

Teil II

Material und Methoden

Kapitel 2

Allgemeines

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde anhand der Absorption bei 280 nm berechnet (gemessen mit dem Spektralphotometer DU 7400 der Firma Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, Californien). Das Programm ProtParam schätzte die hierfür notwendigen Extinktionskoeffizienten für TF, D3 und D3H44 aus der Aminosäuresequenz mit der Methode von Gill und von Hippel ab [45], die die Extinktionskoeffizienten der Seitenketten von Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Cystein je nach Häufigkeit für eine bestimmte Wellenlänge addiert. Die verwendeten Werte sind $37080 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ für TF-219, $38360 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ für TF-243, $44050 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ für TF-263 und $79850 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ bzw. $68470 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$ für die Fab-Fragmente D3 und D3H44. Zur Bestimmung der Konzentration der TF-Antikörper-Komplexe wurden die jeweiligen Extinktionskoeffizienten addiert.

Für Chromatographie-Experimente stand ein ÄKTA-Gerät der Firma Amersham Pharmacia biotech, Freiburg, zur Verfügung, mit dem die hier beschriebenen Gelfiltrationen, Ionenaustauscher- und Affinitätschromatographien vorgenommen wurden.

Die Gele der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurden nach der Standardmethode von Laemmli [46] hergestellt und enthielten 15 % Acrylamid. Das Anfärben der Proteinbanden erfolgte mit *Coomassie Blue*. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und einige Minuten in einem 100° C-Wasserbad erhitzt.

Die Proteinlösungen wurden in den Vorrichtungen *Centriplus* und *Centricon* (Amicon, Inc., Beverly, USA) sowie in *Ultrafree*-Einsätzen (Millipore Corporation, Bedford, USA) entsprechend der Molekulargewichtsbegrenzung durch Zentrifugation aufkonzentriert.

Kapitel 3

Proteinlösungen

3.1 Die Fab-Fragmente D3 und D3H44

Für diese Studie standen gereinigte Proteinlösungen von den Fab-Fragmenten D3 und D3H44 zur Verfügung.

Das Fab-Fragment D3 wurde durch Papain-Spaltung des murinen Antikörpers D3 gewonnen, wohingegen das humanisierte Fab-Fragment D3H44 als Fab-Fragment in *E.coli* exprimiert wurde. Herstellung und Reinigung der Fab-Fragmente sind in [44], [18], [27] beschrieben. In der SDS-PAGE waren für beide Antikörper die Banden der leichten und der schweren Kette klar zu erkennen. Weitere Verunreinigungen waren nicht zu sehen.

3.2 TF-219, TF-243 und TF-263

Zusätzlich standen Proteinlösungen von TF-Konstrukten mit einer Länge von 219, 243 und 263 Aminosäuren zur Verfügung. Die Reinigungsvorschriften können [47] und [48] entnommen werden. Das Detergens β -Octylglucopyranosid (β -OG) solubilisierete TF-243, Polyoxyethylen-8-lauryl-Ether ($C_{12}E_8$) hielt TF-263 in Lösung.

Während TF-219 und TF-243 auch über Monate hinweg bei 4° C Lagerung keine Abbauprodukte in der SDS-PAGE zeigten, war bereits bei Beginn dieser Studie eine Doppelbande für TF-263 deutlich zu erkennen. Mit der Alterung dieser Proteinlösung nahm auch die Intensität mehrerer Banden in der SDS-PAGE bei höheren Molekulargewichten zu. Verantwortlich dafür könnte das freie Cystein an Position 245 in der zytoplasmatischen Domäne sein, das eine Aggregationsbildung initiiert. Erstaunlich ist nur, daß diese Aggregate trotz des Vorhandenseins von β -Mercaptoethanol im Probenpuffer und nach Aufkochen der Proben in der SDS-PAGE erkennbar waren. Auch

eine Gelchromatographie (Superdex–200 16/60) konnte die Aggregate nicht von der Hauptbande trennen, da das Chromatogramm einen signifikanten, nicht zu trennenden Doppelpeak enthielt.

Da auch die Kristallisationsexperimente mit TF–263 keine erfolgversprechenden Ergebnisse brachten, ist von weiteren Kristallisationsversuchen Abstand genommen worden. Als Alternative ist die im folgenden (Kapitel 3.3) beschriebene TF–Mutante C243S eingesetzt worden.

3.3 Die Mutante TF–263 C245S

Zusätzlich stand Zellpaste von der *E.coli*–Expression einer Mutante des TF–263 C245S zur Verfügung, in der das freie Cystein an Position 245 durch ein Serin ersetzt war. Das Konstrukt beinhaltet eine N–terminale Signalsequenz, die die extrazelluläre Domäne von TF ausschleust und die Membrandomäne von TF in der *E.coli*–Membran einbettet. Ebenfalls stand der D3–Antikörper in voller Länge für die Herstellung einer Affinitäts-säule als ersten Reinigungsschritt zur Verfügung, siehe Kapitel 3.3.2.

Unter Anwendung der mitgelieferten Vorschrift konnten $\approx 84\%$ von 150 mg D3–Antikörper an 3,3 g gefriergetrocknete CNBr–aktivierte Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden) gekoppelt werden. Die fertige D3–Sepharose–Säule hatte ein Säulenvolumen (CV, *column value*) von ≈ 12 ml. Die Funktion dieser Säule wurde mit TF–243 überprüft, und es konnte gezeigt werden, daß TF–243 mit einem pH–Sprung von 7,5 auf 3,5 eluiert werden kann. Das Gel zeigte noch geringe Verunreinigungen (geschätzt $< 10\%$), die wahrscheinlich von nicht gebundenem Antikörper stammten.

3.3.1 Zellaufschluß

Das Protokoll des Zellaufschlusses ist im Folgenden aufgeführt. Die Prozentangaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf ein Gewicht–zu–Volumen–Verhältnis (w/v).

- Aufnahme von etwa 10 g Zellpaste in 100 ml

20 mM	Na–Citrat
0,5 M	NaCl
2,0 M	Harnstoff
10 mM	Ethylendiammintetraacetat (EDTA)

0,2 mM	Pefabloc
1,0 %	Triton
pH	5,5

- Zellaufschluß mit Ultraschallstab
- 1 Stunde rühren bei 4° C
- Zugabe von 5 % Polyethylenimin (PEI) mit pH 7,0, so daß die Endkonzentration 0,5 % entsprach
- 30 min rühren bei 4° C
- Abzentrifugieren, 2 h \approx 40000 g

3.3.2 1. Reinigungsschritt: D3–Sepharose

Vor dem Auftragen des Überstandes mit einer Schlauchpumpe bei Raumtemperatur mit \approx 1 ml/min wurde die Antikörpersäule equilibriert mit

20 mM	Tris/HCl ¹
0,04 %	C ₁₂ E ₈
pH	7,5

Nach dem Auftrag wurde die Säule an das ÄKTA–Gerät angeschlossen. Es folgte ein Waschschrift mit etwa 8 Säulenvolumina des Equilibrierungspuffers. Im darauffolgenden Waschschrift mit etwa 4 Säulenvolumina enthielt der Puffer

20 mM	Tris/HCl
1,0 M	NaCl
0,5 M	Tetramethylammoniumchlorid (TMAC)
0,04 %	C ₁₂ E ₈
pH	7,5

Danach wurde nochmals mit ungefähr 10 Säulenvolumina Equilibrierungspuffer gespült. Ziel dieser intensiven Waschschriffe war, sowohl die Membranfragmente, als auch Triton durch das Detergens C₁₂E₈ zu ersetzen. Dieses Detergens hat einerseits den Vorteil, daß es leicht durch ein anderes Detergens ausgetauscht werden kann, andererseits ist es relativ preiswert. Die Elution der D3–Sepharose Säule erfolgte durch den Puffer

¹Tris(hydroxymethyl)aminoethan/Hydrochlorid

0,1 M	Na-OAc
0,2 M	NaCl
0,04 %	C ₁₂ E ₈
pH	3,5

Die Elution zeigte in den 280 nm- und 254 nm-Absorptionsverläufen ein Maximum mit einer Schulter. Die ersten Versuche zeigten, daß bei den Fraktionen mit hoher Konzentration Protein ausfiel, weshalb in den weiteren Experimenten 1 ml 2 M Tris/HCl pH 8,5 plus 60 µl 4 M NaCl-Lösung für die eluierten 1,0 ml Fraktionen vorgelegt worden ist. Durch einen pH-Wert im neutralen Bereich konnte so das Ausfallen des Proteins verhindert werden. In der SDS-PAGE waren geringe Mengen Fremdprotein zu sehen, wahrscheinlich abgespaltene Fragmente des Antikörpers. Die TF-Bande lief auch in diesem Fall im SDS-PAGE-Gel als Doppelbande. Fraktionen, deren Elutionsprofil und SDS-PAGE das Vorhandensein von freiem TF vermuten ließen, wurden für die weiteren Schritte verwendet.

3.3.3 2. Reinigungsschritt: SP-Sepharose

Die Equilibrierung der Kationenaustauscher-Säule erfolgte mit dem Puffer

20 mM	Na-OAc
0,1 M	NaCl
10 %	Glycerin
0,04 %	C ₁₂ E ₈
pH	3,5

Der gleiche Puffer wurde auch verwendet, um die von der Antikörpersäule kommende Proteinlösung vor dem Auftrag im Verhältnis 1:10 zu verdünnen. Der Auftrag der Proteinlösung auf die Säule konnte mit einer Schlauchpumpe vorgenommen werden (≈1-2 ml/min). Der nächste Waschschrift von mindestens 4 Säulenvolumina des Equilibrierungspuffers erfolgte über Nacht am ÄKTA-Gerät.

Eluiert wurde mit einem Salz-Gradienten von 0,1 M auf 0,5 M NaCl innerhalb von 5 Säulenvolumina. Das Elutionsprofil und die Gele zeigten, daß TF-263 C245S-Protein isoliert wurde, auch wenn TF-263 C245S weiterhin in der SDS-PAGE in einer Doppelbande nachweisbar war.

Nach Pufferaustausch und Aufkonzentrieren wurde die Proteinlösung mit einer Konzentration von 8.8 mg/ml zum Kristallisieren verwendet, siehe Kapitel 8.2.

Die maximale Menge, die mit dieser Vorschrift in einem Arbeitsgang gereinigt werden konnte, betrug 2 mg Protein. Limitierender Faktor war nicht die eingesetzte Menge Zellpaste, sondern die Kapazität der Antikörpersäule. Der Durchfluß enthielt noch TF, was durch wiederholtes Auftragen auf die D3–Sepharose–Säule nachgewiesen wurde.

3.3.4 Die Doppelbande

Auf der Suche nach der Ursache der Doppelbande wurden zunächst alle Puffer zum Erstellen von SDS–Polyacrylamid–Gelen erneuert, um ein Artefakt bei der Gelelektrophorese auszuschließen. Es zeigte sich keine Änderung.

Eine zweite Überlegung galt dem korrekten STOP–Kodon des Konstrukts. Die Isolierung des Plasmids aus der Zellpaste wurde mittels Mini–Prep–Kit der Firma Qiagen, Hilden, vorgenommen. Die von der Firma BioTeZ GmbH, Berlin–Buch, angefertigten Primer starteten aus dem TF–Konstrukt heraus, dessen Nukleotid–Sequenz der *EMBL Nucleotide Sequence Database* [49] entnommen wurde. Die von der Firma Invitex, Berlin–Buch, vorgenommene Sequenzierung zeigte als STOP–Kodon TAA, das mit einer Häufigkeit von 59 % im Vergleich zu TGA mit 32 % und TAG mit 9 % in *E.coli*–Zellen vorkommt [50]. Ein nicht korrektes STOP–Kodon als Ursache der Doppelbande war somit unwahrscheinlich.

Die Arbeitsgruppe Proteinchemie am MDC versuchte zunächst, mittels Massenspektrometrie der gereinigten Proteinlösung die Ursache der Doppelbande aufzuklären. Dieser Versuch mißlang, vermutlich verhinderte die Transmembrandomäne das Gelingen des Experiments. Der enzymatische Verdau der Proteinlösung mit anschließender Identifizierung der Fragmente im Massenspektrum zeigte ausschließlich solche Fragmente, die eindeutig TF zugeordnet werden konnten. Das bedeutet, daß beide Banden im Gel TF enthielten. Somit fand sich zumindest eine Erklärung, warum die Doppelbande auch nach der Reinigung über die D3–Antikörpersäule erhalten blieb. Die anschließende Frage, ob eventuell die Signalsequenz nicht korrekt abgespalten wurde, sollte mittels N–terminaler Sequenzierung beantwortet werden. Hier fand sich, daß das Protein in der oberen Bande eindeutig mit der richtigen Sequenz SGTTN startet. Die untere Bande hingegen wies ebenfalls diese Sequenz auf, aber sie war mit einer weiteren Sequenz überlagert, die nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß beide Banden TF enthielten. Der Unterschied zwischen beiden Banden konnte nicht identifiziert werden.

Paborsky und Mitarbeiter [48] reinigten TF–263 nach Expression des Gens in humanen Nierenkarzinomzellen (293–Zellen) und in *E.coli* K12–Zellen. Die Autoren fanden ebenfalls die Doppelbande von TF aus *E.coli*–Zellen, nicht aber für TF aus 293–

Zellen. Anhand einer radioaktiven Markierung mit ^{35}S -Cystein während der *E.coli*-Expression untersuchten sie die Stadien der Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dazu wurde die Expression gestoppt und nach Zellaufschluß mit anschließender Immunpräzipitation das Ergebnis in der SDS-PAGE untersucht. Es zeigte sich eindeutig, daß TF-263 als ein Peptidstrang synthetisiert wird, aber bereits nach 2 Stunden als Doppelbande in der SDS-PAGE erscheint. Die Schlußfolgerung ist, daß die Ursache in der Aktivität einer nicht-TF-spezifischen Protease der verwendeten *E.coli*-Zellen liegt. HPLC (Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie, *high-performance liquid chromatography*)-Experimente ergaben, daß die Reste 255 bis 263 in der zytoplasmatischen Domäne abgespalten werden.

3.3.5 Variation des Protokolls

Wird für den 2. Reinigungsschritt anstelle des SP Sepharose-Kationentauschers eine Superdex-200-Gelfiltration verwendet, so läßt sich selbst unter der Bedingung von 20 mM Tris/HCl, 0,2 M NaCl, 0,04 % C_{12}E_8 bei pH 8,0 freier TF von freiem Antikörper separieren. Der TF-Antikörper-Komplex bildet sich in diesem Fall nicht aus, obwohl unter vergleichbaren Bedingungen TF-219·D3H44-Komplex, der mit gereinigten TF- und D3H44-Lösungen hergestellt wurde, vom freien Bindungspartner abgetrennt werden konnte (siehe Kapitel 4). Weitere Unterschiede der Reinigungschargen von TF-263 C245S, die mit einer Gelfiltrationssäule anstelle einer Kationentauscher-Säule gereinigt wurden, waren eine Trübung der Proteinlösung bei Lagerung im Kühlschrank (4° C), die nach Erwärmen (Hand) wieder verschwand, und eine maximal erreichbare Konzentration von 0,9 mg/ml.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen TF-Chargen ist, daß durch das Wegfallen der Waschprozedur auf der Kationenaustauscher-Säule noch große Membranfragmente von *E.coli* an der membranständigen Domäne von TF assoziiert waren, die auch die Antikörperbindung an die extrazelluläre C-terminale TF-Domäne verhierten. Basierend auf den Ergebnissen der Kristallisation dieser Charge (siehe Kapitel 8.2) sind diese Membranfragmente kein Nachteil, so daß die oben beschriebenen Waschschrte der Antikörper- / Kationenaustauscher-Säulen zwar wichtig sind, aber durchaus reduziert werden können. Eine weitere Reinigungscharge nach dem oben beschriebenen Reinigungsprotokoll mit einer auf die Hälfte der Säulenvolumina reduzierten Waschschrte zeigte die bisher besten Ergebnisse in der Kristallisation.

Kapitel 4

Komplexbildung TF · Antikörper

Die zu Beginn dieser Projekte vorliegenden Informationen zu Bindungsstudien und – konstanten [18] gaben Grund zu der Annahme, daß sich spontan ein 1:1 Komplex aus den Komponenten TF und D3 bzw. TF und D3H44 bilden wird. Analytische Testläufe mit einer Superose12–Gelfiltrationssäule von Lösungen der Komponenten TF–219 und D3 bestätigten dieses Verhalten. Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch für TF–219 das Chromatogramm des quantitativen Laufes von 10 mg TF–219·D3H44–Komplex mit einem berechneten 1,3–fachen Überschuß an TF, der kleinsten Komponente, auf einer Superdex–200 16/10–Säule. Der Laufpuffer enthielt 20 mM Tris/HCl und 150 mM NaCl, der pH Wert der Lösung war 8,0. Die SDS–PAGE bestätigte, daß der TF–219·D3H44–Komplex vom überschüssigen TF separiert werden kann. Etwas anders verhielt sich der Komplex zwischen TF und D3, bei dem die TF–Komponente die Transmembrandomäne enthielt. Abbildung 4.1 zeigt das Ergebnis der Gelchromatographie des TF–263·D3–Komplexes mit derselben Superdex–200 16/10–Säule wie sie auch für den TF–219·D3H44–Komplex verwendet wurde. Der Puffer enthielt 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,016 % C₁₂E₈ (4–fache CMC¹–Konzentration) mit einem pH–Wert von 7,5. Auch in diesem Fall schien sich der Komplex spontan zu bilden. Allerdings lief der freie TF–263 bei deutlich höherem Molekulargewicht (≈ 70 kDa) als den erwarteten 29kDa² und konnte deshalb nicht von dem TF–263·D3–Komplex getrennt werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß das Detergens die Transmembrandomäne mizellenartig umschließt. Entsprechend wurde für die Reinigung der TF–263·D3– und TF–243·D3–Komplexe ein Überschuß an D3–Antikörper gewählt, der kleinsten Komponente bezüglich des Laufverhaltens in der Gelchromatographie.

¹CMC – *critical micellar concentration*. Konzentration, ab der das Detergens Mizellen bildet.

²Abschätzung anhand von Standardproteinen Chymotrypsinogen–25 kDa, Ovalbumin–43 kDa, Rinderserum–Albumin–67 kDa

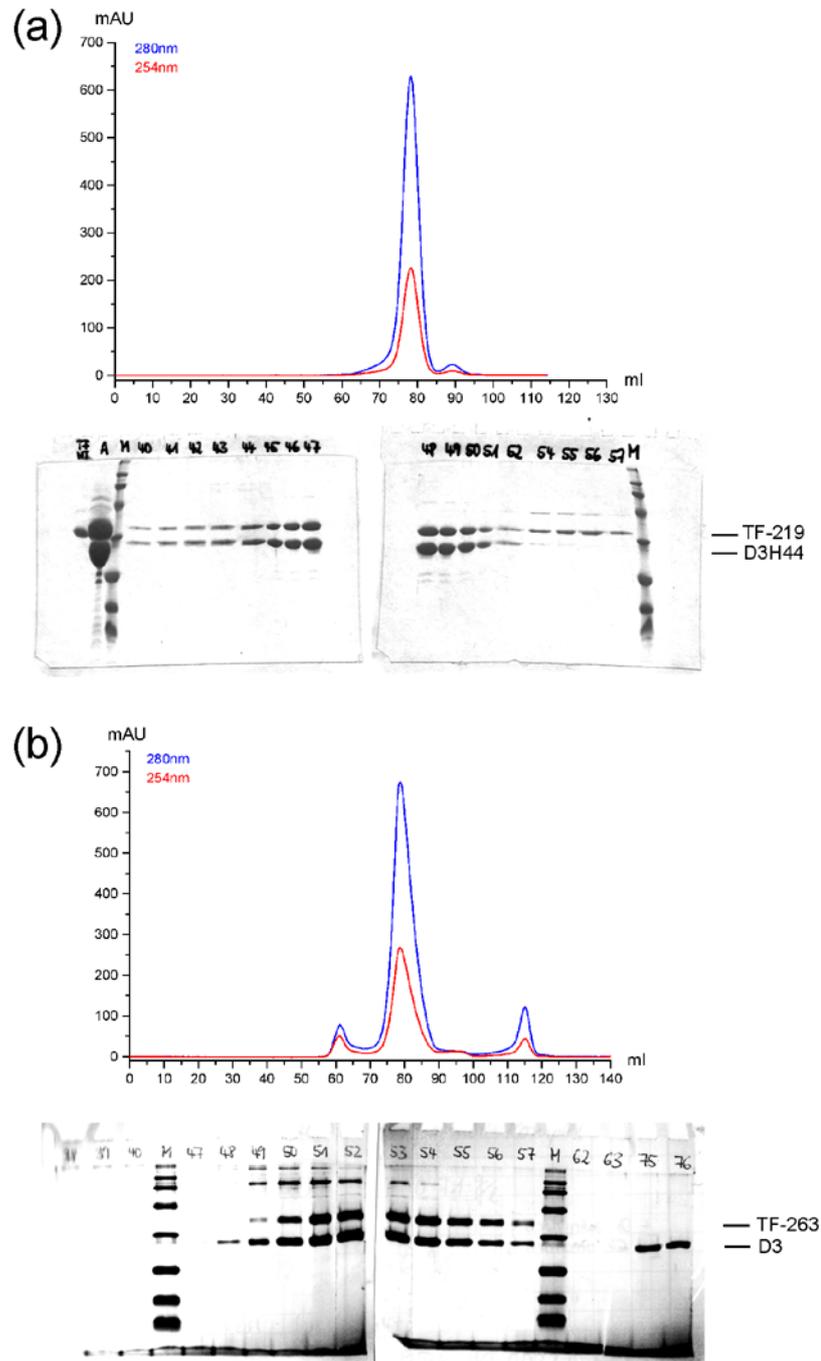


Abbildung 4.1: Diese Abbildung zeigt die Trennung der TF-Antikörper-Komplexe von den freien Komponenten mit einer Superdex-200 16/10 Säule. Die Einteilung der einzelnen Fraktionen ist nicht eingezeichnet. Die Beschriftung der Spuren in den Gelen bedeutet: Nummer – Fraktion, TF – TF-Referenz, A – Auftrag, M – Marker mit 7, 13, 21, 29, 45, 67 und 97 kDa Referenzproteinen. (a) TF-219-D3H44 mit 1,3-fachem Überschuß an TF-219. (b) TF-263-D3 mit 1,3-fachem Überschuß an D3. Bei der Separierung des Komplexes TF-263-D3 lief freier TF-263 bei ähnlichen Molekulargewichten (≈ 70 kDa) wie der Komplex selbst. Ursache hierfür war wahrscheinlich das Detergens, das den Membranbereich mizellenartig umschloß und damit das Laufverhalten in der Gelchromatographie beeinflusste

Kapitel 5

Kristallisation und Kryoprotektion

5.1 Allgemeines

Der Pufferaustausch erfolgte mit einer Sephadex–G25–Säule, die sich auch für den Austausch von Detergentien bewährt hat [51]. Vor der Verwendung für Kristallansätze wurde die Proteinlösung filtriert ($0,22 \mu\text{m}$), um grobe Verunreinigungen zu entfernen.

Als Standardmethode diente die Kristallisation im hängenden Tropfen, siehe u.a. [51]. Dazu wurden zu gleichen Teilen Proteinlösung und Kristallisationslösung auf einem silikonisierten Deckgläschen in einem Tropfen gemischt. Das Deckgläschen wurde dann mit dem Tropfen nach unten hängend luftdicht auf einen Topf einer Zellkulturschale gesetzt, der $\approx 700 \mu\text{l}$ Kristallisationslösung enthielt. Da der Tropfen nur die halbe Konzentration des Präzipitanten im Vergleich zur Kristallisationslösung im Reservoir enthielt, kam es zu einer Wasserabgabe des Tropfens in die Dampfphase zum Ausgleich des Konzentrationsgefälles (Raoult'sches Gesetz). Durch den Entzug von Wasser im Kristallisationstropfen konzentrierte sich das Protein. Nach Überwinden der Löslichkeitsschwelle fiel das Protein entweder kristallin (Kristallwachstum) oder amorph (Präzipitat) aus.

Die Kristallisationsexperimente jedes Proteins begannen mit den Kristallisationslösungen, wie sie von [52], [53] als "Screen I und II" beschrieben wurden. Sowohl kommerziell erworbene Kristallisationslösungen von Hampton Research Corp., Laguna Niguel, USA, als auch in unserem Labor hergestellte Lösungen kamen zum Einsatz. Mit der Methode des hängenden Tropfen wurden $1 \mu\text{l}$ Protein– zusammen mit $1 \mu\text{l}$ Kristallisationslösung im Tropfen bei 4°C und 20°C angesetzt.

Die Variation von Präzipitanten, Puffern, pH–Wert, Additiven und Kristallisationsmethoden [54], [55], [51], [56] führte zu den in den jeweiligen Kapiteln aufgezeigten Ergebnissen. Verwendet wurden Chemikalien, Detergentien und Zubehör der Her-

steller Merck Eurolab GmbH, Berlin, Sigma/Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Glycon GmbH, Luckenwalde und Hampton Research Corp., Laguna Niguel, USA.

Die Silikonisierung der Deckgläschen erfolgte anfangs mit einer Teflonhalterung in einer Silikonlösung (SERVA, Heidelberg) mit anschließender Trocknung für 4 Stunden bei 150° C. Dabei konnten etwa 100 Deckgläschen pro Arbeitsgang silikonisiert werden. Später wurde eine effektivere Methode der Proteinstrukturfabrik, Berlin, angewendet, mit der etwa 1000 Deckgläschen in einem Schritt silikonisiert werden können. Dazu wurden die Deckgläschen für 30 s in einer 5 %igen Prosil28-Lösung (Lancaster, Mühlheim am Rhein) geschwenkt, danach mit Aqua bidest. gespült und bei 37° C getrocknet.

5.2 Kryoprotektion

Zum Einfrieren der Kristalle in flüssigem Stickstoff wurden dem Kristallisationspuffer Kryoprotektanten zugesetzt. Im Falle der Konstrukte mit Transmembrandomäne — mit Ausnahme von TF-243 — zeigten sich nach Zugabe von 11–20 % Glycerin bzw. Ethylenglycol unmittelbar Auflösungserscheinungen. Einfrierversuche mit getrocknetem dünnflüssigen Paraffinöl (Merck, Darmstadt) und Ghee ("indische Butter") [57], lieferten für Kristalle von TF-243·D3 ebenfalls keine besseren Ergebnisse.

Für Kristalle des murinen D3-Fab-Fragments wurde dem Kristallisationspuffer 15 % Ethylenglycol zugesetzt. Die Verweildauer der Kristalle von 1,5–2 h in diesem Puffer zeigte die besten Ergebnisse bei den Streuexperimenten.

Im Falle des humanisierten D3H44-Fab Fragments enthielt der Puffer zum Einfrieren der Kristalle zusätzlich 20 % Glycerin. Die Kristalle befanden sich etwa 5 min in dem Puffer. In diesem Projekt wurden keine Vorversuche des Streuverhaltens im eigenen Labor unternommen, da aufgrund des Volumens der Kristalle keine Streuung zu erwarten war.

Der Puffer zum Einfrieren der Kristalle des TF-219·D3H44-Komplexes war mit 15 % Glycerin angereichert.

5.3 Kristalle von D3, D3H44 und TF-219·D3H44

Die größten Kristalle des murinen Fab-Fragments D3 wuchsen mit einer Kristallisationslösung von 1,6 M Li₂SO₄ und 100 mM Natriumacetat bei einem pH-Wert von 3,6 innerhalb von 7 bis 10 Tagen. Die Proteinlösung enthielt 17 mg/ml Protein, 20 mM

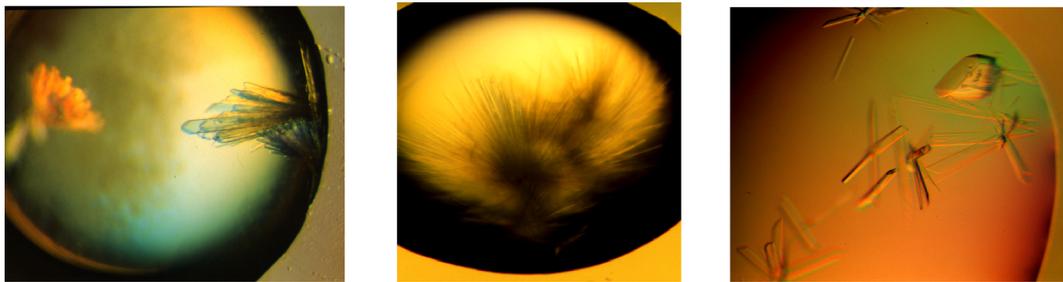


Abbildung 5.1: Diese Abbildung zeigt von links nach rechts die Kristalle des murinen Fab-Fragments D3, des freien humanisierten Fab-Fragments D3H44 und Kristalle des Komplexes TF-219·D3H44

Tris/HCl (pH 7,5) und 50 mM NaCl. Gute Ergebnisse fanden sich insbesondere mit der "Methode des sitzenden Tropfens" mit 3 μ l Protein- und 3 μ l Kristallisationslösung bei 20° C. Bei dieser Methode hängt der Tropfen nicht an dem Deckgläschen über der Kristallisationslösung, sondern sitzt auf einer zuvor in den Topf gestellten Brücke (*Microbridge*) oberhalb des Reservoirs. Abbildung 5.1 zeigt links Kristalle, die bis zu einer Größe von 30 x 75 x 300 μ m³ wuchsen. Für die Kristallisation des humanisierten D3H44-Fab-Fragments wurde eine Proteinlösung von 10 mg/ml in 20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl bei pH 7,5 verwendet, die mit 2,0 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M Natriumacetat bei pH 4,6 und 20° C im hängenden Tropfen zum Kristallwachstum führte. Der in Abbildung 5.1, Mitte, dargestellte Tropfen zeigt Kristalle, die in 3 bis 4 Monaten zu einer Größe von 20 x 20 x 400 μ m³ wuchsen. Von einem separierter Einkristall aus diesem "Stern" konnten die Daten zur Strukturlösung gesammelt werden.

Der TF-219·D3H44-Komplex, (siehe Kapitel 4, Seite 28) kristallisierte im Zeitraum von 3–4 Tagen mit einer Kristallisationslösung von 11 % PEG 6000¹, 2,0 M NaCl, 0,1 M Na-Hepes² bei pH 7,5 und 4° C im hängenden Tropfen, der sich aus 3 μ l Kristallisations- und 3 μ l Proteinlösung zusammensetzte. Letztere enthielt 12 mg/ml Komplex, 20 mM Na-Hepes, 0,01 % NaN₃ bei pH 7,5. Der Kristall, der zur Datensammlung verwendet wurde, hatte Abmessungen von 50 x 150 x 1200 μ m³. Es stellte sich heraus, daß die Auflösung und die Mosaizität³ in den Spitzen der nadelförmigen Kristalle deutlich besser war als im restlichen Kristall. Daraufhin wurden die Kristalle in einem *loop*⁴ montiert, der deutlich zu klein für die Kristalle war, so daß eine Kristall-

¹Polyethylenglykol

²4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure

³Die Unvollkommenheit von Kristallen kann mit einem Modell veranschaulicht werden, in dem sich der Kristall mosaikartig aus kleinen Blöcken perfekter Kristalle zusammensetzt, die leicht gegeneinander verdreht sind. Je ausgeprägter dieser Effekt ist, desto breiter sind die Reflexe auf den Aufnahmen und umso schlechter wird die Statistik der gemessenen Daten.

⁴Nylonschleife, mit der die Kristalle aus dem Tropfen gefischt und zur Datenmessung in flüssigem

spitze frei aus dem *loop* herausragte. Die Datensammlung erfolgte schließlich an einer überstehenden Kristallspitze. Durch die fehlende Kryolösung, die nur innerhalb des *loops* den Kristall umschließt, wurde der Untergrund auf den Bildern reduziert.

Kapitel 6

Zur Theorie der Strukturlösung

Aus den Abständen zwischen den Reflexen auf den Röntgenbeugungsaufnahmen kann die Raumgruppe und die Dimension der Elementarzelle¹ bestimmt werden. Bei der "Indizierung" der Reflexe werden jedem Reflex die entsprechenden Miller'schen Indizes (hkl) zugeordnet. Die Schwärzung der Reflexe ist ein Maß für die Intensität I des Reflexes (hkl), die dem Quadrat des Strukturformfaktors $\overline{F}^2(hkl)$ proportional ist (Darwins Formel).

$$I(hkl) \propto \overline{F}^2(hkl) \cdot \overline{F}^2(hkl)$$

Die Auswertung der Daten endet mit der Zusammenstellung der gemessenen Reflexe (hkl) und der Strukturformfaktoramplituden. Ziel der Strukturlösung ist es, aus den gemessenen Daten (hkl, $F(hkl)$) die Elektronendichte $\rho(x, y, z)$ des Proteins zu bestimmen. Danach wird ein Strukturmodell in die Elektronendichte eingebaut und an die Elektronendichte angepaßt, siehe "Verfeinerung", Kapitel 6.3.

Eine detailliertere Beschreibung ist u.a. in [58] gegeben.

6.1 Das Phasenproblem in der Kristallographie

Das "allgemeine Phasenproblem der Kristallographie" beruht auf der Tatsache, daß die Information über die Phase φ bei der Datenaufnahme verloren geht. Der Strukturformfaktor hat vektoriellen Charakter, so daß aus der Messung der Intensität, dem Quadrat des Strukturformfaktors, lediglich der Betrag $F(hkl)$ (Strukturformfaktoramplitude) bestimmt

¹Die Vektoren \vec{a} , \vec{b} und \vec{c} spannen die Elementarzelle auf. Durch die Translation der Elementarzelle um diese Gittervektoren kann das Kristallgitter aufgebaut werden. Die Kombination mit dem Inhalt der Elementarzelle (Anordnung der Atome, "Basis") führt zur Kristallstruktur.

werden kann. Der exponentielle Term, der Information über die Phase φ enthält, fällt weg.

$$\begin{aligned}\vec{F}(hkl) &= F(hkl) \cdot e^{i\varphi} \\ \vec{F}^*(hkl) &= F(hkl) \cdot e^{-i\varphi} \\ I(hkl) &\propto F^2(hkl)\end{aligned}$$

Prinzipiell kann die Elektronendichte $\rho(x, y, z)$ durch eine Fourier-Analyse bestimmt werden:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \cdot \sum_{hkl} F(hkl) \cdot e^{i\varphi(hkl)} \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Das Tripel $(h\ k\ l)$ beschreibt die Miller'schen Indizes der Reflexe und x, y, z sind die fraktionellen Koordinaten der Elementarzelle. V ist das Volumen der Elementarzelle.

Diese Gleichung enthält neben den gemessenen Daten noch die Phase φ . Um Information über die Phase φ zu erhalten, müssen weitere Verfahren angewendet werden. Methoden, um das Phasenproblem zu lösen, sind:

- **Molekularer Ersatz.** Die Methode des molekularen Ersatzes kann zur Strukturlösung verwendet werden, wenn eine homologe Struktur existiert.
- **Isomorpher Ersatz.** Hierzu müssen Atome mit hoher Ordnungszahl (Schweratome) an das Protein angelagert sein. Es wird mindestens ein Datensatz zusätzlich zum nativen Datensatz benötigt (SIR, *single isomorphous replacement*), eindeutig aber ist erst die Lösung von mindestens zwei Schweratomdatensätzen mit verschiedenen Derivaten (MIR, *multiple isomorphous replacement*). Bei den Methoden SIRAS und MIRAS wird zusätzlich die anomale Streuung (*anomalous scattering*) der Schweratome berücksichtigt.
- **Anomale Dispersion.** Bei dieser Methode müssen Atome mit ausreichend anomaler Streuung im Proteinmolekül eingebaut sein, z.B. Selen statt Schwefel in Methionin. Die Datensammlung erfolgt bestenfalls für eine (SAD, *single wavelength anomalous dispersion*), im Normalfall für drei verschiedene (definierte) Wellenlängen (MAD, *multiple wavelength anomalous dispersion*).
- **Direkte Methoden zur Strukturbestimmung** berechnen die Phase aus den gemessenen Intensitäten und der Annahme, daß die Elektronendichte immer positiv ist. Bedingung für diese Methode ist allerdings ein hochaufgelöster Datensätze mit unter 1 Å Auflösung.

6.2 Methode des Molekularen Ersatzes

Die Methode beruht auf der Annahme, daß sequenzhomologe Proteine eine ähnliche Struktur haben und deshalb die vorhandene Struktur als Startmodell für die neue Struktur verwendet werden kann [59]. Erst in folgenden Verfeinerungsschritten wird das Modell an die Beugungsdaten der neuen Struktur angepaßt.

Die Strukturlösung mit der Methode des Molekularen Ersatzes erfolgt in drei aufeinanderfolgenden Schritten, der Lösung der Rotationsfunktion, der Lösung der Translationssuche und der Verfeinerung des gefundenen Lösungsmodells als "Starrer Körper".

Zunächst werden das Strukturmodell und die gemessenen Daten in Übereinstimmung gebracht. In dem ersten Schritt wird das Strukturmodell durch Rotation so orientiert, daß es mit der "neuen" Struktur übereinstimmt. Dazu wird von dem Modell und den Daten eine phasenunabhängige Patterson-Funktion $P(uvw)$ berechnet, u , v und w sind dabei die Koordinaten des Pattersonraumes:

$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)|^2 \cdot \cos(2\pi(hu + kv + lw))$$

Mit der Rotationsfunktion lassen sich die Winkel α , β und γ bestimmen, um die das Strukturmodell rotiert werden muß, um als Modell in die Elementarzelle eingebaut werden zu können. Für die Winkel, bei denen die Patterson-Funktion des Strukturmodells mit der Patterson-Funktion aus den gemessenen Daten gut übereinstimmt, hat die Rotationsfunktion

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int P^{Modell}(\vec{u})^{Modell} \times P(\vec{u}) d\vec{u}$$

ein Maximum.

Der Integrationsradius ist als wichtiger Faktor zu beachten. Dieser sollte so groß gewählt werden, daß nur die intramolekularen "Selbstvektoren" und nicht die intermolekularen "Kreuzvektoren" berücksichtigt werden.

In einem zweiten Schritt wird das vororientierte Modell durch die asymmetrische Einheit translatiert und dabei für jeden Gitterpunkt ein skalierungsunabhängiger Korrelationskoeffizient bestimmt. Das Programm AMORE [60] errechnet zunächst einen Korrelationskoeffizienten aus den Intensitäten I_{obs} und I_{calc} für jeden Gitterpunkt (analog des Korrelationskoeffizienten C , nur mit I_{obs} und I_{calc} anstelle von $|F_{obs}(hkl)|$ und $|F_{calc}(hkl)|$). Lediglich für die besten Ergebnisse wird der Korrelationskoeffizient C und der R-Wert aus den Strukturfaktoren der gemessenen Daten $|F_{obs}(hkl)|$ und dem translatierten Modell $|F_{calc}(hkl)|$ berechnet. Ein Korrelationskoeffizient, der sich aus

Intensitäten berechnet, hat den Vorteil, daß er mit Fast-Fourier-Analyse schneller bestimmt werden kann als ein Koeffizient, der auf den Struktur Faktoren beruht [61]. Dieses Vorgehen spart Rechenzeit.

$$C = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs}(hkl)|^2 - \overline{|F_{obs}(hkl)|^2}) \times (|F_{calc}(hkl)|^2 - \overline{|F_{calc}(hkl)|^2})}{\left\{ \sum_{hkl} (|F_{obs}(hkl)|^2 - \overline{|F_{obs}(hkl)|^2})^2 \cdot \sum_{hkl} (|F_{calc}(hkl)|^2 - \overline{|F_{calc}(hkl)|^2})^2 \right\}^{\frac{1}{2}}}$$

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}(hkl)| - k|F_{calc}(hkl)||}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|}$$

k ist ein Wichtungsfaktor zwischen den gemessenen Daten und den Daten aus dem Modell. Die Lösung der Translationssuche zeichnet sich durch einen hohen Korrelationskoeffizienten C und einen niedrigen R -Faktor aus.

Der R -Faktor sollte nach der Rotations- und Translationssuche deutlich unter 59 % liegen, dem Erwartungswert der statistischen Verteilung der Atome in der Elementarzelle [62], [63].

Aus der Rotationssuche resultieren die Winkel und aus der Translationssuche der Verschiebungsvektor, die zur Platzierung des Modells benötigt werden. Prinzipiell könnte die Suche nach den Lösungen von Orientierung und Position auch gleichzeitig im 6-dimensionalen Raum stattfinden. Jedoch wird durch die immense Anzahl an Lösungsmöglichkeiten, die bei der Kombination von Rotations- und Translationssuche entstehen, dieses Vorgehen unpraktikabel.

Abschließend wird das Modell als "Starrer Körper" um die bisherige Lage verfeinert. Damit ist der Ausgangspunkt für die nun folgende Verfeinerung bestimmt.

6.3 Verfeinerung

Ein Problem für die Verfeinerung stellt das häufig ungünstige Daten-zu-Parameter-Verhältnis dar, dessen kritische Größe die Auflösung des Datensatzes ist. Unter Auflösung ist der kleinste Gitterabstand im Kristall zu verstehen, für den vollständige Beugungsdaten existieren. N ist die Anzahl Freiheitsgrade in einem Datensatz, die den zu bestimmenden Koordinaten x , y , z und der atomaren Auslenkung B ("B-Faktor", s.u.) für jedes Atom gegenüberstehen:

$$N = \frac{4}{3} \pi \frac{V}{d^3 \cdot m}$$

Dabei ist V das Volumen der Elementarzelle, d die Auflösung des Datensatzes und m die Multiplizität der Laue-Gruppe.

Um das Daten-zu-Parameter-Verhältnis zu verbessern, werden sogenannte *restraints* und *constraints* in der Verfeinerung berücksichtigt. *Restraints* erlauben den ste-

reochemischen Parametern wie Bindungslängen, -winkeln, planaren Gruppen, nicht-bindenden Abständen und elektrostatischen Wechselwirkungen nur eine begrenzte Abweichung von Standardwerten [64]. *Constraints* hingegen betrachten bestimmte Atom-Gruppen als starr, wie zum Beispiel die Seitenkette des Tyrosins. Während *restraints* zusätzliche Informationen (Daten) liefern, reduzieren *constraints* die Anzahl der zu bestimmenden Parameter, so daß das Daten-zu-Parameter-Verhältnis verbessert werden kann.

Für das atomare Startmodell kann aus den Koordinaten x , y , z eines jeden Atoms j ein Strukturfaktor F_{calc} berechnet werden:

$$F_{calc}(hkl) = \sum_j f_j \cdot e^{-B_j \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}} \cdot e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

B entspricht der atomaren Auslenkung $B = 8\pi^2 \overline{u^2}$, $\overline{u^2}$ ist die mittlere quadratische Auslenkung des Atoms um die Ruhelage, f_j ist der atomare Streufaktor, θ der Streuwinkel und λ die Wellenlänge des Röntgenstrahls.

Durch die Variation der Ortsparameter x , y , z und der atomaren Auslenkung B werden die Strukturfaktoren des Modells F_{calc} an die gemessenen Strukturfaktoren F_{obs} mittels *least square*- (Minimierung der Fehlerquadrate) oder *maximum likelihood*-Verfeinerungsmethoden angeglichen. Eine spezielle Methode im Rahmen des Verfeinerungsprozesses stellt die Verfeinerung durch *simulated annealing* dar. Hierfür wird die Bewegung der Atome in einem Kraftfeld freigegeben. Die Anfangsgeschwindigkeit, mit der sich die Atome bewegen, kann nach der Maxwell-Verteilung durch eine Temperatur ausgedrückt werden. Anschaulich wird bei dieser Methode das Molekül in einem Bad mit Temperaturen bis zu 3000 K aufgeheizt. Bei dem langsamen, schrittweise Abkühlen des Bades auf 300 K wird durch die Lösungen der Newton'schen Bewegungsgleichungen für die Atome die potentielle und kinetische Energie des Gesamtsystems minimiert. Dieses Verfahren wird eingesetzt, wenn ein Verfeinerungsprozeß in einem lokalen Energie-Minimum gefangen ist.

Die Berechnung von Differenzdichtekarten $\Delta\rho$ ist hilfreich für die Anpassung des Modells, da diese Funktion Maxima an den Orten aufzeigt, an denen Atome erwartet werden, und Minima dort, wo Atome falsch plaziert sind.

$$\Delta\rho(xyz) = \sum_{hkl} [|F_{obs}(hkl)| - |F_{calc}(hkl)|] \cdot e^{i\varphi(hkl)} \cdot e^{2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Das Ziel der Verfeinerung ist die Erarbeitung eines Modells, dessen R-Wert zwischen 15 und 20 % liegt.

Um ein "Überfitten" der Parameter zu vermeiden (schlechtes Daten-zu-Parameter-Verhältnis), werden 5–7 % der Reflexe in einem "Test-Set" zufällig ausgewählt. Diese werden bei der Verfeinerung nicht berücksichtigt. Mit diesen Daten wird der R_{free} -Faktor berechnet. Der restliche Datensatz "Arbeits-Set" wird verfeinert und daraus der R_{cryst} -Wert bestimmt. Die Differenz von R_{free} und R_{cryst} sollte für eine gute Struktur 5 % nicht überschreiten.

Gütekriterien einer Struktur sind die Auflösung, die R-Faktoren (R_{free} und R_{cryst}), die atomare Auslenkung (B-Faktoren), die verbleibende Differenzdichte, die Anzahl Solvensmoleküle, die Abweichung der Bindungslängen und -winkel und die Abweichung der Torsionswinkel Φ und Ψ von Standardwerten ($RMS = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$) für Proteine, die im Ramachandran-Diagramm bildlich dargestellt werden können. Der Koordinatenfehler $\overline{\Delta r}$ kann aus der σ_a -Statistik abgeschätzt werden [65], [66]. Dazu wird der lineare Korrelationskoeffizient für normalisierte Strukturaktoren σ_a gegen die Auflösung d aufgetragen. Die Steigung der Geraden ist proportional zum Quadrat des Koordinatenfehlers.

Kapitel 7

Strukturlösung von D3, D3H44 und TF-219·D3H44

7.1 Datensammlung und -auswertung

Für Testmessungen an Kristallen standen in der Arbeitsgruppe am MDC zwei Rigaku-Generatoren RU H2B 3x0,3-Fokus mit Kupfer-Drehanoden zur Verfügung (Wellenlänge $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$), einer der beiden mit Graphit-Monochromator und 180mm *Image-Plate* (MARResearch, Nordersted), der andere mit Göbel-Spiegel-System und 300mm *Image-Plate* (MARResearch, Nordersted).

Für den Datensatz des murinen D3-Fab-Fragments wurden 170 Aufnahmen in $1,0^\circ$ -Oszillationsschritten mit einer MAR345-*Image-Plate* an der BW7B-*Beamline* am EMBL, Außenstation Hamburg, aufgenommen. Dort konnten auch 170 Bilder in $0,5^\circ$ -Schritten von den TF-219·D3H44-Kristallen gesammelt werden. Die Datensammlung der D3H44-Kristalle erfolgte mit einem CCD-Detektor (MARResearch) an der *Beamline* ID14-2 am ESRF, Grenoble. Dieser Datensatz bestand aus 166 Aufnahmen mit $1,0^\circ$ -Oszillationswinkel.

Parallel zur Datensammlung wurden jeweils vorab Auswertungen mit DENZO [67] bzw. XDS [68] vorgenommen, um die Vollständigkeit der Datensätze zu gewährleisten. Das Programm STRATEGY [69] bestimmte den optimalen Startwinkel bei der Aufnahme des TF-219·D3H44-Datensatzes.

Alle Datensätze wurden mit XDS [68] ausgewertet.

Der Datensatz des murinen D3 Fab-Fragments konnte bis $2,39 \text{ \AA}$ in der Raumgruppe C2 ausgewertet werden, siehe Tabelle 7.1. Die Daten zeigten eine Redundanz¹

¹Mittlere Häufigkeit, mit der jeder Reflex (hkl) gemessen wurde.

Tabelle 7.1: Analyse der Röntgenstreudaten

	Fab D3	Fab D3H44	TF-219·D3H44
Raumgruppe	C2	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zelldimension der Elementarzelle	a=84,2 Å b=77,5 Å c=75,2 Å β=114,8°	a=49,1 Å b=78,2 Å c=58,9 Å β=107,6°	a=84,3 Å b=93,3 Å c=110,0 Å
Moleküle pro asym. Einheit	1	1	1
Lösungsmittelanteil [%]	46	45	60
Auflösung [Å]	2,39	1,85	1,85
Auflösung äußere Schale [Å]	2,39 – 2,58	1,85 – 1,90	1,85 – 1,96
Anzahl Reflexe (beobachtet / einzelne)	57098 / 16837	124061 / 36063	251218 / 73056
Vollständigkeit [%] (über alles / äußere Schale)	94,4 / 84,5	96,3 / 91,6	96,8 / 94,4
mittlere I / σ(I) (über alles / äußere Schale)	11,7 / 2,2	11,3 / 2,8	12,6 / 3,7
R _{sym} [%] (über alles / äußere Schale)	7,7 / 23,9	7,7 / 41,6	6,1 / 27,0

I–Intensität, σ–Standardabweichung,

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \bar{I}_i(hkl)|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}, \quad I_i\text{–Intensitäten symmetrieverwandter Reflexe}$$

von 3,4 und eine Vollständigkeit von 94,4 %.

Der D3H44–Datensatz konnten in der Raumgruppe P2₁ indiziert werden. Die 1,85 Å Daten wiesen eine Redundanz von 3,4, eine Vollständigkeit von 96,3 % und einen R_{sym}² von 7,7 % auf. Der Lösungsmittelanteil in beiden Antikörper–Kristallen war ungefähr gleich, nämlich 45 % und 46 %.

Die Struktur des TF-219·D3H44–Komplexes wurde in der Raumgruppe P2₁2₁2₁ mit einer Auflösung von ebenfalls 1,85 Å gelöst. Jeder Reflex wurde im Durchschnitt 3,4–mal gemessen und die Vollständigkeit der Reflexe betrug 96,8 %. Der R_{sym} von 6,1 % lag im akzeptablen Bereich. Der Lösungsmittelanteil war relativ hoch, was durch die Kristallpackung des L–förmigen TF-219·D3H44–Komplexes hervorgerufen wurde.

In Tabelle 7.1 sind die Beugungsdaten für alle drei Strukturen zusammengefaßt.

²R–Faktor, um die gemessene Intensität symmetrieverwandter Reflexe zu vergleichen

Tabelle 7.2: Richtige und erste falsche Lösung für die einzelnen Schritte bei der Strukturlösung mit der Methode des molekularen Ersatzes

Korrelation in σ	Rotation	Translation	Verfeinerung
Fab D3	18,4 / 8,2	26,6 / 22,2	31,2 / 23,3
Fab D3H44	34,5 / 11,1	44,2 / 29,7	53,2 / 33,3
TF-219·D3H44	25,2 / 23,3	12,6 / 9,3	26,0 / 11,9

7.2 Strukturbestimmung und Interpretation

Die Strukturen der Fab-Fragmente D3 und D3H44 und des Komplexes zwischen TF-219 und D3H44 konnten mit der "Methode des molekularen Ersatzes" unter Anwendung des Programms AMORE [60] gelöst werden.

In Tabelle 7.2 sind die Korrelationskoeffizienten der richtigen und der ersten falschen Lösung für die Rotationssuche, für die Translationssuche und für einen Verfeinerungsschritt mit dem Molekül als starrem Körper zusammengefaßt.

Der Unterschied zwischen der richtigen und der ersten falschen Lösung war nach der Rotationssuche für die Datensätze D3 und D3H44 deutlicher erkennbar als für TF-219·D3H44.

Zuerst wurde die Struktur des Datensatzes der TF-219·D3H44-Kristalle mit der TF-219·5G9-Struktur als Modell gelöst. Die Strukturverfeinerung erfolgte mit dem Programm CNS unter Verwendung der *standard refinement protocols* [70]. Das *waterpick*-Protokoll aus dem CNS-Programmpaket identifizierte die Wassermoleküle in der Elektronendichte. Die Kriterien waren 4 σ -Differenzdichte in der $(F_{obs}-F_{calc})$ -Elektronendichte³ für die Suche von Wassermolekülen und mindestens 1 σ -Dichte in der σ_a -gewichteten $(2F_{obs}-F_{calc})$ -Elektronendichte nach einem Verfeinerungsschritt [65].

Die Koordinaten des D3H44-Antikörpers aus der TF-219·D3H44-Struktur dienten als Modell zur Lösung der freien D3H44-Struktur. Nach einigen Verfeinerungsschritten wurden die Koordinaten des freien D3H44 zur Lösung der Struktur des D3-Antikörpers eingesetzt. Die Strukturverfeinerung des freien D3H44-Antikörpers erfolgte analog zum TF-219·D3H44-Komplex mit denselben Kriterien. Im Unterschied dazu reichte bei der D3 Struktur ein Minimum von 3 σ -Differenzdichte in der $(F_{obs}-F_{calc})$ -Dichte und 1 σ in der σ_a -gewichteten $(2F_{obs}-F_{calc})$ -Elektronendichte zur Identifikation von Wassermolekülen aus.

Für die Modelldarstellung und -veränderung wurde das Programm O [71] einge-

³ F_{obs} – beobachteter Strukturfaktor, F_{calc} – berechneter Strukturfaktor vom Modell

setzt. Die Validierung des Modells erfolgte durch die Programme PROCHECK [72] und WHATCHECK [73]. Zur Überlagerung von Strukturen wurde das Programm LS-QKAB verwendet, das im CCP4-Programm-Paket enthalten ist [60].

Die Numerierung der Reste in den Antikörper-Strukturen richtete sich nach dem Schema von Kabat [74]. Für die Überlagerung einzelner Domänen wurden die Reste L1-L106 der leichten (V_L) und H1-111 der schweren Kette (V_H) in der variablen Domäne und die Reste ab L111 und ab H117 in der leichten und schweren Kette der konstanten Domäne (C_L und C_{H1}) verwendet.

Zur Bestimmung der Ellenbogen-Winkel in den Antikörper-Strukturen berechnete das Programm SUPERIMPOSE [75] die Überlagerung der V_L - mit der V_H -Domäne und die Überlagerung der C_L - mit der C_{H1} -Domäne. Anschließend konnten aus den Matrizen die Rotationsachsen berechnet werden (CALC-AX, überlassen von Joachim Meyer, EMBL Heidelberg). Die Anwendung der Skalarprodukt-Gleichung lieferte schließlich den Winkel zwischen den Rotationsachsen. Dieser Winkel wird im allgemeinen als Ellenbogen-Winkel bezeichnet.

Oberflächen im Sinne von Lösungsmittel-zugänglichen Oberflächen (SAS, *Solvent Accessible Surface*) wurden mit dem Programm NACCESS von H.J. Hubbard and J.M. Thornton [76] mit einem Lösungsmittelmolekül-Radius von 1,4 Å bestimmt. Durch die Trennung der Beiträge von polaren und unpolaren Atomen erfolgte die Berechnung des polaren bzw. hydrophoben Charakters von Flächen. Für die Proteinatome wurden die Standardwerte der van-der-Waals-Radien verwendet [77].

7.3 Datenbankeinträge

Die Koordinaten und Strukturdaten der Fab-Fragmente D3 und D3H44 und des Komplexes TF·D3H44 sind unter den PDB-Kodes 1K6Q, 1JPT und 1JPS bei der Protein-Datenbank [78] hinterlegt worden. Das Ablegen der Strukturen erfolgte mit Hilfe des Programmes ADIT.

Die Datenbankeinträge der in dieser Arbeit zusätzlich verwendeten Strukturen sind:

PDB-Kode	Struktur	Auflösung
2HFT	TF-219	1,7 Å
1AHW	TF·5G9	3,0 Å
1FGN	Fab 5G9	2,5 Å
1WEJ	Cytochrom c · Fab E8	1,8 Å
1HRC	cytochrom c	1,9 Å
1QBL	Fab E8	2,26 Å
1DQJ	Hen Egg Lysozym·HyHEL-63	2,0 Å
1LZT	Hen Egg Lysozym	1,97 Å
1DQQ	Fab HyHEL-63	1,8 Å
1KIQ	Hen Egg Lysozym·D1.3 Y101F	1,85 Å
1BJ1	anti-VEGF·VEGF	2,4 Å
1FGV	Fv anti-CD18, huH52AA	1,9 Å
2FGW	Fab anti-CD18, huH52OZ	3,0 Å
1FVC	Fv anti-p185Her2, hu4D5, Version 8	2,2 Å
1FVD	Fab anti-p185Her2, hu4D5, Version 4	2,5 Å
1FVE	Fab anti-p185Her2, hu4D5, Version 7	2,7 Å