

Teil IV

Antikörperbindung von TF-219

Kapitel 11

Kristallstrukturen

11.1 Das murine Fab-Fragment D3

Die Kristallstruktur des Fab-Fragments D3 mit 2,4 Å Auflösung enthält die Aminosäuren L1–L197 und L204–L210 der leichten Kette und H1–H129 und H133–H212 der schweren Kette. Die Struktur zeigte am Ende der Verfeinerung Werte von $R_{cryst} = 22,5\%$ und $R_{free} = 29,8\%$, die Statistik der Verfeinerung ist in Tabelle 11.1 zusammengefaßt. Die Faktoren der atomaren Auslenkung (B-Faktoren) der V_L -, C_L -, V_H -, C_{H1} -Domänen sind 42,3 Å², 66,7 Å², 41,3 Å² und 61,1 Å², wohingegen der Mittelwert für die atomare Auslenkung für die gesamten Struktur einschließlich Wassermolekülen 51,4 Å² beträgt. Der mittlere Koordinatenfehler der Struktur beträgt 0,36 Å (σ_A -Statistik [65], [66]).

Das Ramachandran-Diagramm [90] zeigt 82 % der Reste innerhalb der am häufigsten vorgefundenen Regionen, 15,8 % in den zusätzlich erlaubten Gebieten, 1,4 % in den generell erlaubten Regionen und die Reste Ala–L51, Ser–H75 und Ala–H97 (0,8 %) in nicht erlaubten Regionen. Unübliche Torsionswinkel für Rest L51, hier $\Phi = 59^\circ / \Psi = -42^\circ$, sind schon in früher gelösten Kristallstrukturen von Fab-Fragmenten wie anti-Lysozym HyHEL-5 [91] und anti-VEGF [92] beschrieben worden. Aminosäure Ser–H75 liegt an Position (i+3) innerhalb eines β -turns, der nach Hutchinson und Thornton [93] als Typ VIII klassifiziert wurde. Die Winkel $\Phi = 114^\circ / \Psi = -8^\circ$ von Ala–H97 sind durch die Lage an (i+1)ter Stelle eines Typ IV β -turns zu erklären. Die Aminosäuren Ala–L51, Ser–H75 und Ala–H97 haben eine atomare Auslenkung (B-Faktor) von 29,4 Å², 47,3 Å² und 48,3 Å². Die Elektronendichte von Ala–L51 und Ser–H75 ist deutlich zu erkennen, wohingegen die Dichte für das C_β -Atom von Ala–H97 nicht definiert ist.

Die Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche von V_L und V_H , die in der Kontakt-

region beider Domänen verborgen wird, beträgt 810 \AA^2 (Mittelwert aus den Beiträgen von V_L und V_H) und ist mit der der C_L - C_{H1} -Kontaktfläche von 950 \AA^2 in der konstanten Domäne vergleichbar. Die Wechselwirkung von leichter und schwerer Kette ist von unpolaren Kontakten dominiert, mehr als 70 % der Interaktionen besitzen hydrophoben Charakter.

Der berechnete Ellenbogen-Winkel von D3 beträgt 139° . Das liegt am unteren Ende des üblicherweise für Fab-Fragmente beobachteten Bereichs von 127° bis 225° [37].

11.2 Das humanisierte Fab-Fragment D3H44

Die Verfeinerung der Kristallstruktur des humanisierten Antikörpers D3H44 wurde mit den R-Faktoren $R_{cryst} = 18,3 \%$ und $R_{free} = 22,8 \%$ abgeschlossen (Tabelle 11.1). Von den 214 Aminosäuren der leichten Kette (L) war die Elektronendichte der Reste L1 bis L213 deutlich zu erkennen, von den 225 Aminosäuren der schweren Kette (H) konnten die Reste H1 bis H127 und H133 bis H213 in die vorhandene Elektronendichte eingebaut werden. Die mittlere atomare Auslenkung der gesamten Struktur beträgt $20,4 \text{ \AA}^2$. Die einzelnen Domänen V_L , C_L , V_H und C_{H1} weisen Werte von $17,5 \text{ \AA}^2$, $19,7 \text{ \AA}^2$, $21,3 \text{ \AA}^2$ und $18,4 \text{ \AA}^2$ für die Proteinatome auf. Der aus der σ_A -Statistik errechnete mittlere Koordinatenfehler liegt bei $0,16 \text{ \AA}$.

Im Ramachandran-Diagramm [90] sind 90,4 % der 425 Reste in der am häufigsten vorgefundenen Region plaziert, 9,1 % in der zusätzlich erlaubten Region und nur die Reste Ala-L51 und Ala-H97 sind in nicht erlaubten Regionen lokalisiert. Für Aminosäure L51 ($\Phi=107^\circ$ und $\Psi=-44^\circ$) ist auch in anderen Kristallstrukturen von Antikörpern von unüblichen Torsionswinkeln berichtet worden, z.B. [94], [41]. Der Rest Ala-H97 ist an Position (i+1) eines nach Hutchinson und Thornton [93] klassifizierten γ -turns des Types IV lokalisiert. Die Elektronendichte von Ala-H97 ist deutlich zu erkennen und auch der niedrige Faktor der atomaren Auslenkung von $14,3 \text{ \AA}^2$ bestätigt diese Konformation.

Die Bindungsfläche (errechnet aus verborgener SAS-Fläche) zwischen V_L und V_H hat eine Größe von 765 \AA^2 , die vergleichbar ist mit der zwischen den C_L - und C_{H1} -Domänen (845 \AA^2). Die Kontakte zwischen leichter und schwere Kette sind auch in D3H44 von hydrophoben Wechselwirkungen dominiert. Ungefähr 70 % der Wechselwirkungen sind apolarer Natur.

Der Ellenbogen-Winkel der D3H44 Struktur beträgt 135° .

Tabelle 11.1: Statistik der Verfeinerung

	Fab D3	Fab D3H44	TF·D3H44
Auflösungsbereich [\AA]	40 – 2,40	40 – 1,85	40 – 1,85
R_{cryst} [%] / Anzahl Reflexe	22,5 / 15606	18,3 / 33469	20,1 / 67779
R_{free} [%] / Anzahl Reflexe	29,8 / 1214	22,8 / 2550	22,5 / 5275
Anzahl Reste	417	425	626
Anzahl Proteinatome	3200	3244	4862
Anzahl Wassermoleküle	175	372	579
Mittlerer B–Faktor [\AA^2] für			
alle Atome	51,4	20,4	29,2
Proteinatome	51,8	19,1	28,5
Wassermoleküle	43,7	30,9	35,7
anisotroper B–Faktor [\AA^2]			
B11	6,54	-2,90	-4,35
B22	-1,46	1,54	3,94
B33	-5,51	1,37	0,41
B13	-8,02	2,91	0,00
Lösungsmitteldichte [e^3]	0,354	0,369	0,361
Mittl. B–Faktor Lösungsmittel [\AA^2]	65,5	45,8	48,5
Abweichung (RMS)			
Bindungslänge [\AA]	0,011	0,013	0,011
Bindungswinkel [$^\circ$]	1,68	1,79	1,64
Abweichung (RMS) in B–Faktoren für gebundene Atome [\AA^2]			
in der Hauptkette	1,53	1,36	1,47
in der Seitenkette	2,16	2,32	2,16

11.3 Der Komplex TF–219·D3H44

Die im Folgenden verwendete Abkürzung TF steht für TF–219. Die Kristallstruktur des Komplexes zwischen TF und dem humanisierten Fab–Fragment D3H44 wurde mit einer Auflösung von 1,85 Å gelöst und konnte bis zu einem kristallographischen R–Faktor $R_{cryst} = 20,1\%$ bei einem freien R–Faktor von $R_{free} = 22,4\%$ verfeinert werden. Für TF wurden die Reste T5 bis T83 und T91 bis T211, für die leichte Kette von D3H44 die Reste L1 bis L213 und für die schwere Kette H1 bis H128 und H133 bis H213 in die Elektronendichte eingepaßt. Im Gegensatz zu den bisher publizierten Strukturen des freien TF [12], [95] ist die Elektronendichte der Schleife T159 bis T162 hier deutlich zu erkennen. Der mittlere atomare Auslenkungsfaktor der gesamten Struktur beträgt $29,2 \text{ \AA}^2$. Die einzelnen Domänen haben in der Reihenfolge N–terminale Domäne TF, C–terminale Domäne TF, variable Domäne D3H44 und konstante Domäne TF mittlere Auslenkungsfaktoren von $39,9 \text{ \AA}^2$, $37,9 \text{ \AA}^2$, $20,7 \text{ \AA}^2$ und $26,2 \text{ \AA}^2$. Aus der σ_A –Statistik kann ein mittlerer Koordinatenfehler von $0,17 \text{ \AA}$ errechnet werden. Das Ramachandran–Diagramm (Abb. 11.1) zeigt, daß 90,1 % aller Reste in bevorzugten Regionen liegen und nur Ala–L51, wie auch in der freien D3H44–Struktur, eine ungewöhnliche Dihedralwinkel–Konformation annimmt. Im Vergleich zur freien Struktur ist Ala–H97 nicht mehr in der verbotenen Region des Ramachandran–Diagramms zu finden. Der Carbonyl–Sauerstoff von Ala–H97 ist an der Bindung von TF beteiligt, was eine Änderung des Ψ –Winkels von 30° bewirkt.

In der TF·D3H44 Struktur beträgt der Ellenbogen–Winkel von D3H44 132° .

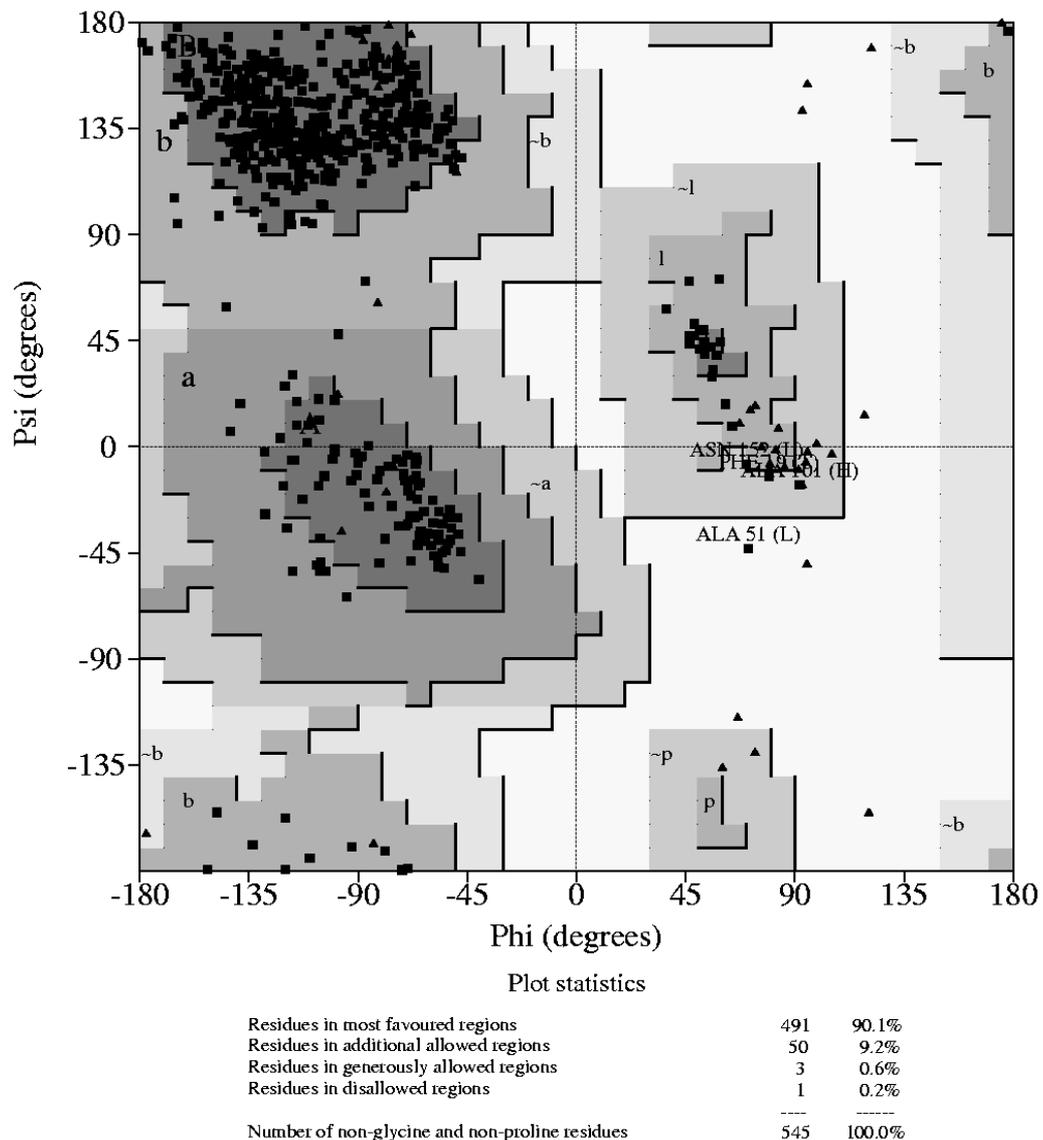


Abbildung 11.1: Ramachandran–Diagramm [90] von TF·D3H44. Dunkelgraue Bereiche kennzeichnen den am häufigsten vorgefundenen Bereich, mittelgraue den zusätzlich erlaubten Bereich und hellgraue die Region, die prinzipiell auch noch erlaubt ist. Die weißen Areale stehen für Winkelkombinationen, die selten in Proteinen vorkommen. Für Glycin–Reste sind Dreiecke eingetragen und für die übrigen Reste (ausschließlich Prolin) Vierecke

Kapitel 12

Diskussion

12.1 Muriner D3 *versus* humanisierter D3H44

12.1.1 Vergleich der Strukturen

Das murine D3- und das humanisierte D3H44-Fab-Fragment haben mit Ausnahme einzelner Reste dieselbe Aminosäurezusammensetzung in den Bindungsschleifen, siehe Abbildung 12.1. Das Antikörper-Gerüst hingegen unterscheidet sich in beiden Antikörpern. Die leichte Kette des murinen Antikörpers gehört zur murinen κ -Untergruppe V und die schwere Kette zur murinen Untergruppe IIc. Vom humanen Antikörper-Gerüst kann die leichte Kette dem Isotyp der humanen κ -Untergruppe I, die schwere Kette der humanen Untergruppe III zugeordnet werden. Der Vergleich der Strukturen des murinen D3- und des humanisierten D3H44-Fab-Fragments zeigt die Positionen, an denen Sequenzunterschiede strukturelle Abweichungen hervorrufen.

Die Unterschiede in der Sequenz sind in Abbildung 12.1 dargestellt. Die Überlagerung der C_α -Atome der variablen Domäne, der konstanten Domäne und des ganzen Fab-Fragments resultiert in Abweichungen von 1,08 Å, 1,01 Å und 1,27 Å (RMS). Die mittleren Koordinatenfehler sind 0,36 Å für die D3- und 0,16 Å für die D3H44-Struktur. Gleichzeitig können durch die Überlagerung die Regionen identifiziert werden, in denen sich der murine vom humanisierten Antikörper unterscheidet.

Abbildung 12.2 zeigt den Abstand der C_α -Atome von der Position in D3 zu der in D3H44 nach Überlagerung der C_α -Atome der variablen Domäne. Es ist deutlich zu erkennen, daß die meisten C_α -Atome nur geringfügige Abweichungen in den beiden Strukturen zeigen. Lediglich einzelne Segmente weisen größere Unterschiede von über 1 Å auf. Die meisten dieser Abweichungen gehen auf Sequenzunterschiede zwischen den beiden Antikörpern zurück.

Für die Reste L56 und H54 sind es Kristallpackungskontakte zu symmetrieverwandten Molekülen, die einen strukturellen Unterschied hervorrufen. Im murinen D3 bilden Sauerstoff- und Stickstoffatome der Hauptkette an den Positionen L57 und L58 Wasserstoffbrücken zur Haupt- und Seitenkette der Positionen L155 und L156 eines symmetrieverwandten Moleküls. Im Unterschied dazu kommt dieser Kontakt in D3H44 durch die unterschiedliche Kristallpackung nicht zustande. Im Fall des Asn-H56 wird in der D3H44-Struktur ein Kontakt zwischen der Amid-Gruppe von Asparagin und der von Glutamin L147 eines symmetrieverwandten Moleküls ausgebildet. Dieser Kontakt ist in D3 nicht vorhanden. Größere Abweichungen an Beginn und Ende der Domänen lassen sich durch die Flexibilität von "losen" Peptidketten an der Oberfläche globulärer Proteine erklären.

In der leichten Kette sind es die unterschiedlichen Aminosäuren der Reste L24 in CDR-L1, L96 in CDR-L3 und L80 im V_L - V_C -Wechselwirkungsbereich, die die bedeutendsten Unterschiede im Verlauf der C_α -Kette verursachen.

Die Abweichungen in den C_α -Positionen von 1,5 Å für Leu-L15 und 1,3 Å für L80 sind mit der unterschiedlichen Besetzung von Ser-L80 in D3 und Pro-L80 in D3H44 zu erklären. In D3 wechselwirkt Leu-L15 mit dem hydrophoben Teil von Arg-L108. Zusätzlich bildet Ser-L80 eine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoff der Hauptkette von L168. In D3H44 bewirkt das Ersetzen der polaren Seitenkette Ser-L80 durch das hydrophobe Prolin, daß Pro-L80 mit Leu-L15 in Wechselwirkung tritt und die für D3 beschriebenen Kontakte nicht ausgebildet werden können. Das bedeutet, daß es einen Einfluß auf die Struktur hat, ob an Position L80 eine polare oder eine hydrophobe Aminosäure eingebaut ist.

Das Ersetzen von Lys-L24 in D3 durch Arginin in D3H44 resultiert in direkten Wasserstoffbrücken zwischen den Carboxylat-Sauerstoffen der Seitenketten von Asp-L70 und den Atomen N_{η_2} und N_ϵ von Arg-L24 in D3H44, wohingegen in D3 der Kontakt zwischen N_ζ aus Lys-L24 und der Carboxylat-Gruppe durch ein Wassermolekül vermittelt wird. Dies beruht auf der Annahme, daß trotz des Abstandes von 3,48 Å eine Wasserstoffbrücke zwischen Lysin und dem Wassermolekül vorhanden ist. Die unterschiedliche Aminosäure an Position L24 scheint die Abweichung der C_α -Atome an den benachbarten Positionen L27 und L68 zu verursachen.

Ähnlich verhält es sich für die Position L94, die durch Phe-L96 in D3 und Trp-L96 in D3H44 beeinflusst wird. Die Seitenkette von L96 ist in beiden Antikörpern an einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Resten His-L91, Pro-L95 und Phe-L98 der leichten und Tyr-H33, His-H35, Leu-H47, Gly-H49, Trp-H50 und Ile-H58 der schweren Kette beteiligt (in D3). Durch den Tausch der Reste H47 und H50 zu

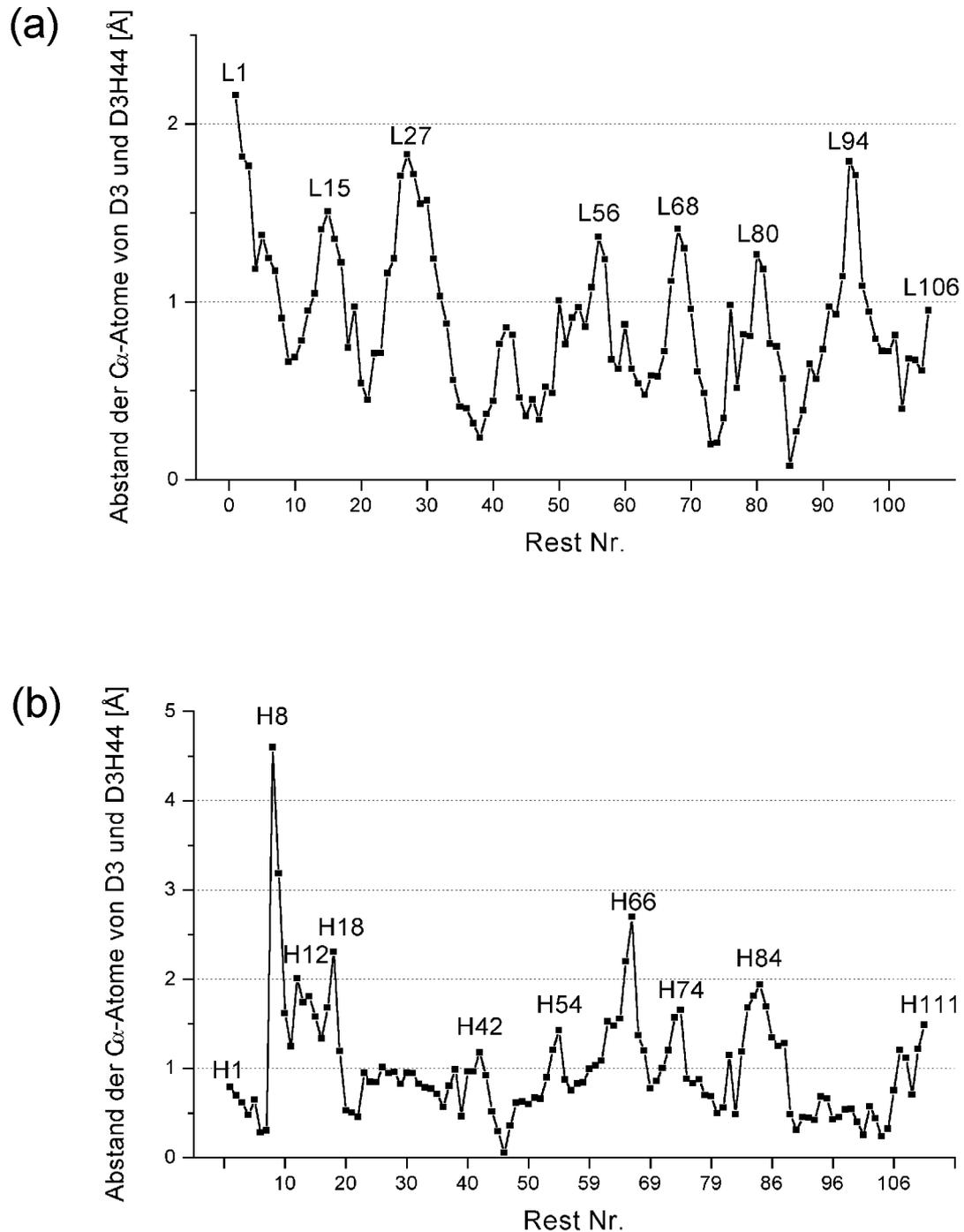


Abbildung 12.2: Strukturvergleich der variablen Domäne von D3 und D3H44. Ausgehend von einer Überlagerung der C_{α} -Atome in der variablen Domäne sind hier die Abstände der jeweiligen C_{α} -Atome in (a) der leichten Kette und (b) der schweren Kette aufgetragen. Diejenigen Reste, deren C_{α} -Atome voneinander um mehr als 1 Å beim Vergleich der Strukturen D3 und D3H44 abweichen, sind benannt und werden im Text beschrieben

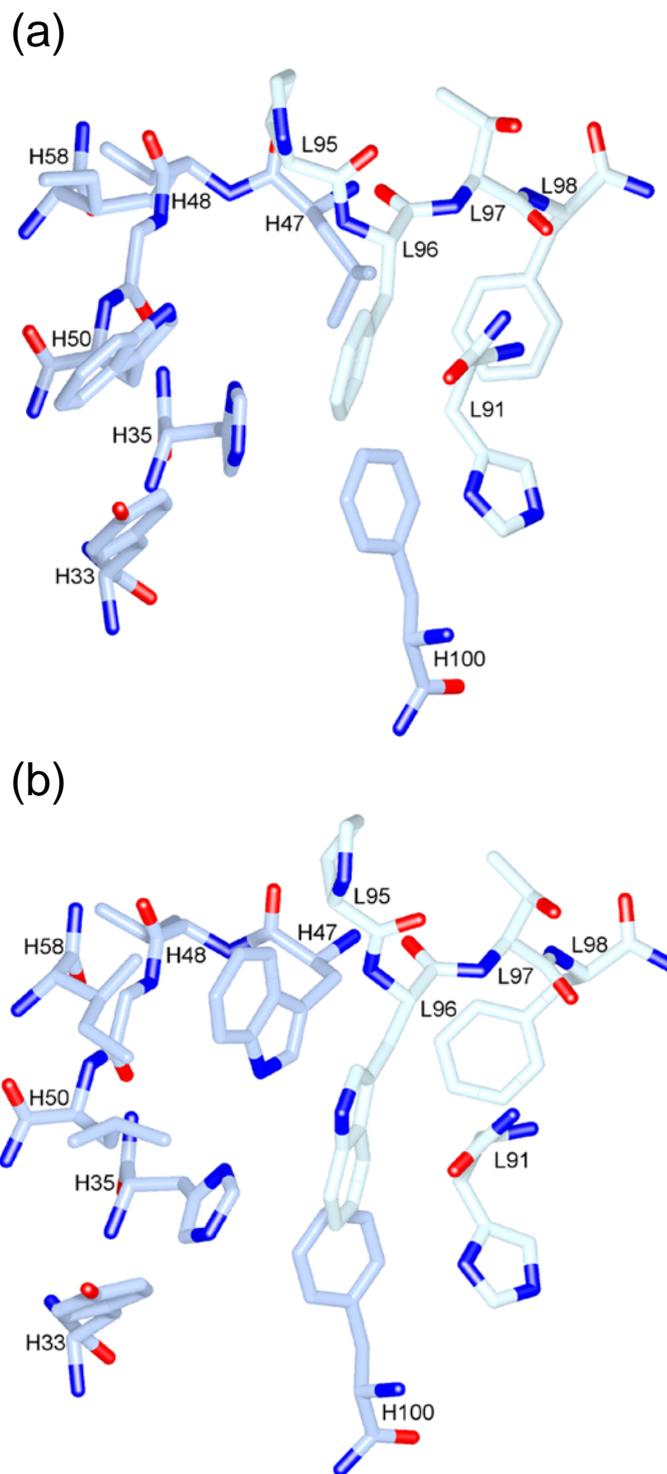


Abbildung 12.3: Unterschiede in der Struktur von (a) D3 und (b) D3H44, die durch den Austausch der Aminosäuren Leu–H47/Trp–H50/Phe–L96 (D3) zu Trp–H47/Leu–H50/Trp–L96 (D3H44) hervorgerufen wurden. In beiden Strukturen sind nur die Segmente L95 bis L98, H47 bis H50 und die Aminosäuren L91, H33, H35, H58 und H100 dargestellt, die an diesem hydrophoben Bereich zwischen leichter Kette (hellblau) und schwerer Kette (dunkelblau) beteiligt sind

Trp–H47 und Leu–H50 in D3H44, der in Abbildung 12.3 dargestellt ist, können die gegenüberliegenden Indol–Gruppen von Trp–L96 und Trp–H47 in D3H44 hydrophobe Kontakte ausbilden. Interessanterweise zeigen die C_α –Positionen der Reste H47 und H50 trotz Austausch der Aminosäuren keinen signifikanten Unterschied in den Strukturen D3 und D3H44, obwohl dadurch die Wechselwirkung der Seitenketten im hydrophoben Bereich verändert wurde.

In der schweren Kette führen unterschiedliche Aminosäuren an den Positionen H9, H10, H18, H38, H40 und H73 zu strukturellen Unterschieden der Fab–Fragmente D3 und D3H44.

Der Austausch einer großen Seitenkette (D3: Gln–H10, Arg–H40) gegen eine kleine (D3H44: Gly–H10, Ala–H40) hat an zwei Positionen in der schweren Kette Auswirkungen auf den Verlauf der Hauptkette. In der murinen D3–Struktur ist H10 mit der Aminosäure Glutamin besetzt, die sich in Richtung Hauptkette von H19 orientiert. Die benachbarte Seitenkette Ala–H9 ist an einer hydrophoben Wechselwirkung mit den Resten Pro–H147, Pro–H149, Pro–H200 und Ala–H201 aus der konstanten Domäne beteiligt. Das Fehlen der langen Seitenkette an Position H10 (Glycin in D3H44) und die Änderung von Alanin zu Glycin an Position H9 führten zur größten Abweichung des Verlaufs der C_α –Kette, die in der variablen Domäne beobachtet wird. Der Abstand der C_α –Atome von H8 und H20 beträgt in der D3–Struktur 8,5 Å und in der D3H44–Struktur 4,5 Å. Der Vergleich der Ellenbogen–Winkel von D3 (139°) und D3H44 (135°) zeigt, daß durch die Umlagerung von H9 und das Wegfallen des unpolaren C_β –Atoms keine Veränderung in der relativen Orientierung der Domänen V_L und C_L induziert wird.

Die zweite Position, an der das Volumen einer Seitenkette den Verlauf der Struktur beeinflusst, ist der Rest Arg–H40 in D3, der in D3H44 durch Alanin ersetzt ist. Dieser Unterschied verursacht eine Abweichung von 1,2 Å an Position H42. Die Seitenkette Glu–H89 steht in sterischer Konkurrenz zu Arg–H40 und die Seitenkette von Arginin weicht samt Hauptkette nach außen. In D3H44 ist die Position H40 mit Alanin besetzt, einer deutlich kleineren Seitenkette als Arginin. Damit ist die sterische Behinderung der Seitenkette von H40 durch Glu–H89 aufgehoben und der Verlauf der Hauptkette von Ala–H40 paßt sich dieser Anordnung an.

Die Verschiebung der C_α –Atome der Reste H12 und H18 von 2,0 und 2,3 Å geht auf die Veränderung der Seitenkette an Position H18 zurück. Dieser Rest ist in der murinen D3–Struktur durch Valin besetzt, dessen Seitenkette direkt gegenüber der von Val–H12 lokalisiert ist. Val–H12 und Val–H18 sind beide Teil der hydrophoben Tasche, zu der auch die Reste Leu–H20, Tyr–H90, Leu–H82, Leu–H82c, Leu–H109 und Val–H111

beitragen. Ganz anders sieht dieser Bereich in der D3H44–Struktur aus, in der H18 mit Leucin besetzt ist. Die Seitenkette von Leu–H18 nimmt die Position von Leu–H82 ein und interagiert mit dem Phenylring von Tyr–H90. H82 ist in der D3H44–Struktur durch Methionin besetzt, das sich zu Phe–H63 umorientiert und den Platz für Leu–H18 freigibt.

Die Verschiebungen in der Hauptkette im Bereich der Reste H66 und H86 sind miteinander verknüpft. Verursacht wird dieser Unterschied wahrscheinlich vom Austausch von Lysin (D3) gegen Arginin (D3H44) an Position H38. Während Lysin über ein Wassermolekül mit der Carboxylat–Gruppe der Seitenkette von Asp–H86 in Wechselwirkung tritt, kommt durch die längere Seitenkette des Arginin dieser Kontakt direkt zwischen Arg–H38 und Asp–H86 zustande. Zwischen dem Atom $O_{\delta 2}$ von Asp–H86 und $N_{\eta 2}$ von Arg–H66 wiederum gibt es in dem humanisierten Antikörper eine Wasserstoffbrücke, die im murinen D3 nicht existiert. In D3 ist die Seitenkette von Arg–H66 an einer Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff der Hauptkette von H85 beteiligt.

Die Hauptkette von D3 und D3H44 zeigt auch im Bereich von H74 einen leicht unterschiedlichen Verlauf. Position H73 trägt in D3 die Aminosäure Threonin, deren Atom $O_{\gamma 1}$ über ein Wassermolekül mit den Atomen $O_{\delta 1}$ von Asn–H28 und $N_{\delta 2}$ von Asn–H76 verknüpft ist. Die humanisierte Variante bildet eine Wasserstoffbrücke zwischen $N_{\delta 2}$ des Substituenten Asp–H73 und dem Sauerstoff von H52, so daß die Kontakte wie in der D3–Struktur nicht realisiert werden.

Ein weiterer Unterschied kann im Verlauf der schweren Kette in der konstanten Domäne beobachtet werden.

Im murinen D3 bilden die Reste Gln–H171, Ser–H172, Asp–H173 und Leu–H174 einen β –turn zwischen zwei β –Strängen. Tyr–H175, der erste Rest im folgenden β –Strang, ist gegenüber einer Ausbuchtung (*bulge*) der Reste Gly–H144 und Tyr–H145 lokalisiert.

In D3H44 hingegen bilden zwar auch die Reste Gln–H171, Ser–H172, Ser–H173 und Gly–H174 einen β –turn, aber gleichzeitig sitzt Gln–H171 gegenüber von einer Ausbuchtung gebildet von den Resten Gly–H174 und Leu–H175. Hier fängt der folgende β –Strang erst mit dem Rest Tyr–H176 an, der auch — wie in D3 — gegenüber der Ausbuchtung der Reste Asp–H144 und Tyr–H145 sitzt und damit dem Rest H175 aus D3 entspricht. Die Schleife zwischen den beiden β –Strängen setzt sich somit in D3 aus 4 Resten und in D3H44 aus 5 Resten zusammen.

Bis auf die Seitenkette von Asp–H173 in der murinen D3–Struktur ist die Elektrodichte von allen Aminosäuren gut definiert. Die Reste Gln–H171 und Ser–H172 befinden sich in beiden überlagerten Strukturen an äquivalenten Positionen, aber Rest

Leu–H174 in D3 hat die Position von Leu–H175 in D3H44, so daß die Numerierung der sich entsprechenden Reste in D3H44 beginnend mit Rest H174 gegenüber der von D3 um (i+1) verschoben ist.

Die molekulare Oberfläche von D3 und D3H44 ist in der Bindungsstelle von negativ geladenen Resten dominiert (ohne Abbildung). Werden die Ladungen auf den Oberflächen der Bindungsstellen der Antikörper–Fragmente und denen im Epitop von TF gegenübergestellt, so ist die Ladungskomplementarität deutlich zu erkennen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei der Gegenüberstellung der murinen und der humanisierten Struktur keine massiven Unterschiede beobachtet werden können. Durch die unterschiedlichen Antikörper–Gerüste sind in den Strukturen lokal einzelne Abweichungen vorhanden, die durch die Unterschiede in der Sequenz erklärt werden. Die Konformation der Bindungsschleifen und die Orientierung der Domänen im humanisierten D3H44–Antikörper sind weitgehend identisch mit denen im murinen Vorgänger D3.

Die beschriebenen strukturellen Abweichungen sind folglich solche, die die Bindung von TF nicht beeinflussen. So verwundert es nicht, daß mit Ausnahme der Reste, die in Kristallkontakte involviert sind, zwei Drittel der oben beschriebenen Sequenz– und Strukturunterschiede am unteren Ende der variablen Domäne lokalisiert sind, das an die konstante Domäne angrenzt. In diesem Bereich scheint eine Variabilität im oben beschriebenen Rahmen keinen Einfluß auf die V_L – V_H –Orientierung oder die Ausbildung der Komplementärfläche zu haben. Bis auf H66 werden innerhalb des Kerns zwischen V_L – und V_H –Domäne keine größeren Abweichungen als 1 Å beobachtet. Auch die Lage der C_α –Atome in den Bindungsschleifen weist große Übereinstimmung auf. Eine strukturelle Veränderung in diesem Bereich würde sich wahrscheinlich direkt auf die Platzierung der Bindungsschleifen auswirken und die Komplementarität zu TF verschlechtern.

12.1.2 Wassermoleküle in den Strukturen D3 und D3H44

Die Struktur des TF·D3H44–Komplexes zeigt, daß Wassermoleküle in der Bindungsstelle die Rolle übernehmen, nicht komplementäre Areale aufzufüllen und dadurch den Kontakt zwischen TF und D3H44 zu vermitteln, siehe Abschnitt 12.2.5.

Die Überlagerung aller Atome der Strukturen D3 und D3H44 zeigt, daß 49 Wassermoleküle identisch sind (mit einer erlaubten Abweichung von 1.5 Å). Zwei dieser Wassermoleküle sind in der Bindungsstelle lokalisiert. Das erste bildet Wasserstoffbrücken mit dem Stickstoff des Rückgrats von Rest H33 und dem Sauerstoff der Hauptkette

von H95 und überbrückt so den Kontakt zwischen CDR-H1 und CDR-H3. Das zweite Wassermolekül formt eine Wasserstoffbrücke mit $O_{\delta 2}$ -Asp-H95 und vermittelt den Anschein einer verlängerten Seitenkette.

Beide Wassermoleküle sind ebenfalls in der TF·D3H44-Struktur vorhanden und vermitteln den Kontakt zwischen TF und D3H44. Hier überbrückt das erste Wasser die Wechselwirkung zwischen dem Sauerstoff der Hauptkette von H95 und dem $N_{\eta 1}$ -Atom von Arg-T200. Dieses Wassermolekül ist auch in der freien TF-Struktur [12] vorhanden. Im Komplex TF·D3H44 überbrückt das zweite Wassermolekül den Kontakt zwischen den Seitenketten von Asp-H95 und Lys-T169 und vermittelt so ebenfalls die Wechselwirkung von TF zu D3H44. Dieses Wassermolekül ist ein potentieller Kandidat, um durch die Mutation Asn-H95-Gln verdrängt zu werden und damit die Bindungsaffinität von D3 bzw. D3H44 zu erhöhen, siehe dazu auch Kapitel 12.2.8.

Auch wenn die Interpretation der Wassermoleküle durch die Auflösung von 2,4 Å der D3-Struktur limitiert ist, so suggerieren doch die beiden konservierten Wassermoleküle in der Bindungsstelle, daß auch für die Bindung von D3 an TF Wassermoleküle eine bedeutende Rolle in der Antigen-Antikörper-Bindung spielen, ähnlich wie es die Struktur des TF·D3H44-Komplexes zeigt, siehe Kapitel 12.2.5.

12.1.3 Der Humanisierungsprozeß

Murine monoklonale Antikörper als therapeutisches Pharmazeutikum haben den Nachteil, daß sie vom humanen Immunsystem erkannt werden können. Um diese Reaktion zu verhindern, sind diverse chimäre und humanisierte Antikörper-Konstrukte entwickelt worden, die klinisch erprobt werden können.

Chimäre Antikörper setzen sich aus der konstanten Domäne eines humanen Antikörpers und der variablen Domäne des murinen Antikörpers zusammen. Damit ist der murine Anteil des Antikörpers reduziert und die Bindungsschleifen in der variablen Domäne erkennen noch immer das Antigen [96], [97].

Der Prozeß des *Resurfacing* beruht auf der Annahme, daß die Aminosäuren auf der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche der variablen Region zu 98 % innerhalb einer Spezies konserviert sind. Durch Ersetzen der Maus-spezifischen Aminosäuren auf der Oberfläche mit den entsprechenden humanen Oberflächenresten konnten die anti-CD56- und anti-CD19-Fv-Fragmente humanisiert werden [98].

Unter der Methode der Humanisierung ist die Verpflanzung der murinen Bindungsschleifen auf ein humanes Antikörper-Gerüst zu verstehen [99], [100]. Meistens wird durch dieses Konstrukt die Antigen-Bindung zerstört oder derart verschlechtert, daß eine Rekonstruktion (*reshaping*) notwendig ist. Darunter ist die Anpassung an die ur-

sprüngliche murine Struktur zu verstehen, die eine komplementäre Bindungsstelle zum Epitop ausbilden kann. Bei dieser Methode werden im Kern der variablen Domäne an einzelnen Positionen die Aminosäuren des murinen Antikörpers übernommen [101], [102], [31], [30], [29], [28]. Häufig sind diese Reste in räumlicher Nachbarschaft zu den Bindungsschleifen und können somit deren Konformation beeinflussen.

Für die Humanisierung eines Antikörpers gibt es kein allgemeingültiges Schema für die Auswahl von Resten, deren murine Aminosäuren übernommen werden müssen, um eine Bindung an das Antigen wiederherzustellen. Jeder Humanisierungsprozeß ist eine individuelle Zusammenstellung von Resten, die verändert werden müssen. Die Auswahl dieser läßt sich zwar mit Modellen weitgehend eingrenzen, das eigentliche Resultat aber liefert erst die Bindungsstudie.

Für zwei Drittel aller Antikörper zeigt sich, daß die Größe der Seitenkette an Position H71 Auswirkungen auf die Konformation von CDR-H1 und -H2 und damit auf die Antigen-Bindung hat [32], [33], Beispiele hierfür sind: [34], [35],[103].

Für die Humanisierung von D3 wurden in der leichten Kette die Reste Leu-L46-Val und Phe-L71-Tyr im Antikörper-Gerüst mutiert. Dabei wurde der zu den CDR-Regionen gehörende murine Rest Lys-L24 bei der Umsetzung der murinen CDR-Schleifen auf das humane Gerüst nicht berücksichtigt und daher stammt Arg-L24 vom humanen Antikörper. In der schweren Kette führten die Mutationen Leu-H47-Trp, Ala-H49-Gly, Phe-H67-Ala, Arg-H71-Ala und Leu-H78-Ala im Gerüst zum humanisierten Antikörper D3H44. Zusätzlich wurden in den transplantierten murinen Bindungsschleifen der leichten Kette die Reste Ser-L34-Asn, Asp-L56-Glu und Phe-L96-Trp und in der schweren Kette die Reste Asp-H31-Glu, Trp-H50-Leu und Asn-H54-Gln ausgetauscht.

Im Folgenden wird der Humanisierungsprozeß, welcher den murinen D3 in den humanisierten D3H44 überführte, strukturebiologisch nachvollzogen und in Korrelation zur Bindungsstudie gesetzt [27]. In dieser Studie ist ein chimärer Antikörper D3CH als Referenz bezüglich TF-Bindung verwendet worden, der die konstante Domäne von D3H44 und die variable Domäne von D3 trägt. Der murine und der chimäre Antikörper weisen etwa gleiche Bindungskonstanten von 11,5 nM und 9,9 nM auf.

Das Einsetzen der murinen Bindungsschleifen von D3 in das Fab-Fragment des humanen Antikörper-Gerüsts führte zum Verlust der TF-Bindung. Wie oben beschrieben hat auch hier die Auswahl der Aminosäure an Position H71 erhebliche Auswirkungen auf die Antigen-Bindung von D3H44. Das Entfernen von Arginin und das Ersetzen durch die deutlich kleinere Seitenkette von Alanin — wie im murinen D3 — bringt die TF-Bindung zurück, wenn auch mit 26-fach niedrigerer Affinität im Vergleich zu

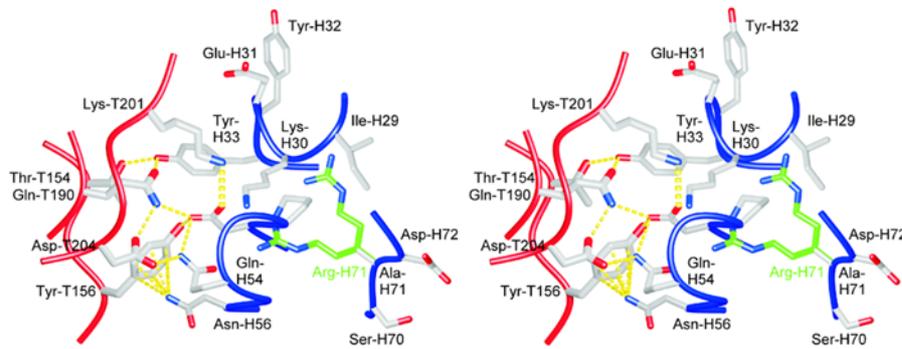


Abbildung 12.4: Ausschnitt aus der TF·D3H44–Struktur als Stereo–Abbildung, der die Bedeutung von Rest H71 für die TF–Bindung zeigt. TF ist in rot und D3H44 in blau dargestellt. Die Seitenkette von H71 hat großen Einfluß auf die Bindung von TF. Zwei modellierte Rotamere von Arginin an dieser Position zeigen (grün), wie die Seitenkette von Arg–H71 mit Pro–H52a in CDR–H2 oder mit Ile–H29 in CDR–H1 zusammenstoßen und so die Komplementarität zum TF–Epitop zerstören würde. Demgegenüber ermöglicht Alanin an Position H71, wie es in D3 und D3H44 realisiert ist, die TF–Erkennung

D3CH. In der TF·D3H44–Struktur ist deutlich zu erkennen (Abbildung 12.4), daß eine lange Seitenkette wie Arginin an Position H71 mit den Bindungsschleifen CDR–H1 und –H2 kollidieren und damit die Ausbildung der Komplementarität zum TF–Epitop zerstören würde.

Um die hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Resten der leichten und der schweren Kette zu verbessern, ist als weitere Veränderung der Austausch der Reste Leu–H47 / Trp–H50 vorgenommen worden, der im vorherigen Kapitel (Seite 65) besprochen und in Abbildung 12.3 illustriert ist. Die Bindung an TF wurde damit 4–fach erhöht.

Bei Humanisierungen anderer Antikörper war von Bedeutung, ob an Position H49 ein Alanin oder ein Glycin eingebaut war [35], [103]. Bei der Humanisierung von D3 wurde jedoch kein Unterschied in der Bindungskonstanten für ein Glycin an Position H49 (aus dem murinen D3 übernommen) im Vergleich zu einem Alanin (aus dem humanen Gerüst) an dieser Position gefunden. Trotzdem wurde der murine Glycin–Rest übernommen. H49 liegt zwischen den ausgetauschten Resten Trp–H47/Leu–H50, die wahrscheinlich durch die großen hydrophoben Seitenketten die Struktur in diesem Bereich dominieren. Abbildung 12.3 suggeriert, daß das C_{β} –Atom von Alanin an H50 die Position von Ile–H58 beeinflussen könnte.

Die unmittelbare Nähe zweier Reste zu den CDR–Schleifen scheint sich ebenfalls maßgeblich auf die TF–Bindung auszuwirken. Antikörper, die durch die Mutationen Phe–H67–Ala und Leu–H78–Ala die murinen Reste übernehmen, zeigen nur noch eine

um den Faktor 2 niedrigere Bindung als der D3CH-Referenz-Antikörper. Das könnte darauf beruhen, daß in beiden Fällen eine große Seitenkette gegen eine kleine Seitenkette ausgetauscht wurde (ähnlich Arginin an Position H71). Wie in der D3H44-Struktur zu erkennen, ist an Position H67 kein Platz für ein Phenylalanin und die Anordnung der Reste Tyr-H59, Phe-H63, Gln-H64, Ile-H69, Leu-H80 und Met-H82 müsste umorganisiert werden, um diesen Platz zu schaffen. Ebenso beeinflußt Leu-H78 die Lage der Seitenketten von Met-H34 und Ile-H51. Die Auswirkung der großen Seitenketten auf einzelne Reste in CDR-H1 und -H2 ist wahrscheinlich die Ursache der niederaffinen TF-Bindung, die mit dem Austausch durch Alanin-Reste an den Positionen H67 und H78 verbessert wurde.

Die Mutation des hydrophoben Restes Phe-L71 zu dem in D3 vorhandenen polaren Rest Tyr-L71 ermöglichte die Bildung von neuen Wasserstoffbrücken. Damit zeigte sich eine doppelt so gute Bindung für das humanisierte Konstrukt wie für D3CH. Wahrscheinlich sind es die neu induzierten Wasserstoffbrücken zwischen O_{η} von Tyr-L71 und der Hauptkette der Reste L31 und L68, die die relative Anordnung von CDR-L1 zu -L2 stabilisieren und damit die Ausbildung der komplementären Bindungsstelle unterstützen.

Der Austausch von Leu-L46 gegen Val-L46 scheint durch die kürzere Seitenkette eine bessere hydrophobe Wechselwirkung zu den Seitenketten Ala-H55 und Tyr-H99 zu ermöglichen.

Auch wenn die Struktur der Bindungsschleifen in D3 und D3H44 weitgehend identisch ist, unterscheiden sie sich doch in 7 Aminosäuren, siehe Abbildung 12.5. Diese zusätzlichen Veränderungen wurden vorgenommen, um eine bessere TF-Bindung zu erreichen.

Die Reste L24, L34 und L56 zählen zwar zu den CDR-Regionen, aber die Struktur von TF·D3H44 zeigt (Abbildung 12.12), daß diese Reste nicht direkt mit TF in Kontakt treten. Die Hydroxyl-Gruppe von Ser-L34 in D3 benötigt zwei Wassermoleküle, um den Kontakt mit den Sauerstoffatomen der Hauptkette von H97 und H98 sowie dem Stickstoff der Seitenkette von His-L91 herzustellen. Durch die längere Seitenkette und die Amid-Gruppe der Aminosäure Asparagin an Position L34 von D3H44 hingegen werden zwei Wasserstoffbrücken von dem Atom $O_{\delta 1}$ zu dem Stickstoff der Hauptkette von H50 und dem Stickstoff der Seitenkette von His-L91 gebildet, eine weitere ist zwischen dem $N_{\delta 2}$ -Atom und dem Sauerstoff des Peptidrückgrats von H98 zu finden. Dieser Austausch ersetzt wasservermittelte Kontakte von CDR-L1 zu CDR-L3, -H2 und -H3 durch Wasserstoffbrücken. Das Ergebnis einer besseren TF-Bindung ist wahrscheinlich auf die Stabilisierung der Komplementärfläche zu TF zurückzuführen.

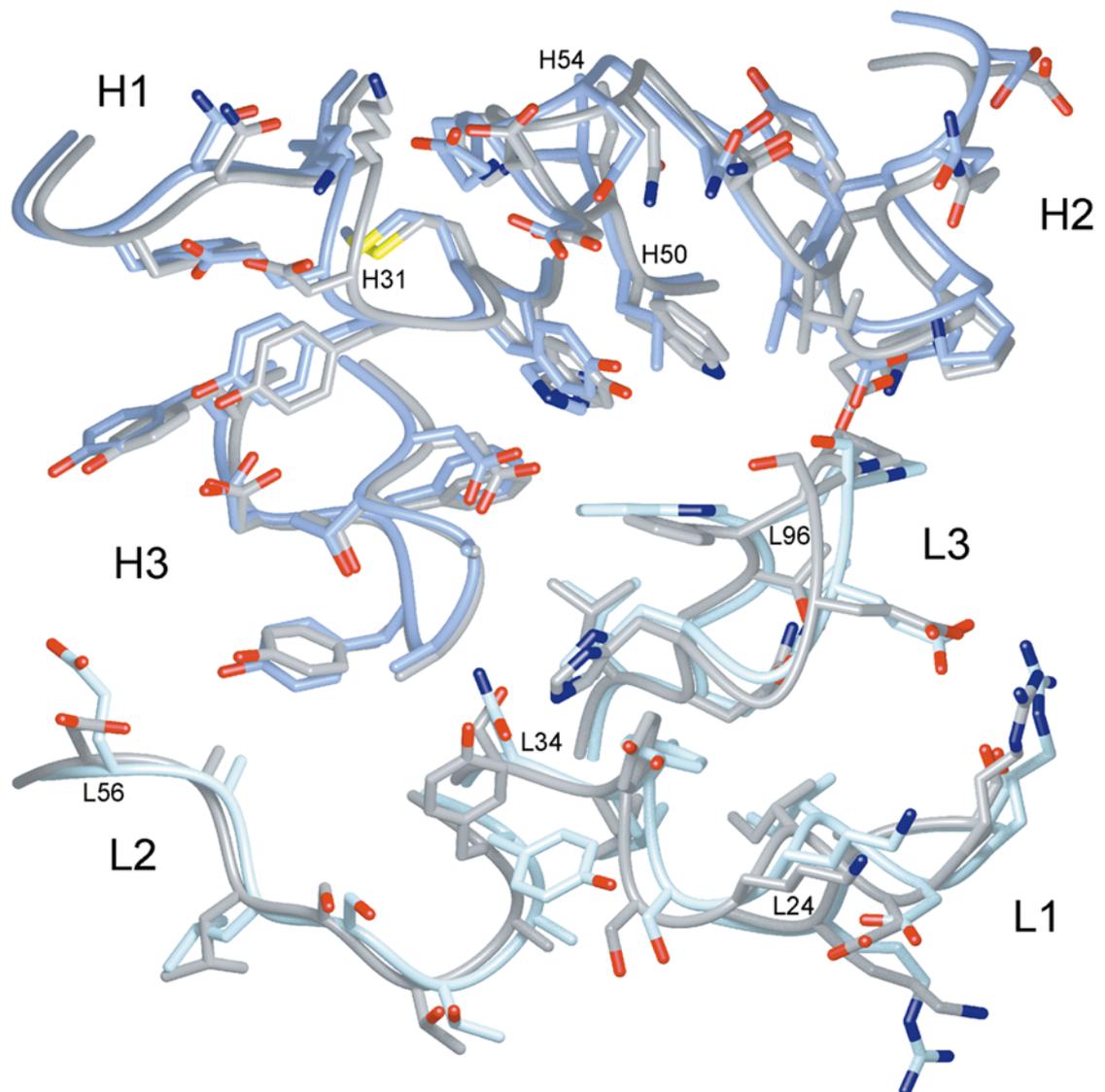


Abbildung 12.5: Überlagerung der CDR-Regionen von D3H44 in blau (hell – leichte Kette, dunkel – schwere Kette) und D3 in grau. Aus Gründen der Übersicht wurde das Gerüst der Antikörper nicht eingezeichnet. Der erste angegebene Rest ist in D3, der zweite in D3H44 an der entsprechenden Position eingebaut: Lys-L24-Arg, Ser-L34-Asn, Asp-L56-Glu, Phe-L96-Trp, Asp-H31-Glu, Trp-H50-Leu und Asn-H54-Gln.

Eine Begründung, warum Arg–L24 (D3H44) anstelle von Lys–L24 (D3) vom humanen Gerüst übernommen wurde und warum Asp–L56 durch Glu–L56 ersetzt wurde, ist in der Struktur nicht erkennbar. Beide Reste sind außerhalb der Bindungsstelle lokalisiert und zeigen "nach außen" in die Lösungsumgebung.

Für den Aminosäureaustausch von Asparaginsäure zu Glutaminsäure an Position H31 und von Asparagin zu Glutamin an Position H54 findet sich zunächst im Vergleich der Strukturen von D3 und D3H44 kein Hinweis, weshalb dieser Austausch vorteilhaft für die TF–Bindung sein könnte. Doch die Struktur von TF im Komplex mit D3H44 offenbart, daß die Seitenketten von H31 mit TF interagieren. So bildet die Seitenkette von Glu–H31 zwei Wasserstoffbrücken mit den Stickstoffatomen der Hauptkette von T199 und T200 von TF. Wie der TF·5G9–Komplex zeigt, induziert Asparaginsäure an dieser Position einen Peptid–*Flip* zwischen T199 und T200 in TF, um der kürzeren Seitenkette entgegen zu kommen, siehe Kapitel 12.2.4. Gln–H54 ist in den hydrophilen Bereich integriert, der sich durch perfekte Komplementarität auszeichnet (siehe Abbildung 12.13). Mit Asparagin an Position H54 wäre die Seitenkette zu kurz, um eine Wasserstoffbrücke zwischen der Amid–Gruppe von H54 sowohl zu $O_{\delta 1}$ von Asp–H52, als auch zu $O_{\delta 1}$ von Asp–T204 ausbilden zu können.

Obwohl Phe–L96 (D3) bzw. Trp–L96 (D3H44) zentral in der Bindungsstelle platziert sind, gibt es keine direkten Wechselwirkungen mit Seitenketten von TF. Abbildung 12.14 zeigt Trp–L96 im TF·D3H44–Komplex. Es ist zu erkennen, daß durch $N_{\epsilon 1}$ in der Tryptophan–Seitenkette die Verbindung zum Wassernetzwerk hergestellt werden kann, das zwischen dem Bindungs epitop von TF und den Bindungsschleifen vermittelt. Mit Phenylalanin, das kein polares Atom in der Seitenkette besitzt, wäre dieser Kontakt nicht möglich. Die eigentliche Funktion des Restes L96 ist in Abbildung 12.3 dargestellt, in der die hydrophobe Wechselwirkung von leichter und schwerer Kette durch die Reste Leu–H47 — Trp–H50 — Phe–L96 in D3 der der Reste Trp–L47 — Leu–H50 — Trp–L96 in D3H44 gegenübergestellt ist. Leu–H50, das an dieser hydrophoben Tasche beteiligt ist, ist in der TF·D3H44–Struktur in Wechselwirkung mit Tyr–T156 und dem hydrophoben Anteil von Thr–T167 aus TF, siehe Abbildung 12.10.

Mit Ausnahme des Tausches der Reste H47 / H50 sind die Aminosäuren in den Bindungsschleifen durch größere Seitenketten ersetzt worden. Der Vergleich zwischen einer hochaufgelösten Struktur von TF im Komplex mit einem murinen Antikörper (D3 oder 5G9) und der hochaufgelösten TF·D3H44–Komplex–Struktur könnte aufzeigen, ob die durch Wassermoleküle überbrückten Kontakte zwischen den kürzeren Seitenketten von D3 bzw. 5G9 und TF durch Wasserstoffbrücken im TF·D3H44–Komplex ersetzt wurden. Allerdings steht eine Struktur von TF im Komplex mit dem murinen

D3 nicht zur Verfügung und die von TF·5G9 ist mit einer Auflösung von 3,0 Å gelöst worden. Somit gibt es keine Struktur, die dem TF·D3H44-Komplex gegenübergestellt werden kann.

Am Ende des Humanisierungsprozesses betrug die Bindungskonstante 0,1 nM und übertraf damit die des murinen und chimären Fab-Fragments um den Faktor 100. Die Aminosäuresequenz von D3H44 im Vergleich zu der von D3 ist in Abbildung 12.1 zu sehen.

Zusammenfassend mußten 7 Reste im humanen Gerüst und 6 Reste in den CDR-Schleifen nachträglich modifiziert werden, um den humanisierten D3H44-Antikörper zu generieren. Die meisten dieser Mutationen hatten Einfluß auf die relative Orientierung der Bindungsschleifen zueinander, so daß diese Veränderungen sich auf die Komplementarität der Bindungsstelle auswirkten und damit die TF-Erkennung beeinflussten. Nur die Seitenketten Leu-H50, Gln-H54 und Glu-H31 interagieren direkt mit TF. Dies zeigt, daß nicht nur die Reste von großer Bedeutung für die Antigen-Antikörper-Erkennung sind, die direkt mit dem Antigen in Wechselwirkung stehen, sondern auch die, die einen Einfluß auf die Ausbildung der Komplementärfläche haben.

12.1.4 Antikörper mit demselben humanen Grundgerüst

Die Antikörper anti-VEGF, anti-CD18, anti-p185Her2 und anti-IgE sind ausgehend von demselben humanen Antikörper-Gerüst humanisiert worden. Bis auf anti-IgE [104] sind von den Fab-Fragmenten anti-VEGF in Komplex mit VEGF [92], anti-CD18 [105] und anti-p185Her2 [106] Kristallstrukturen bekannt.

Der Sequenzvergleich in Abbildung 12.6 zeigt, daß sich die leichten Ketten in 1 bis 3 Aminosäuren und die schweren Ketten in 5 bis 9 Aminosäuren im Antikörper-Gerüst der variablen Domäne außerhalb der Bindungsschleifen unterscheiden. Diese Reste sind im Rahmen des Humanisierungsprozesses mutiert worden, um die Bindungsaffinität zum Antigen zu erhöhen. Es fällt auf, daß die meisten dieser ausgetauschten Reste in den Schleifen der leichten und der schweren Kette lokalisiert sind, die sich "seitlich" von den Bindungsschleifen befinden (L66 und L71 in der leichten und H67, H69, H71, H73, H75, H76, H78 und H80 in der schweren Kette). Zu diesen Resten gehört auch H71, dessen Bedeutung für die Antigen-Bindung in Kapitel 12.1.3 dargestellt ist. Wahrscheinlich haben die ausgetauschten Reste in diesen Schleifen ähnlich wie der Rest an Position H71 Einfluß auf die Konformation der CDR-Schleifen und somit auf die Antigen-Bindung. Die konstanten Domänen sind 100 % identisch.

Der Vergleich der Strukturen von anti-VEGF, anti-CD18 und anti-p185Her2 mit

Tabelle 12.1: Vergleich der Strukturen verschiedener humanisierter Antikörper, die dasselbe humane Antikörper-Gerüst tragen

	Auflösung	RMS	Ellenbogen- Winkel	Rotation $V_L - V_H$
Fab anti-TF, "D3H44"	1,85 Å	Referenz	135°	171,2°
Fab anti-VEGF·VEGF	2,4 Å	0,55 Å	132°	171,2°
Fv anti-CD18, "huH52AA"	1,9 Å	0,98 Å		
Fab anti-CD18, "huH52OZ"	3,0 Å	0,72 Å	136°	170,7°
Fv anti-p185Her2, "4D5, 8"	2,2 Å	0,90 Å		
Fab anti-p185Her2, "4D5, 4"	2,5 Å	0,85 Å	155°	170,7°
Fab anti-p185Her2, "4D5, 7"	2,7 Å	0,88 Å	157°	175,7°

D3H44 ist in Tabelle 12.1 aufgelistet. Es ist zu erkennen, daß die Abweichung der C_α -Atome in der variablen Domäne (CDR-Reste ausgeschlossen) unter den humanisierten Antikörpern geringer ist als die zwischen D3 und D3H44 (Abweichung für die variable Domäne ohne CDRs: 1,07 Å (RMS)). Einerseits scheint es verständlich, daß eine so hohe Sequenzidentität unter diesen humanisierten Antikörpern keine großen strukturellen Unterschiede zuläßt, obwohl alle vier Antikörper unterschiedliche Epitope erkennen und folglich unterschiedliche Bindungsstellen ausbilden. Daher erscheint es andererseits verwunderlich, daß Antikörper, die dasselbe Epitop erkennen und fast identische Bindungsschleifen besitzen (wie D3 und D3H44), eine größere Abweichung voneinander aufweisen, auch wenn deren Antikörper-Gerüste von unterschiedlichen Spezies stammen.

Für weitere Betrachtungen werden für die anti-CD18-Struktur das Fab-Fragment "huH52OZ" und für die anti-p185Her2-Struktur das Fab-Fragment "4D5, Version 4" verwendet.

Die Ellenbogen-Winkel von anti-VEGF und anti-CD18 liegen in dem Bereich, der auch für D3H44 berechnet wurde. Der Ellenbogen-Winkel von anti-p185Her2 ist ungefähr 20° größer. Alle vier Werte liegen im üblichen Bereich für Ellenbogen-Winkel [107], [37]. Obwohl anti-VEGF im Komplex mit VEGF vorliegt, zeigt sich keine Abweichung zu den freien Strukturen D3H44 (anti-TF) und anti-CD18. Die Strukturen des freien und gebundenen D3H44 zeigen keine Veränderung im Ellenbogen-Winkel nach Komplexbildung, so daß hier die anti-VEGF·VEGF-Komplex-Struktur nicht gesondert behandelt und anti-VEGF mit den anderen freien humanisierten Antikörpern

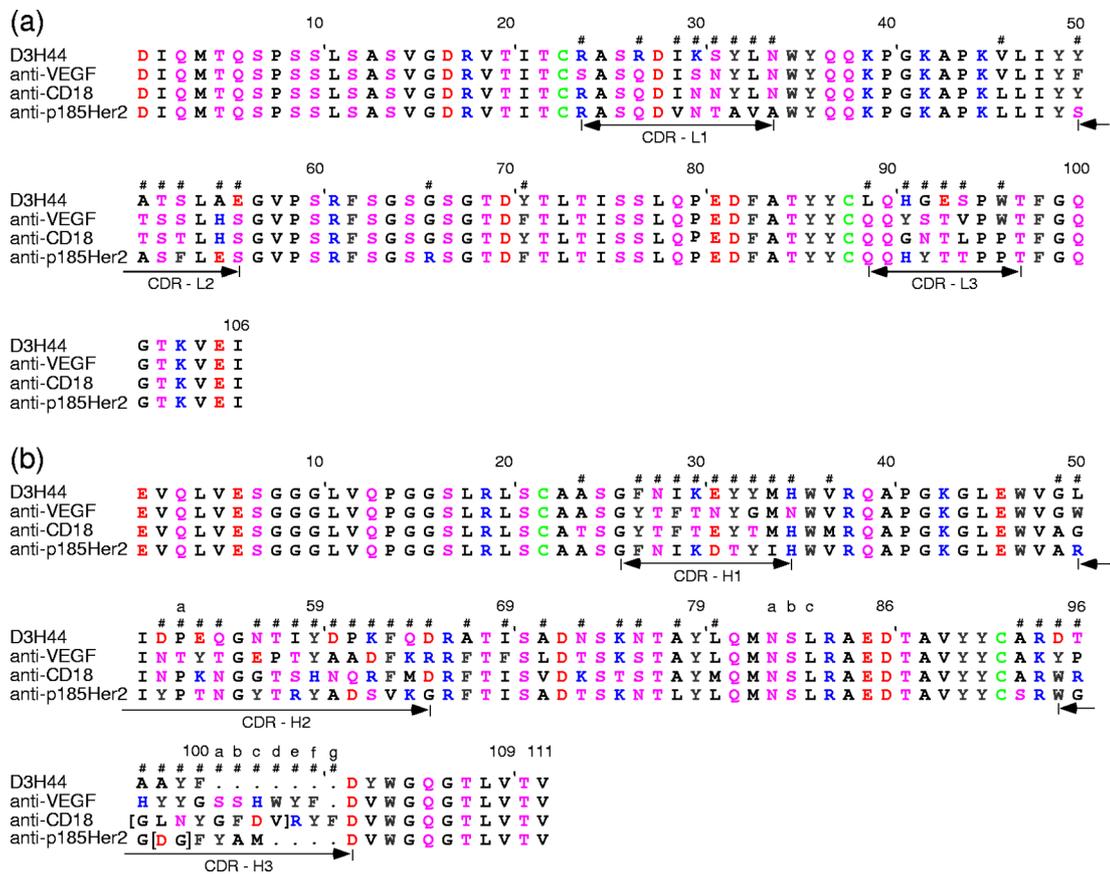


Abbildung 12.6: Sequenzvergleich der variablen Domäne der humanisierten Antikörper D3H44 (anti-TF), anti-VEGF, anti-CD18 und anti-p185Her2 (a) für die leichte Kette und (b) für die schwere Kette. Alle vier humanisierten Antikörper tragen dasselbe humane Antikörper-Gerüst. Die Aminosäuren sind farbig unterteilt nach dem Charakter der Seitenkette: rot – negativ geladen, blau – positiv geladen, schwarz – hydrophob, magenta – polar. Cystein-Reste sind in grüner Farbe dargestellt. In der Kristallstruktur von anti-CD18 ist für die Reste H97 bis H104 keine Elektronendichte vorhanden, ebenso wie für die Reste H98 und H99 in der Struktur von anti-p185Her2. Fehlende Aminosäuren sind in eckige Klammern gesetzt. Die Unterschiede in der Sequenz sind mit einem Doppelkreuz (#) gekennzeichnet. Der Vergleich der konstanten Domänen ergibt 100 % Sequenzidentität

verglichen wurde.

Die Ursache für den abweichenden Ellenbogen-Winkel in der anti-p185Her2-Struktur ist nicht eindeutig. Mögliche Erklärungsvarianten beinhalten einerseits unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen leichter und schwerer Kette in der variablen Domäne, oder betrachten die Abweichung andererseits als ein Artefakt der freien Antikörper-Struktur, das durch unterschiedliche Kristallpackungskontakte und eine andere Lösungsumgebungen hervorgerufen werden kann.

Unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen der leichten und der schweren Kette können im Antikörper-Gerüst und im Bereich der Bindungsschleifen lokalisiert sein. Bei der hohen Sequenzidentität der vier Fab-Fragmente ist es allerdings schwierig, die Unterschiede in der Bindungsstelle der leichten und schweren Kette in der variablen Domäne eindeutig zu identifizieren, die für den größeren Ellenbogen-Winkel von anti-p185Her2 verantwortlich sein können. Abbildung 12.7 zeigt für D3H44 und anti-p185Her2 dasselbe Bindungsmuster zwischen leichter und schwerer Kette im Gerüst der variablen Domäne. In allen vier humanisierten Antikörpern existieren zwei Wasserstoffbrücken zwischen den Domänen V_L und V_H , eine zwischen der Hydroxyl-Gruppe von Tyr-L36 und dem Stickstoff der Hauptkette von H101, die zweite zwischen $N_{\epsilon 2}$ von Gln-L38 und $O_{\epsilon 1}$ von Gln-H39. In den Strukturen D3H44, anti-VEGF und anti-CD18 ist eine dritte Wasserstoffbrücke zwischen der OH-Gruppe von Tyr-H87 und $N_{\epsilon 2}$ von Gln-H39 konserviert, während im anti-p185Her2-Antikörper der Abstand zwischen diesen beiden Atomen 3,6 Å beträgt und das Vorhandensein einer Wasserstoffbrücke an dieser Stelle fraglich ist.

Von den Resten, die während der Humanisierungsprozesse mutiert wurden, liefern nur L46 und H37 einen Beitrag zur Kontaktfläche zwischen leichter und schwerer Kette. D3H44 und anti-VEGF tragen ein Valin an Position L46, wohingegen anti-CD18 und anti-p185Her2 ein Leucin an L46 aufweisen. Position H37 ist in D3H44, anti-VEGF und anti-p185Her2 mit Valin besetzt und in anti-CD18 mit Methionin. Die Reste Leu-L46 und Val-H37 sind nicht einzigartig in anti-p185Her2, Leu-L46 ist ebenfalls in anti-CD18 vorhanden und Val-H37 kommt auch in den Strukturen D3H44 und anti-VEGF vor. Somit können die im Rahmen der Humanisierung ausgetauschten Reste nicht die Ursache für den größeren Ellenbogen-Winkel von anti-p185Her2 sein.

Die Rotation um die 2-zählige Pseudoachse zur Überlagerung der V_L - und V_H -Domäne ist in etwa gleich für alle vier humanisierten Fab-Fragmente.

Nicht nur Reste der Antikörper-Gerüste, sondern auch die Reste der Bindungsschleifen sind an der Wechselwirkung zwischen leichter und schwerer Kette beteiligt. Durch die unterschiedliche Aminosäuresequenz in den CDR-Schleifen kann die In-

teraktion von V_L und V_H und damit der Ellenbogen-Winkel beeinflusst werden. In anti-p185Her2 mit einem im Vergleich zu D3H44, anti-VEGF und anti-CD18 um 20° größeren Ellenbogen-Winkel fällt eine Wasserstoffbrücke in CDR-H2 zwischen den Positionen H50 und L94 auf, die in D3H44, anti-VEGF und anti-CD18 nicht vorhanden ist. In den Antikörpern D3H44, anti-VEGF und anti-CD18 ist Position H50 mit einer der hydrophoben Aminosäuren Leucin, Tryptophan oder Glycin besetzt. Demgegenüber trägt anti-p185Her2 Arg-H50 und kann deshalb zur Hydroxyl-Gruppe von Thr-L94 eine Wasserstoffbrücke ausbauen (siehe Abbildung 12.7). Diese Wasserstoffbrücke könnte Einfluß auf die Wechselwirkung von leichter und schwerer Kette in der variablen Domäne haben.

Inwieweit der abweichende Ellenbogen-Winkel der anti-p185Her2-Struktur auf strukturelle Unterschiede im Vergleich zu den anderen humanisierten Antikörpern hinweist, ist erst durch eine Analyse der Struktur von anti-p185Her2 im Komplex mit dem Her2-Rezeptor zu klären. Es könnte sich um ein Artefakt der freien anti-p185Her2-Struktur handeln, wobei dann der Ellenbogen-Winkel von anti-p185Her2 im Komplex mit dem Her2-Rezeptor ähnliche Werte aufweisen müßte wie D3H44 (anti-TF), anti-VEGF und anti-CD18. Die hohe Sequenzidentität unter den hier verglichenen Antikörpern unterstützt diese Vermutung ebenso wie der Überblick [37] über beobachtete Ellenbogen-Winkel. Für freie und gebundene Antikörperstrukturen erstreckt sich der Bereich von 127° bis 227° . Für zwei Antikörpermoleküle, die zusammen in der asymmetrischen Einheit vorliegen, sind Unterschiede bis 14° beobachtet worden, und die durch Komplexbildung induzierte Veränderung kann bis zu 37° betragen.

12.2 TF-219 im Komplex mit D3H44

12.2.1 Die Struktur des TF·D3H44-Komplexes

Der humanisierte Antikörper D3H44 erkennt ein Bindungsepitop auf der C-terminalen Fibronectin-Typ III-Domäne von TF (siehe Abbildung 12.8). Die Überlagerung der freien D3H44-Struktur mit der an TF gebundenen Struktur zeigt eine Abweichung von $0,70 \text{ \AA}$ (RMS) für die C_α -Atome des Rückgrats und eine Abweichung von $0,94 \text{ \AA}$ (RMS) für die Überlagerung aller Atome einschließlich Seitenketten. Die Überlagerung von freiem TF [12] mit TF aus dem Komplex liefert eine Abweichung von $0,88 \text{ \AA}$ (RMS) für die C_α -Atome und $1,33 \text{ \AA}$ (RMS) für alle Atome. Die mittleren Koordinatenfehler der Strukturen sind $0,16 \text{ \AA}$ (D3H44), $0,17 \text{ \AA}$ (TF·D3H44) und $\approx 0,23 \text{ \AA}$ (TF [12], berechnet nach Luzzati [110]).

Die Größenordnung dieser strukturellen Unterschiede belegt, daß weder im TF

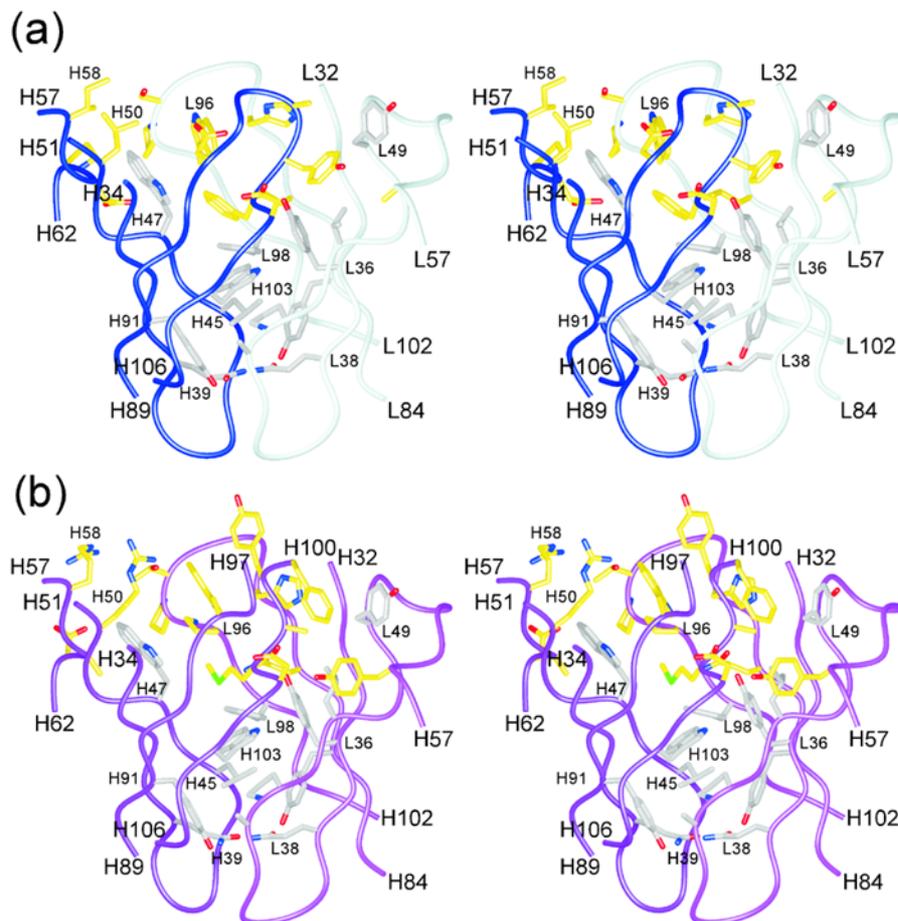


Abbildung 12.7: Stereo-Abbildung der Wechselwirkung zwischen leichter und schwerer Kette in der variablen Region für (a) D3H44 in den Farben hell- und dunkelblau und für (b) anti-p185Her2 in hell- und dunkelmagenta. D3H44 steht stellvertretend für anti-CD18 und anti-VEGF, deren Strukturen einen ähnlichen Ellenbogen-Winkel aufzeigen. Der Übersicht wegen ist nur die Hauptkette der Reste L32 bis L57 und L84 bis L102 der leichten Kette und H34 bis H51, H57 bis H62 und H89 bis H106 der schweren Kette dargestellt. Es sind nur die Seitenketten eingezeichnet, die in einer der beiden Strukturen mehr als 20 \AA^2 zur Kontaktfläche beitragen. Es ist deutlich zu sehen, daß die Reste des Antikörper-Gerüsts (in grau) in beiden Fällen identisch sind und dieselben Interaktionen eingehen. Die Reste, die den Bindungsschleifen zugeordnet werden (in gelb) und die sich in der Sequenz deutlich unterscheiden, könnten die Orientierung der V_L - zur V_H -Domäne und damit den Ellenbogen-Winkel beeinflussen

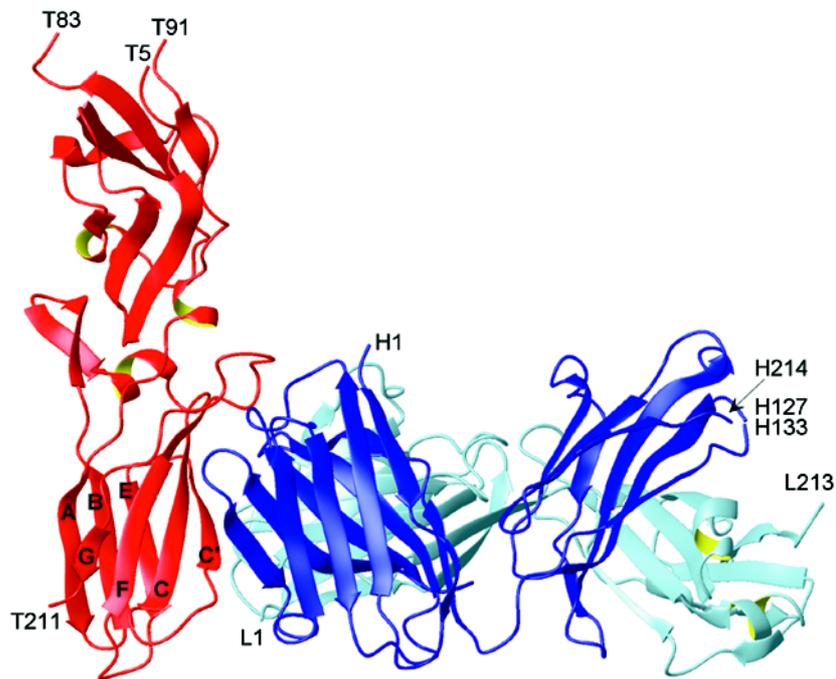


Abbildung 12.8: Darstellung des Komplexes zwischen TF in rot und dem D3H44-Fab-Fragment in hellblau (leichte Kette) und dunkelblau (schwere Kette). D3H44 bindet an ein Epitop in der C-terminalen Domäne von TF. Die β -Stränge in dieser Domäne sind analog den C2-Typ-Immunoglobulinen benannt, die dieselbe Topologie wie TF aufweisen [108], [109]

[111] noch im D3H44–Fab–Fragment signifikante Umorientierungen der Domänen stattfinden. Der minimale Unterschied in den Ellenbogen–Winkeln von D3H44 (132° versus 135°) bestätigt dies und auch die Orientierung beider Fibronectin–Typ III–Domänen in TF bleibt unbeeinflusst. Außerdem werden sowohl das Bindungsepitop in der C–terminalen Domäne von TF als auch die Antigen–Bindungsstelle in der variablen Domäne von D3H44 durch die Komplexbildung strukturell nicht verändert.

12.2.2 Strukturelle Unterschiede zu TF·5G9

Obwohl die Antikörper D3 und 5G9 unabhängig voneinander durch Immunisierung von Mäusen gewonnen wurden, zeigen die Kristallstrukturen der Komplexe TF·D3H44 und TF·5G9, daß die Antikörper große Übereinstimmungen bezüglich TF–Bindung aufweisen. Die allgemeine Ähnlichkeit wird auch dadurch deutlich, daß die TF·D3H44–Struktur mit der TF·5G9–Struktur als Modell im Molekularen Ersatz–Verfahren gelöst werden konnte. Die C_α –Atome beider Komplexe können mit einer Abweichung von $1,71 \text{ \AA}$ (RMS) überlagert werden. Werden nur die Domänen betrachtet, die direkt an der Bindung beteiligt sind, *i.e.* die C–terminale Domäne von TF und die variable Domäne des Antikörpers, so resultiert die Überlagerung der C_α –Atome in einer Abweichung von $1,20 \text{ \AA}$ (RMS). Das Bindungsepitop der Antikörper D3H44 und 5G9 ist nahezu identisch, und die Aminosäuresequenz in den Bindungsschleifen weicht nur in einzelnen Positionen voneinander ab. Der Sequenzvergleich zeigt, daß 21 der 27 Reste in den CDRs der leichten Kette identisch sind, siehe Abbildung 12.9. Vier der abweichenden Aminosäuren sind in CDR–L1 und jeweils eine in CDR–L2 und –L3 zu finden. In den CDRs der schweren Kette stimmen 29 der 35 Reste überein. Die deutlichste Abweichung ist in der Mitte von CDR–H3 an den Positionen H96, H97 und H98 lokalisiert. Während in 5G9 diese Reste mit Asn–Ser–Tyr besetzt sind, sind es in D3H44 die Reste Thr–Ala–Ala.

Im gesamten Antikörper beträgt die Identität von 5G9 und D3H44 69 %. Die murinen Antikörper D3 und 5G9 sind dem IgG1–Isotyp zuzuordnen, wohingegen das Gerüst des humanisierten D3H44–Antikörpers für die leichte Kette von der humanen κ –Untergruppe I und für die schwere Kette von der humanen Untergruppe III stammt.

Die Ähnlichkeit der beiden Antikörper 5G9 und D3H44 spiegelt sich auch in der geringfügigen Änderung der Rotation um die 2–zählige Pseudoachse bei der Überlagerung von V_L und V_H wider, die durch die Komplexbildung induziert wird. Im Fall des humanisierten D3H44–Antikörpers wird durch die Komplexbildung eine Änderung der Rotation von $2,1^\circ$ beobachtet, beim murinen Fab–Fragment 5G9 eine Änderung von $2,8^\circ$ [21]. Für andere Antikörper sind Werte bis zu 16° beschrieben worden [112].

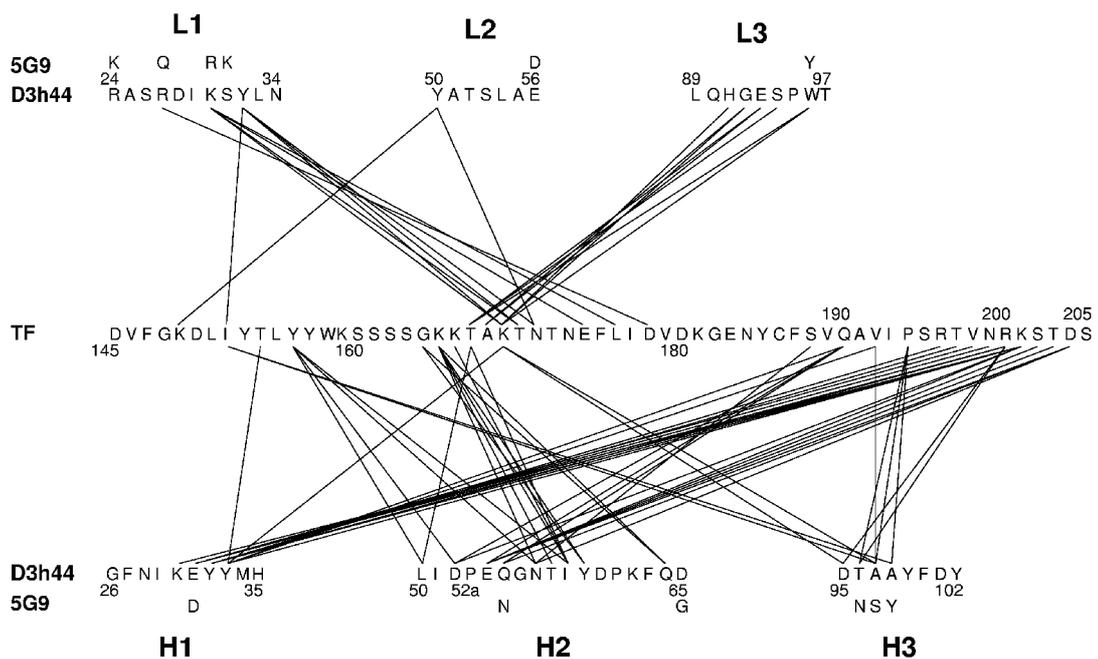


Abbildung 12.9: Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen TF (TF, Mitte) und D3H44 (L, leichte Kette, oben und H, schwere Kette, unten). Der Kontakt zweier Reste ist durch eine Linie dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß die leichte Kette von D3H44 hauptsächlich mit den Resten T167 bis T178 von TF in Wechselwirkung tritt, wohingegen die Kontakte der schweren Kette über das gesamte Epitop verteilt sind. Zusätzlich zu den Resten von D3H44 sind die Reste von 5G9 angegeben, in denen sich beide Antikörper unterscheiden. Die ursprüngliche Abbildung stammt vom Programm XSAE (überlassen von C. Broger) und wurde manuell modifiziert

Umorientierungen in der für D3H44 und 5G9 vorkommenden Größenordnung sind allerdings nicht ausschließlich auf die Antigen-Bindung zurückzuführen. Beispielsweise wurde in den beiden Kristallstrukturen der asymmetrischen Einheit des ungebundenen anti-Lysozym Fab-Fragments HyHEL-63 ein Unterschied in der V_L - V_H -Rotation von $2,4^\circ$ beobachtet, der lediglich durch eine unterschiedliche Kristallpackung und eine unterschiedliche Lösungsumgebung begründet werden kann [42]. Die Komplexe TF·D3H44 und TF·5G9 kristallisieren zwar in unterschiedlichen Raumgruppen, doch spricht die Tatsache, daß beide Antikörper ähnliche Werte für die V_L - V_H -Rotation aufweisen für einen durch die TF-Bindung induzierten Effekt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß D3H44 und 5G9 einen ähnlichen Komplex mit TF eingehen. Dies läßt sich mit der hohen Sequenzidentität von D3H44 und 5G9 in den Bindungsschleifen erklären. Die deutlich bessere Auflösung der TF·D3H44-Struktur von $1,85 \text{ \AA}$ im Vergleich zu der von TF·5G9 ($3,0 \text{ \AA}$) erlaubt jedoch eine Detailanalyse des Antigen-Antikörper Komplexes und den Vergleich mit anderen Strukturen von hochaufgelösten Antikörper-Antigen Komplexen.

12.2.3 Die Bindungsstelle in TF·D3H44

Das Fab-Fragment D3H44 erkennt die C-terminale Domäne von TF, wodurch insgesamt 1850 \AA^2 zuvor dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche (SAS) nach der Bindung in der Kontaktregion verborgen werden. Dazu tragen die CDR-Schleifen des Antikörpers 920 \AA^2 und TF 930 \AA^2 bei, siehe Abbildungen 12.10 und 12.11.

Der nahezu identische Vergleichswert der TF·5G9-Struktur ist 1800 \AA^2 . Die Gegenüberstellung mit anderen Antigen-Antikörper Komplex-Strukturen zeigt, daß die Größe der Bindungsfläche für D3H44 und 5G9 im oberen Bereich der für Protein-Antikörper Komplexe beobachteten Kontaktfläche liegt [21]. Die Kristallstruktur des HyHEL-63·HEL-Komplexes weist eine vergleichbar große Bindungsfläche auf [42].

Das Antikörper-Bindungsepitop von TF ist diskontinuierlich (siehe Abb. 12.9) und erstreckt sich über die Fläche eines aus 4 Strängen bestehenden β -Faltblattes in der C-terminalen TF-Domäne, siehe Abbildung 12.11. Im Folgenden wird für TF die Nomenklatur der C2-Typ Immunoglobuline verwendet, die dieselbe Topologie wie TF aufweisen. Danach wird die β -Faltblatt-„Sandwich“-Struktur der Fibronectin-Typ III-Domäne aufgeteilt in ein 3-strängiges β -Faltblatt bestehend aus den Strängen A, B und E und ein 4-strängiges β -Faltblatt, das sich aus den Strängen C, C', F und G zusammensetzt. Die β -Stränge tragen unterschiedlich zur verborgenen Fläche (SAS) in der TF-D3H44-Bindungsstelle bei, nämlich Strang C' 37,5 %, Strang G 17,0 %, Strang C 17,0 %, Strang E 17,0 %, Strang B 17,0 %, Strang A 17,0 %.

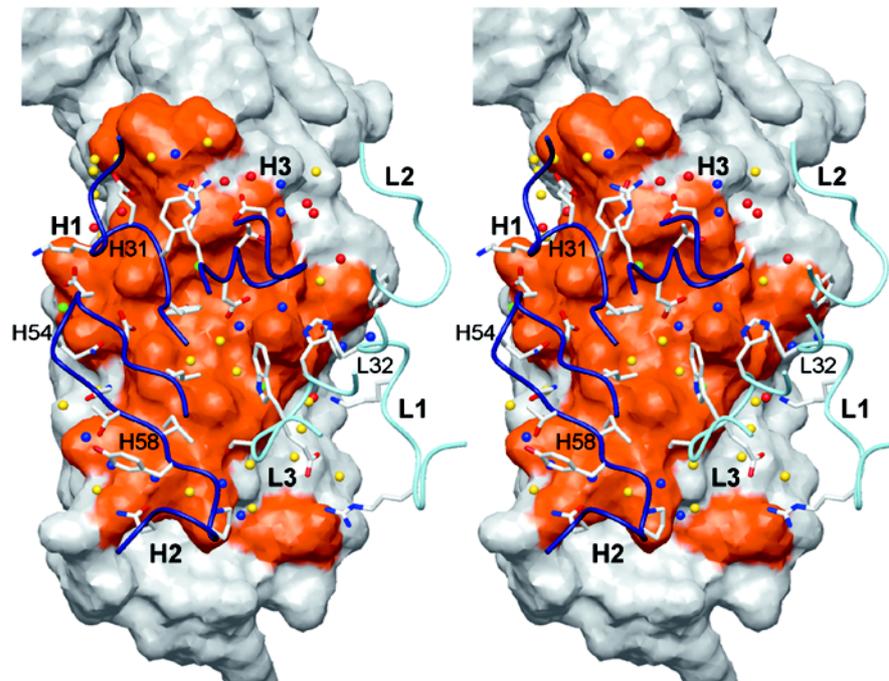


Abbildung 12.10: Stereo-Abbildung der Bindungsstelle im TF·D3H44-Komplex. Nur die Reste, die über 5 \AA^2 zur Kontaktfläche beitragen, sind hier dargestellt. Diese Abbildung zeigt die Moleküloberfläche von TF, die in direktem Kontakt mit dem Antikörper steht, in orange. Der Verlauf der Bindungsschleifen der leichten Kette von D3H44 ist in hellblau, der der schweren Kette in dunkelblau dargestellt. Nur die Seitenketten von D3H44, die mit TF interagieren, sind eingezeichnet. Zusätzlich sind Wassermoleküle in Form von farbigen Bällen dargestellt. Die einzelnen Farben kodieren für folgende Eigenschaften: rot – Wassermoleküle, die in der Komplex-Struktur und in der freien TF-Struktur identisch sind, "konserviert in TF", blau – Wassermoleküle, die im Komplex und in D3H44 identisch sind, "konserviert in D3H44", grün – Wassermoleküle, die sowohl im freien TF und im freien Antikörper als auch in der Komplex-Struktur zu finden sind, gelb – Wassermoleküle, die nur im Komplex gefunden wurden. Siehe hierzu auch Abbildung 12.11

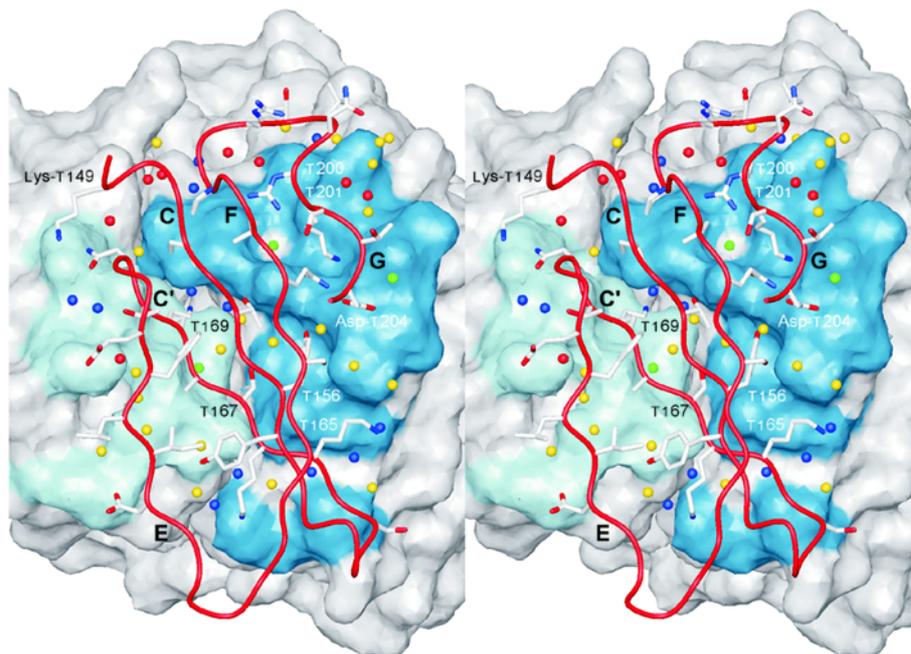


Abbildung 12.11: Stereo-Darstellung des Bindungsepitops aus gegenüberliegender Sicht im Vergleich zu Abbildung 12.10. Hier ist die Moleküloberfläche des D3H44-Antikörpers in hellblau für die leichte und in dunkelblau für die schwere Kette eingezeichnet. Für TF ist der Verlauf der Kette zwischen den Resten T149 bis T204 in rot samt der Seitenketten abgebildet, die an D3H44 binden. Diese Abbildung enthält ebenfalls die Wassermoleküle in derselben Farbkodierung wie in Abb. 12.10

Strang C 12,3 % und Strang F 4,6 %. Auch Strang E des 3-strängigen Faltblattes ist mit 1,4 % am Bindungsepitop beteiligt. An dieser Längsseite des "Sandwich"-Motivs wird das 4-strängige β -Faltblatt von TF durch einen aus 3 Resten bestehenden β -Strang von D3H44 fortgesetzt.

Die Aminosäuren in den Schleifen-Regionen zwischen den Strängen C' und E (4,6 %) sowie zwischen den Strängen F und G (18,9 %) sind ebenfalls am Bindungsepitop beteiligt.

Die leichte und die schwere Kette von D3H44 tragen in unterschiedlich großen Anteilen zur Bindungsfläche bei. Der Anteil der leichten Kette beträgt 27 %, der der schweren Kette 73 %, siehe Abb. 12.10. Obwohl für die meisten Antikörper der CDR-L2 nicht zur Bindung beiträgt [37], [113], wird in der TF·D3H44-Struktur ein Beitrag von 28 \AA^2 berechnet.

Die Reste in der Antigen-Antikörper-Bindungsstelle sind von polaren und geladenen Seitenketten dominiert. Von 31 TF-Resten, die mit D3H44 interagieren, tragen 6 mehr als je 70 \AA^2 zur Bindungsfläche bei. Es sind dies Tyr-T156, Lys-T165, Thr-T167, Lys-T169, Arg-T200 und Lys-T201. Wie auch in den Abbildungen 12.9, 12.11 und 12.12 zu erkennen, ist Lys-T169 von großer Bedeutung für die D3H44-Bindung. Die Seitenkette von Lysin zeigt in den Zwischenraum von leichter und schwerer Kette und bildet sowohl zu His-L94 in der leichten Kette als auch zum Carbonyl-Sauerstoff von Ala-H97 in der schweren Kette eine Wasserstoffbrücke aus.

In den CDR-Schleifen von D3H44 sind 7 Reste zu finden, die mehr als 60 \AA^2 zur Bindungsfläche beitragen. Mit Ausnahme von Tyr-L32 sind diese Reste in der schweren Kette lokalisiert. Die größte Fläche stammt von Glu-H31 (98 \AA^2), dessen Seitenkette mit den Stickstoffatomen der Hauptkette von Asn-T199 und Arg-T200 in TF Wasserstoffbrücken ausbildet.

Die Wechselwirkung zwischen TF und D3H44 ist durch ein ausgedehntes Wasserstoffbrücken-Netzwerk realisiert. Abbildung 12.13 zeigt als Beispiel das Netzwerk von Wasserstoffbrücken um Rest Asp-H52, an dem die Seitenketten Gln-H54 und Tyr-H33 von D3H44 und Thr-T154, Tyr-T156, Gln-T190, Lys-T201 und Asp-T204 von TF beteiligt sind. Es sind auch die Salzbrücke zwischen Asp-H52 und Lys-T201 sowie die ungewöhnliche Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette von Asn-H56 als Donor und dem aromatischen Ring von Tyr-T156 als π -Akzeptor zu erkennen [114]. In dieser Region ist kein Wassermolekül zu finden, was auf eine perfekte Komplementarität der Oberflächen zwischen D3H44 und TF hinweist.

Diese Komplementarität ist nicht über die gesamte Bindungsfläche gegeben, die Region um Asp-H52 stellt eher eine Ausnahme dar. Der überwiegende Teil der TF-

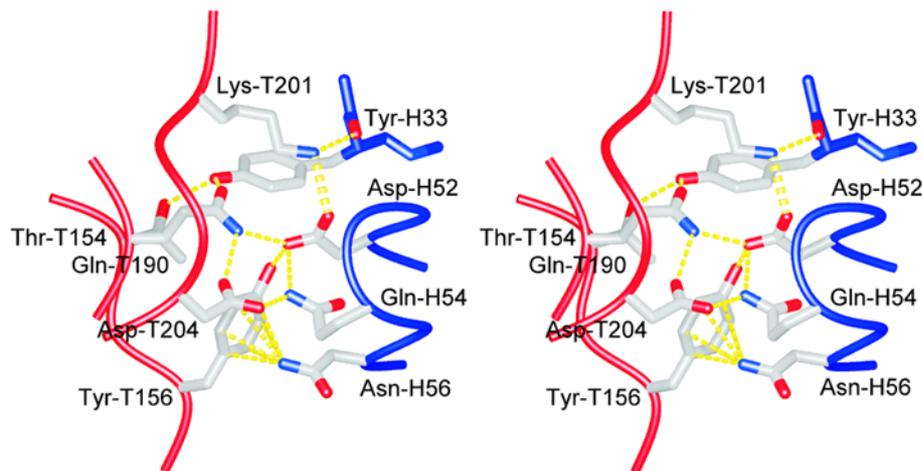


Abbildung 12.13: Stereo-Abbildung der hydrophilen Wechselwirkung in der Region um Rest Asp-H52, die eine perfekte Komplementarität der Bindungsflächen zum TF-Epitop zeigt. Die Hauptkette von TF ist in rot dargestellt, die schwere Kette von D3H44 in dunkelblau

D3H44-Bindungsstelle zeigt eine nicht perfekt angepaßte Oberfläche der Antigen-Bindungsstelle an das Epitop von TF, die durch eine große Anzahl an Wassermolekülen ausgeglichen wird. Diese geordneten Wassermoleküle werden an Stellen gefunden, an denen sie Bindungen zwischen TF und D3H44 vermitteln können. So füllen sie entweder Lücken aus oder rahmen die Bindungsstelle ein. Beispielsweise sind auf beiden Seiten der CDR-L3-Schleife, die Wasserstoffbrücken mit der Hauptkette von Strang C' in TF ausbildet, viele Wassermoleküle zu finden.

Zusätzlich gibt es im Kontaktbereich zwei kleine Bereiche, in denen hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung von D3H44 an TF vermitteln. Der erste Bereich wird von Ala-H97 aus D3H44 und den Resten Val-T192, Ile-T152 und Pro-T194 aus TF gebildet. Der zweite Bereich umfaßt die Reste Leu-H50, Ile-H58 aus D3H44 und den hydrophoben Anteil von Thr-T167 aus TF.

Die strukturelle Interpretation des TF-Epitopes stimmt gut mit den Ergebnissen aus Mutagenese- und Bindungsstudien für D3 und 5G9 überein [18], [21]. Für 5G9 hatte das Mutieren der Reste Tyr-T156, Lys-T169, Arg-T200 und Lys-T201 in TF erheblichen Einfluß auf die Bindung. Diese Reste tragen in den beiden Kristallstrukturen TF·D3H44 und TF·5G9 die größten Anteile zur Kontaktfläche im Bindungsbereich bei.

Die Mutagenese- und Bindungsstudie von D3 identifizierte neben diesen noch weitere TF-Reste, die großen Einfluß auf die D3-Bindung ausübten, wie die Mutation Ile-T152-Ala. Ile-T152 trägt 20 \AA^2 zum TF-Epitop bei und ist in einen hydrophoben Bereich eingebettet.

Die Doppelmutation von Lys-T165-Ala und Lys-T166-Ala reduzierte ebenfalls deutlich die Bindungsaffinität von D3. Da der Beitrag von Lys-T165 zur Oberfläche des TF-Epitops etwa 3-fach größer ist als der von Lys-T166, ist Lys-T165 wahrscheinlich für die Bindungsaffinität von größerer Bedeutung. In der TF-D3H44-Struktur ist die Elektronendichte von Lys-T165 besser definiert als die für Lys-T166, was auf die geringere Variabilität der Seitenkette von Lys-T165 hindeutet. Diese Seitenkette wird seitlich von Trp-T158 und Asn-H52 stabilisiert. Zwar ist das Atom N_ζ von Lys-T165 in Reichweite einer möglichen Wasserstoffbrücke zur Amid-Gruppe von Asn-H52, doch die Geometrie dieser möglichen Verbindung spricht gegen die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke. Ein Wassermolekül ermöglicht den Kontakt von Lys-T165 zum Antikörper, indem es die Distanz zur Seitenkette und zur Hauptkette von Thr-H57 in CDR-H2 überbrückt. Dieses Wassermolekül hat einen der niedrigsten atomaren Auslenkungsfaktoren, die für Wassermoleküle in den beiden Strukturen beobachtet wurden.

Bezüglich der Bedeutung des Restes Thr-T167 für die D3-Bindung widersprechen sich dem ersten Anschein nach die Kristallstruktur und die Mutations- und Bindungsdaten. Obwohl dieser Rest etwa 80 Å² zur Kontaktfläche beiträgt, führt die Mutation Thr-T167-Ala zu keiner Reduktion der Bindungsaffinität zu D3. Eine mögliche Erklärung ist, daß die hydrophobe Seitenkette von Alanin ein guter Ersatz für den hydrophoben Anteil von Threonin ist, der zum oben beschriebenen hydrophoben Wechselwirkungsbereich beiträgt.

Insgesamt ist eine gute Korrelation zwischen der Kontaktfläche eines Restes und den Bindungsdaten gegeben [18], [21]. Eine mögliche Erklärung ist, daß die TF-D3H44-Bindungsfläche fast ausschließlich durch hydrophile Wechselwirkungen beschrieben werden kann und keine hydrophoben *hot spots* enthält.

Im Gegensatz dazu zeigt die Kristallstruktur des humanen Wachstumshormons (hGH) im Komplex mit dem gebundenen Rezeptor (hGHbp) ein Bindungsepitop, das sich im Kern hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen auszeichnet [115]. Dieser Kern (*hot spot*) ist von einer polaren Umgebung eingeschlossen, in der eine große Anzahl intermolekularer Salz- und Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Von den 33 Resten des Rezeptors, die zur Kontaktfläche beitragen, bildeten nur 11 Reste das funktionale Epitop. Die größte Auswirkung hatten die Alanin-Mutationen zweier Tryptophan-Reste, die im Zentrum des hydrophoben Kerns lokalisiert waren. In diesem Fall korrelierten die strukturellen Parameter nicht mit den gemessenen Bindungsaffinitäten der Alanin-Mutationen.

12.2.4 Vergleich mit der Bindungsstelle von TF·5G9

Die Unterschiede in der Bindungsstelle von D3H44 und 5G9 sind auf die Sequenzunterschiede in den CDR-Schleifen zurückzuführen, siehe auch Abbildung 12.9. Der erste signifikante Unterschied ist in CDR-L1 lokalisiert. In 5G9 bildet Arg-L30 mit dem Sauerstoff der Hauptkette von Lys-T169 in TF eine Wasserstoffbrücke. In D3H44 hingegen ist Arginin durch die geringfügig kürzere Seitenkette Lysin ersetzt, was die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zu Lys-T169 verhindert. Stattdessen wird der Kontakt über Wassermoleküle indirekt hergestellt.

Die Wechselwirkung zwischen CDR-L2 und TF kommt durch die Wasserstoffbrücke zwischen OH-Tyr-L50 und $N_{\delta 2}$ -Asn-T171 zustande, die in beiden Strukturen vorhanden ist. Der Austausch von Phenylalanin durch Tryptophan an Position L96 in CDR-L3 ist im Rahmen des Humanisierungsprozesses vorgenommen worden, um die Interaktion von V_L und V_H zu verbessern. Dadurch konnte die Affinität um den Faktor 1,5 erhöht werden [27]. Sowohl in 5G9 als auch in D3 ist Position L96 mit einem Tyrosin besetzt. Das O_{η} -Atom von Tyr-L96 in der TF·5G9-Struktur tritt mit dem N_{ζ} -Atom von Lys-T196 in Wechselwirkung. Im Vergleich dazu ist im TF·D3H44-Komplex die Wasserstoffbrücke durch ein Netzwerk von Wassermolekülen um Atom $N_{\epsilon 1}$ von Trp-L96 ersetzt.

Im Fall des TF·5G9 ist in CDR-H1 die Seitenkette von Asp-H31 über eine Wasserstoffbrücke mit dem Sauerstoff der Hauptkette von Val-T198 verknüpft. Die Hauptkette von TF zwischen den Resten T199 und T200 unterscheidet sich in einem Peptid-*Flip*, so daß in der TF·D3H44-Struktur zwischen der Carboxylat-Gruppe von Glu-H31 und den Stickstoffatomen in der Hauptkette von T199 und T200 zwei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Die Substitution Asp-H31-Glu ist ein Schritt im Humanisierungsprozeß, durch den die Bindungsaffinität um den Faktor 3 verbessert werden konnte [27]. Keine Unterschiede zwischen D3H44 und 5G9 werden im Bereich CDR-H2 beobachtet, die, wie in Kapitel 12.2.3 bereits beschrieben, das Zentrum eines Bereiches bildet, das sich durch hohe Komplementarität und ein ausgedehntes Wasserstoffbrücken-Netzwerk auszeichnet. Die größte Variation in der Aminosäuresequenz ist in CDR-H3 zu finden. In 5G9 und D3H44 sind die Reste H96-H97-H98 durch unterschiedliche Aminosäuren besetzt: Asn-H96, Ser-H97 und Tyr-H98 in 5G9 und Thr-H96, Ala-H97 und Ala-H98 in D3H44. Asn-H96 und Thr-H96 scheinen in gleicher Weise eine 3_{10} -Helix-Schleife durch eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoff der Hauptkette von Tyr-H99 zu stabilisieren. Alanin anstelle von Serin an Position H97 zeigte bessere Ergebnisse in der Bindungsaffinität, denn wie bereits oben erläutert ist Ala-H97 Teil eines kleinen hydrophoben Bereichs in der Bindungsstelle. Für

Tyr-H98 spricht die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen O_{η} -Tyr-H98 und dem Sauerstoff von Lys-T149 in TF·5G9, und es erscheint ungünstig, diese Position mit Alanin zu besetzen, da die Wasserstoffbrücke zu TF mit Ala-H98 nicht ausgebildet werden kann. Zahlreiche Wassermoleküle füllen den Platz der fehlenden aromatischen Seitenkette in der TF·D3H44-Struktur.

Die Dissoziationskonstanten sind $K_d : 0,1 \cdot 10^{-9}$ M für D3H44, bestimmt mit einem Biacore Gerät (Surface-Plasmon-Resonanz) [27], und $K_i : 3,4 \cdot 10^{-9}$ M für 5G9, bestimmt mit einem *competition assay* [21]. Es ist nicht möglich, die 30-fach höhere Bindungsaffinität von D3H44 durch die Strukturen der Komplexe zu erklären. Aber es ist zu erwarten, daß die Affinität von D3H44 weiter verbessert werden kann, wenn die Reste Arg-L30 und Tyr-H98 von 5G9 in D3H44 übernommen werden, da diese direkt mit TF-Resten interagieren könnten.

Der Vergleich der an TF bindenden Antikörper D3H44 und 5G9 zeigt, daß die CDR-Regionen nicht identisch und die in der Bindungsstelle aufgezeigten Unterschiede erklärbar sind. Umgekehrt betrachtet ist es erstaunlich, daß zwei unabhängig voneinander entwickelte Antikörper eine fast übereinstimmende Bindungsstelle aufweisen.

12.2.5 Wassermoleküle in der Bindungsstelle

In der Summe sind es 46 Wassermoleküle, die in der Bindungsstelle lokalisiert sind, siehe Tabelle 12.2. Als konserviert werden solche Wassermoleküle betrachtet, die nach der Überlagerung der einzelnen Strukturen eine Abweichung von weniger als 1,5 Å aufweisen. Derselbe Grenzwert von 1,5 Å ist auch für Wassermoleküle verwendet worden, die aus der Bindungsstelle der freien Strukturen verdrängt oder durch polare Atome des Bindungspartners ersetzt wurden. Die Charakterisierung der Wassermoleküle in der TF-D3H44-Bindungsstelle erfolgte anhand der Überlagerung aller Atome der variablen Domänen von D3H44 und TF·D3H44 und der der C-terminalen Domänen von TF und TF·D3H44.

Häufig füllen mehrere Wassermoleküle die durch unvollständige Komplementarität entstandenen Taschen auf. Besonders viele Wassermoleküle sind im Graben zwischen CDR-L3 auf der einen und CDR-H1 und -H3 auf der anderen Seite zu finden, siehe Abbildung 12.10, Seite 84. Zahlreiche Wassermoleküle lagern sich kragenförmig um die Bindungsstelle. Viele dieser Wassermoleküle vermitteln den Kontakt zwischen Seitenketten von TF und D3H44, siehe Abbildung 12.14. Daß Wassermoleküle die Stellen der Bindungsfläche ausgleichen, die keine gute Komplementarität zum Bindungspartner zeigen, wurde bereits für andere Protein-Protein- und Protein-DNA-

Tabelle 12.2: Wassermoleküle in der Bindungsstelle von Antigen–Antikörper–Komplexen

	TF·D3H44	Cyt-c·FabE8	HEL·HyHEL–63
Komplex			
Anzahl Wassermoleküle			
im Kontaktbereich	46	38	38
konservierte Wassermoleküle			
(in Antigen und Antikörper)	26 (3)	17 (1)	16 (2)
neue Wassermoleküle	23	22	24
Kontaktfläche der Bindungsstelle	930 Å ²	590 Å ²	890 Å ²
Antigen			
konserviert und überbrückend	7	6	6
konserviert, nicht überbrückend	4	4	3
verdrängt im Komplex	8	5	9
durch polare Atome ersetzt	5	1	4
Antikörper			
konserviert und überbrückend	12	2	2
konserviert, nicht überbrückend	3	5	5
verdrängt im Komplex	5	4	4
durch polare Atome ersetzt	4	2	1

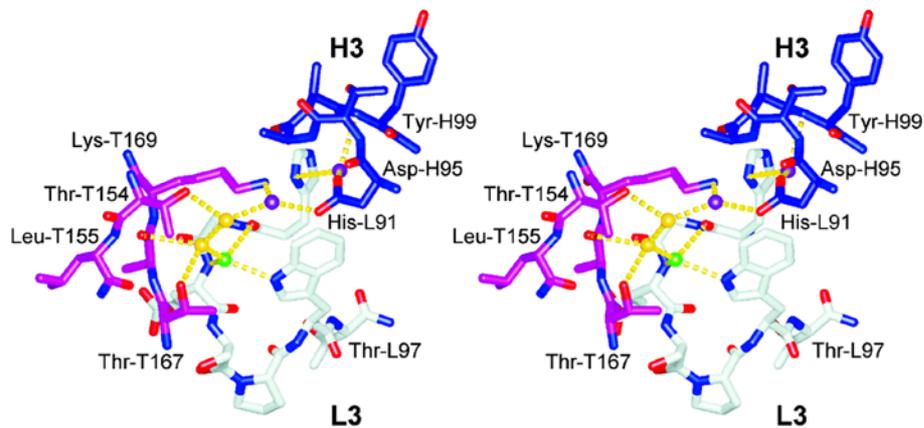


Abbildung 12.14: Die Stereo-Abbildung zeigt Wassermoleküle im Kontaktbereich von TF (in magenta) und D3H44 (in hell- und dunkelblau). Die Farbe der Wassermoleküle ist wie in den Abbildungen 12.10 und 12.11 gewählt. Wassermoleküle füllen die Lücken und bilden ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken, die den Kontakt zwischen TF und D3H44 vermitteln

Komplexe beobachtet [39], [116], [117]. Eine Reihe von Wassermolekülen sind nicht nur in der Komplex-Struktur, sondern auch in der Struktur einer oder beider freier Komponenten vorhanden. Es existieren in der freien TF-Struktur 46 Wassermoleküle (von 253 in der freien TF-Struktur), die auch im Komplex vorhanden sind. Für D3H44 sind 193 der 372 Wassermoleküle aus der freien Struktur konserviert. Im Kontaktbereich selbst befinden sich 11 (24 %) Wassermoleküle, die in TF konserviert sind und 15 (32 %), die in D3H44 als konserviert betrachtet werden können, siehe Tabelle 12.2. Interessanterweise sind drei Wassermoleküle sowohl im TF als auch in D3H44 konserviert. Die restlichen 23 Wassermoleküle, die in keiner der freien Strukturen beobachtet werden konnten, werden in diesem Sinne als *neu* bezeichnet, siehe dazu auch Abbildungen 12.10 und 12.11.

Die konservierten Wassermoleküle können als integrale Bestandteile der Bindungsstelle betrachtet werden, weil sie die Komplementarität zum Antigen verbessern und im Falle überbrückender Wassermoleküle sogar die Reichweite der Seitenketten vergrößern. Einen Einblick gibt Abbildung 12.14.

Wassermoleküle können einen erheblichen Beitrag zur Energie von Protein-Protein-Wechselwirkungen liefern [118]. Um diese Wassermoleküle im TF·D3H44-Komplex zu identifizieren, wurden nur solche Wasser ausgewählt, die entweder in TF oder in D3H44 konserviert waren. Eine weitere Anforderung war, daß jedes dieser Wassermoleküle sowohl zu TF als auch zu D3H44 Wasserstoffbrücken ausbildet, also den Kontakt von TF zu D3H44 überbrückt. Für den maximale Abstand einer Wasserstoffbrücke wurde ein Wert von 4,0 Å angenommen worden. Mit diesen Kriterien wurden

7 überbrückende Wassermoleküle von TF und 12 überbrückende Wassermoleküle von D3H44 identifiziert, die vermutlich eine wichtige Rolle in der Energiebetrachtung der TF – D3H44–Assoziation spielen.

Die Untersuchung der TF·5G9–Struktur mit einer Auflösung von 3,0 Å ergab, daß Wassermoleküle in der Bindungsstelle keine bedeutende Rolle spielen [21]. Anhand der TF·D3H44–Struktur mit 1,85 Å Auflösung konnte in dieser Studie die Bedeutung von Wassermolekülen bei der Überbrückung von Antigen–Antikörper–Kontakten zumindest für TF·D3H44 gezeigt werden, siehe auch Seite 96.

12.2.6 Antigen–Erkennung in TF·D3H44

Die TF–Erkennung ist nicht an eine Umlagerung in D3H44 gekoppelt. Mit der Ausnahme von geringfügigen Änderungen in der Lage der Hauptkette von CDR–L3 in der leichten Kette und CDR–H2 in der schweren Kette finden keine relevanten Umlagerungen statt. Die Überlagerung der C_{α} –Atome der C–terminalen Domäne von freiem und gebundenem TF liefert eine Abweichung von 0,66 Å (RMS), und die Überlagerung der variablen Domäne von freiem und gebundenem D3H44 eine Abweichung von 0,46 Å (RMS). Die größten Unterschiede der C_{α} –Positionen wurden für Ala–L92 und Glu–H53 beobachtet, nämlich 1,5 Å und 1,1 Å. Insgesamt sind diese Unterschiede sehr gering. Bei der Betrachtung der überlagerten freien und gebundenen D3H44–Struktur wird der Eindruck erweckt, daß die Veränderungen der CDR–Schleifen der leichten Kette und die der schweren Kette in die Richtung der anderen Kette tendieren. Diese Tendenz paßt zur bildhaften Vorstellung von Antikörpern, in der die Finger (CDRs) von beiden Händen (V_L und V_H) einen Ball (Antigen) umgreifen. Die Bewegung der Finger beim Festhalten des Balls entspricht der strukturellen Veränderung der CDR–Schleifen von der freien D3H44–Struktur (ohne Ball) im Vergleich zur gebundenen D3H44–Struktur (mit Ball).

Für TF werden die größten Versätze von C_{α} –Atomen für Ser–T160, Ser–T163 und Gly–T164 mit jeweils 2,9 Å, 2,1 Å und 1,4 Å beobachtet. In der freien TF–Struktur sind die Reste T161 und T162 nicht geordnet und damit nicht in der Elektronendichte zu sehen [12]. Die Flexibilität in diesem Bereich wirkt sich auch auf die benachbarten Reste aus. In der Struktur des TF·D3H44–Komplexes ist die Elektronendichte dieser Reste vorhanden. In einer benachbarten Schleife, die nicht zum Bindungsepitop gehört, werden Verschiebungen der C_{α} –Atome von 1,2 Å und 1,4 Å für die Reste T181 und T182 gefunden. Diese Reste haben in der freien TF–Struktur und im Komplex relativ hohe Auslenkungsfaktoren von 60 \AA^2 . Bis auf die hier beschriebenen Abweichungen finden keine weiteren Veränderungen in der Hauptkette des TF–Bindungsepitops statt.

Auf der Ebene der Seitenketten werden für 15 Reste in der leichten und 11 Reste in der schweren Kette von D3H44 sowie für 21 Reste in TF Änderungen im χ_1 -Dihedralwinkel von über 90° beobachtet. Nur eine kleine Anzahl dieser Reste ist an der Antigen-Antikörper-Bindung beteiligt (Ser-L94 von D3H44 und Thr-T167, Lys-T169 und Val-T192 von TF). Während des Erkennungsprozesses und der Komplexbildung bildet Ser-L94 aus CDR-L3 Wasserstoffbrücken zur Hauptkette von Thr-T167, und Lys-T169 von TF bildet Wasserstoffbrücken zur Seitenkette von His-L91 und der Hauptkette von Ala-H97. Die Seitenketten Thr-T167 und Val-T192 sind am hydrophoben Bereich in der Bindungsstelle beteiligt, siehe Kapitel 12.2.3, Seite 88. Einzelne Seitenketten zeigen deutliche Änderungen in den χ_2 - und χ_3 -Winkeln, nämlich Lys-L30, Glu-H31, Ile-H58 in D3H44 und Ile-T152, Lys-T201 in TF. In der TF·D3H44-Struktur sind diese Reste entweder direkt in die Wasserstoffbrückenbildung zu TF oder zu Wassermolekülen involviert oder bilden hydrophobe Kontakte aus.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß durch das Ausbleiben von Umlagerungen innerhalb der Moleküle während des TF-Erkennungsprozesses auf eine gute Abstimmung zwischen dem Bindungssepitop von TF und der Bindungsstelle von D3H44 geschlossen werden kann. Für eine Reihe von Antigen-Antikörper-Komplexen (mit einem Protein als Antigen) wurde das Ausbleiben von signifikanten Konformationsänderungen an hochaufgelösten Strukturen beschrieben [42]. Im Unterschied dazu wurde über große Veränderungen in der Lage der Bindungsschleifen für solche Antikörper berichtet, deren zugehöriges Antigen ein Hapten oder kurzes Peptid darstellte [37].

12.2.7 Andere hochaufgelöste Antigen-Antikörper-Strukturen

Als Kriterium für vergleichbare Antigen-Antikörper-Komplexe sind Kristallstrukturen mit einer Auflösung besser als 2 \AA zugrunde gelegt worden, wenn gleichzeitig die Atomkoordinaten des freien Antikörpers und des freien Antigens bei vergleichbarer Auflösung in der Protein-Datenbank zur Verfügung standen [78].

Einer der am besten untersuchten Komplexe ist der zwischen Lysozym aus Hühneriweiß HEL und dem Fv-Fragment D1.3 mit Kristallstrukturen um $1,8 \text{ \AA}$ Auflösung [116], [119], [120], von dem auch Mutagenese- und thermodynamische Daten existieren [121]. Neben diesen Strukturen gibt es nur zwei weitere Antigen-Antikörper-Komplex-Strukturen mit entsprechend guter Auflösung und den dazugehörenden Strukturen des freien Antigens und freien Antikörpers, nämlich HEL im Komplex mit dem Fab-Fragment HyHEL-63 [42] und Cytochrom c (Cyt-c) im Komplex mit FabE8 [41]. Dabei weist die freie FabE8-Struktur eine Auflösung von $2,3 \text{ \AA}$ auf. Leider sind die

vollständigen Koordinaten lediglich für die Strukturen der Komplexe HEL·HyHEL–63 und Cyt–c·FabE8 in der Protein–Datenbank verfügbar [78].

Diese Kristallstrukturen TF·D3H44, HEL·HyHEL–63 und Cyt–c·FabE8 zeigen, daß die Wechselwirkung von Antigen und Antikörper durch eine Anzahl von Wasserstoffbrücken vermittelt wird. Dieses Wasserstoffbrücken–Netzwerk wird deutlich erweitert, wenn Wassermoleküle mit in die Betrachtung einbezogen werden. Wie in dieser Arbeit für TF·D3H44 und bereits früher für den Komplex HEL·FvD1.3 [116] beschrieben, können Wassermoleküle die Reichweite und die Beiträge der CDR–Schleifen vergrößern, indem sie indirekt die Protein–Protein–Wechselwirkung überbrücken. Für den HEL·FvD1.3–Komplex berichteten die Autoren von 48 Wassermolekülen in der Bindungsfläche, was vergleichbar ist mit der Anzahl, die bei der Analyse der Komplexe TF·D3H44, Cyt–c·FabE8 und HEL·HyHEL in dieser Arbeit gefunden wird, siehe Tabelle 12.2. Die Auswertung der Komplexe Cyt–c·FabE8 und HEL·HyHEL erfolgte mit den für den TF·D3H44–Komplex zugrunde gelegten Kriterien. Danach sind 46, 38 und 38 Wasser in der Bindungsstelle der Komplexe TF·D3H44, Cyt–c·FabE8 und HEL·HyHEL lokalisiert, von denen 26, 17 und 16 Wassermoleküle im Antigen oder Antikörper konserviert sind. Eine logische Konsequenz daraus ist, daß die Anzahl *neuer* Wassermoleküle in den Antigen–Antikörper–Bindungsstellen vergleichbar ist. Die Größe der Bindungsfläche variierte von 930 \AA^2 für TF·D3H44, 590 \AA^2 für Cyt–c·FabE8 und 890 \AA^2 für HEL·HyHEL–63. Im Fall des HEL·FvD1.3–Komplexes beschrieben die Autoren eine Fläche von 615 \AA^2 .

In dieser Analyse sind Kristallpackungskontakte der einzelnen Strukturen nicht berücksichtigt, da in den unterschiedlichen Strukturen auch unterschiedliche Moleküloberflächen in den Packungskontakten involviert sind. Daher ist es möglich, daß Stellen mit einer hohen Affinität zu Wasser durch Atome von symmetrieverwandten Molekülen besetzt sind.

Zwischen der Anzahl der Wassermoleküle und der Auflösung der Kristallstrukturen besteht ein direkter Zusammenhang. So wurden beispielsweise keine Wassermoleküle in der Bindungsstelle der Kristallstruktur von TF·5G9 mit einer Auflösung von $3,0 \text{ \AA}$ beobachtet [21], neun Wassermoleküle im HPr·Fab–Jel42 Komplex mit $2,5 \text{ \AA}$ Auflösung [122] und zwei Wassermoleküle in der Bindungsstelle des BWQL·HyHEL–5–Komplexes bei $2,6 \text{ \AA}$ Auflösung [91]. Auch wenn diese Korrelation nicht überraschend ist, so verdeutlicht sie die Grenzen der Charakterisierung von Wassermolekülen und betont gleichermaßen die Bedeutung von Antigen–Antikörper–Kristallstrukturen mit hoher Auflösung.

In den hier diskutierten Beispielen scheinen geordnete Wassermoleküle in der Bin-

dungsstelle fester Bestandteil des Komplexes zu sein. Ungefähr 50 % dieser Wassermoleküle existiert auch in der freien Antigen- oder der freien Antikörper-Struktur.

12.2.8 Bewertung der Ergebnisse

Protein-Protein-Wechselwirkungen treten in den unterschiedlichsten Formen auf. Die Gleichgewichtskonstante kann von hydrophoben *hot spots* [115], von hydrophilen Bereichen [121] oder von einzelnen Resten, die sich über die ganze Bindungsfläche verteilen [123], [124], dominiert sein. Allgemein gilt für Protein-Protein-Wechselwirkungen, daß keine einfache und alles umfassende Charakterisierung der physiko-chemischen Eigenschaften möglich ist. Das sollte ebenso für Antigen-Antikörper-Bindungen gelten, in denen das Antigen ein Protein ist. Trotzdem gibt es einige Eigenschaften in den Bindungsstellen, die in vielen Komplexen vorhanden sind, wie zum Beispiel das häufige Vorkommen der amphipathischen Reste Tyrosin und Tryptophan [38], [125], [126] sowie der Beitrag von Wassermolekülen zur Bindungsenthalpie [127] und zur freien Energie [118]. Ein Beispiel für den Beitrag zur Bindungsentropie liefert die Guppe der zyklischen Harnstoff-Inhibitoren der HIV-Protease [128]. In diesem Fall konnte für die Bindung eine Verbesserung erzielt werden, indem ein Carbonyl-Sauerstoff des Inhibitors ein konserviertes Wassermolekül in der aktiven Tasche der HIV-Protease verdrängt und ersetzt. Diese Strategie, den unvermeidbaren Verlust an Entropie durch Komplexbildung mit dem Entropiegewinn durch Freisetzung von Wassermolekülen aus der Bindungsfläche zu kompensieren, kann auch auf die Antigen-Antikörper-Bindung angewendet werden.

Die Betrachtung des TF·D3H44-Komplexes zeigt, daß 8 Wassermoleküle, die an der freien TF-Struktur gebunden sind, durch Komplexbildung verdrängt und 5 von ihnen durch polare Atome von D3H44 ersetzt wurden, siehe Tabelle 12.2 und Abbildung 12.15. In der Bindungsstelle von D3H44 sind 5 Wassermoleküle durch die Bildung des Komplexes ausgeschlossen worden, wobei für 4 Wassermoleküle die Position im Komplex von polaren TF-Atomen eingenommen wurde. Diese Analyse ergibt für die Komplex-Strukturen Cyt-c·FabE8 und HEL·HyHEL-63 eine ähnliche Anzahl von Wassermolekülen, Tabelle 12.2 und Abbildung 12.15. Auch wenn diese Anzahl an verdrängten Wassermolekülen zunächst klein erscheint, ist sie im Verhältnis zur Gesamtzahl polarer Atome des Bindungspartners in der Kontaktfläche verhältnismäßig groß. Innerhalb eines Abstandes von 5 Å zu D3H44-Atomen sind nur 24 polare Atome von TF zu finden und umgekehrt sind es 30 polare Atome von D3H44, die im Abstand von 5 Å zu TF lokalisiert sind. Daher sollte es möglich sein, durch zielgerichtete Mutagenese des Antikörpers die Wassermoleküle der freien Strukturen zu ersetzen und so die

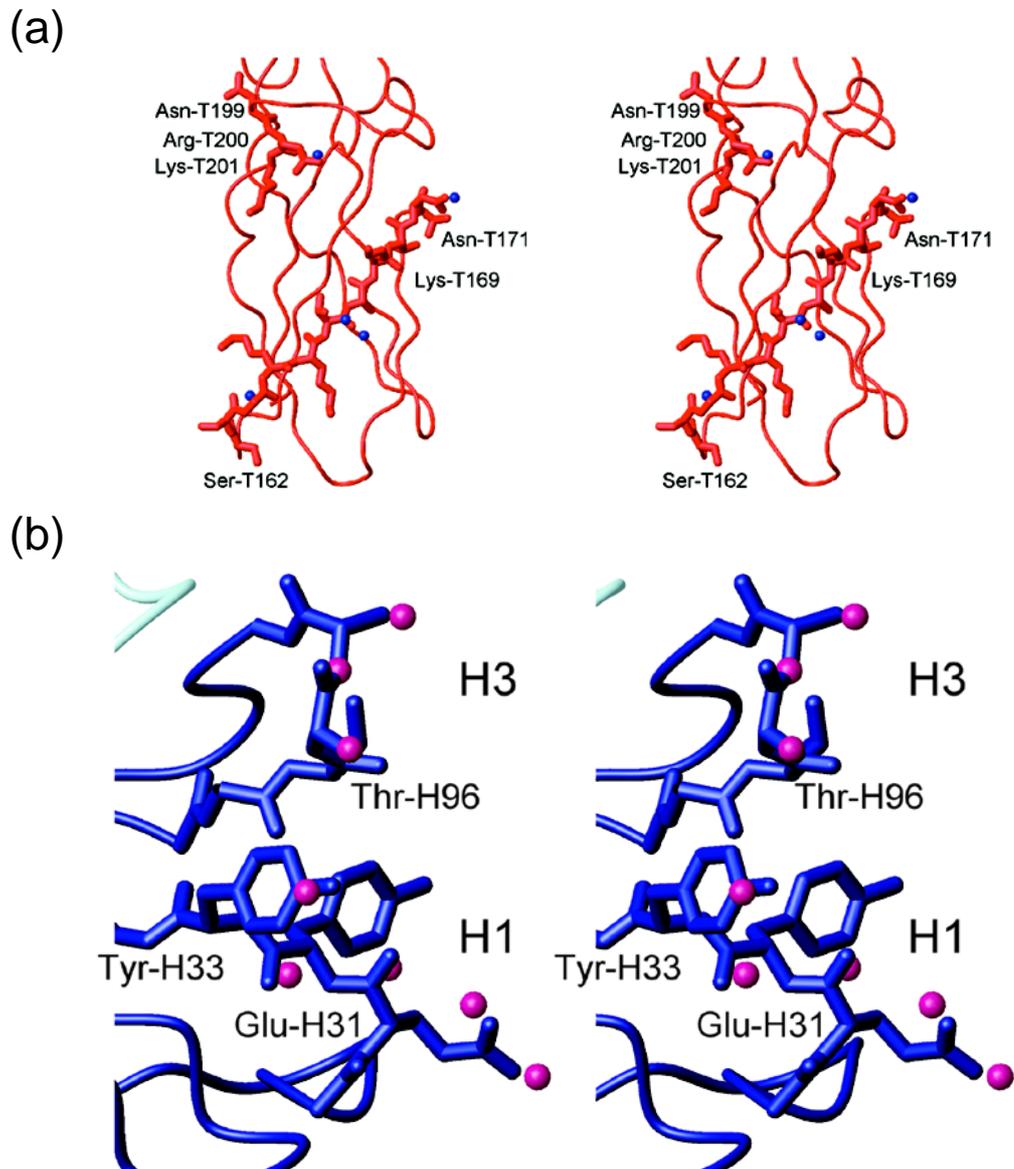


Abbildung 12.15: Stereo–Abbildung von verdrängten Wassermolekülen. (a) Das Epitop von TF in rot zusammen mit verdrängten Wassermolekülen aus der freien D3H44–Struktur (blau). Das Bild zeigt, daß einige der Wassermoleküle der freien D3H44–Struktur im Komplex von polaren TF–Atomen verdrängt werden. (b) zeigt einen Ausschnitt der Antigen–Bindungsstelle von D3H44 in blau. Zusätzlich eingezeichnet sind Wassermoleküle aus der freien TF–Struktur. Auch hier ist zu sehen, daß diese Wasser Ankerpositionen definieren, die von den polaren Atomen des Antikörpers bei Komplexbildung eingenommen werden

Antigen-Bindungsaffinität zu verbessern.

Der gegen VEGF gerichtete optimierte Antikörper FabY0317 zeigt deutlich, daß diese Strategie zum Ziel führt [129]. Der Austausch von His-H97 in der schweren Kette durch Tyrosin führte zu einer 14-fachen Verbesserung der Bindungsaffinität. Der Vergleich der Kristallstrukturen von VEGF·FabY0317 und VEGF·Fab12 zeigt, daß die Hydroxyl-Gruppe von Tyr-H97 in FabY0317 ein Wassermolekül verdrängt [129], [92]. Dieses Wassermolekül bildete Wasserstoffbrücken zu den Seitenketten Gln-79 und Glu-93 in VEGF und zum Imidazolring von His-H97 im Antikörper Fab12. Durch die Mutation His-H97-Tyr vergrößerte sich auch die Kontaktfläche zwischen Antigen und Antikörper um 30 \AA^2 . Diese Mutation wurde nicht durch Analyse von Wassermolekülen rational geplant, sondern war Ergebnis eines *Phage-Display*-Experiments.

In D3H44 gibt es ebenfalls Reste, durch deren Mutation überbrückende Wassermoleküle verdrängt und somit eine Verbesserung der Bindungsaffinität erreicht werden könnte. Beispielsweise könnte Arginin anstelle von Lys-L30 direkt Wasserstoffbrücken zum Sauerstoff der Hauptkette von Lys-T169 ausbilden. Wie oben erwähnt, ist Position L30 in der TF·5G9-Struktur mit einem Arginin besetzt. Der Austausch von Asp-H95 durch Glutaminsäure könnte ebenfalls die Affinität zu TF erhöhen.

Die Bedeutung der Analyse von Wassermolekülen in den Strukturen des freien Antigens und des freien Antikörpers zur Entwicklung von optimierten Antikörpern läßt sich nur durch den experimentellen Beweis bestätigen. Der Vergleich der Kristallstrukturen VEGF·Fab12 und VEGF·FabY0317 zeigt, daß solch eine Strategie erfolgreich sein kann. Allerdings ist die Voraussetzung dafür die Verfügbarkeit hochaufgelöster Kristallstrukturen des Antigen-Antikörper-Komplexes, des freien Antikörpers und des freien Antigens.