G9 ergab, daß Wassermoleküle in der

Bindungsstelle keine bedeutende Rolle spielen. Im Unterschied dazu sind in dieser Studie mit TF und D3H44 Wassermoleküle für die Vermittlung von Kontakten zwischen Antigen und Antikörper von Bedeutung.

In der Protein-Datenbank sind derzeit nur zwei weitere Systeme von Kristallstrukturen von Antigen-Antikörper-Komplexen und der freien Komponenten mit vollständigen Koordinaten verfügbar, die eine vergleichbare Auflösung aufweisen, nämlich Cytochrom c mit FabE8 sowie Lysozym mit dem Fab-Fragment HyHEL-63. Eine neue Auswertung dieser Strukturen nach den für die TF·D3H44-Struktur verwendeten Kriterien zeigt, daß diese Antigen-Antikörper-Komplexe Ähnlichkeiten aufweisen bezüglich (1) der Wassermoleküle im Kontaktbereich, (2) der Anzahl Wassermolekülen, die in einer freien Komponente und im Komplex gefunden werden, und (3) der Anzahl an Wassermoleküle, die nach der Komplexbildung durch polare Atome des Bindungspartners ersetzt werden.