

Max-Buchner-Forschungsstiftung

Faltung und Engineering von Antikörpern

- Abschlussbericht –

**Matthias J. Feige und Johannes Buchner,
TU-München, Department Chemie**

I. Hintergrund der Arbeiten

Antikörper stellen das wichtigste Molekül der humoralen Immunabwehr aller Wirbeltiere dar und bilden die Verbindung zur zellulären Immunität. Darüberhinaus haben sich Antikörper als bedeutende Proteine in Forschung, Diagnostik und Therapie etabliert. Nahezu ausschließlich zum Einsatz kommt dabei Immunglobulin G (IgG), der in der höchsten Konzentration aller Antikörperklassen im Blut vorliegende Antikörper. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, stellt IgG ein hochkomplexes Protein dar. Es handelt sich um ein Heterotetramer, zusammengesetzt aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, welches disulfidverbrückt und glykosyliert ist. Jede der schweren Ketten besteht aus drei konstanten (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) sowie einer variablen Domäne (V_H), jede der leichten Ketten aus einer konstanten (C_L) und einer variablen (V_L) Domäne. Die zwei identischen Antigenbindungsstellen (Epitope) werden dabei jeweils von einer V_H und einer V_L Domäne konstituiert. IgG Moleküle sind nicht nur in der Lage, Antigene hochspezifisch zu erkennen sondern führen diese darüber hinaus vielfältigen Effektorfunktionen wie Phagozytose oder Komplementaktivierung zu. Die Aktivierung der Effektorfunktionen ist dabei stets in dem Fc Fragment zu verorten.

Grundlage aller Antikörperfunktionen ist eine definierte dreidimensionale Struktur, welche in einem als Proteinfaltung bezeichneten Vorgang in der Zelle ausgebildet wird. Die ersten beiden Teilprojekte befassten sich mit diesem Faltungsprozess – *in vitro* auf der Basis einer einzelnen, konstanten Antikörperdomäne untersucht. Im dritten Teilprojekt wurde der strukturelle Einfluss der Glykosylierung auf die Struktur des Fc Fragments untersucht.

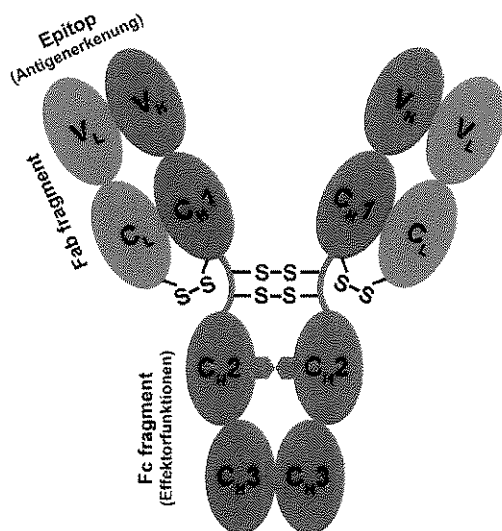


Abbildung 1 – IgG Antikörper. Das IgG Molekül besteht aus zwei schweren (blau) und zwei leichten (grün) über Disulfidbrücken verbundenen Ketten. Die C_{H2} Domäne ist glykosyliert (graues Sechseck). Die Antigenerkennung ist in den zwei identischen Fab Fragmenten lokalisiert, die IgG Effektorfunktionen im Fc Fragment.

II. Teilprojekt I – Einfluss der internen Disulfidbrücke auf den Faltungsweg der C_L Antikörperdomäne

Jede Antikörperdomäne besitzt eine intrinsische Disulfidbrücke, welche senkrecht zu den beiden die Domäne konstituierenden β -Faltblättern angeordnet ist (Abbildung 2).

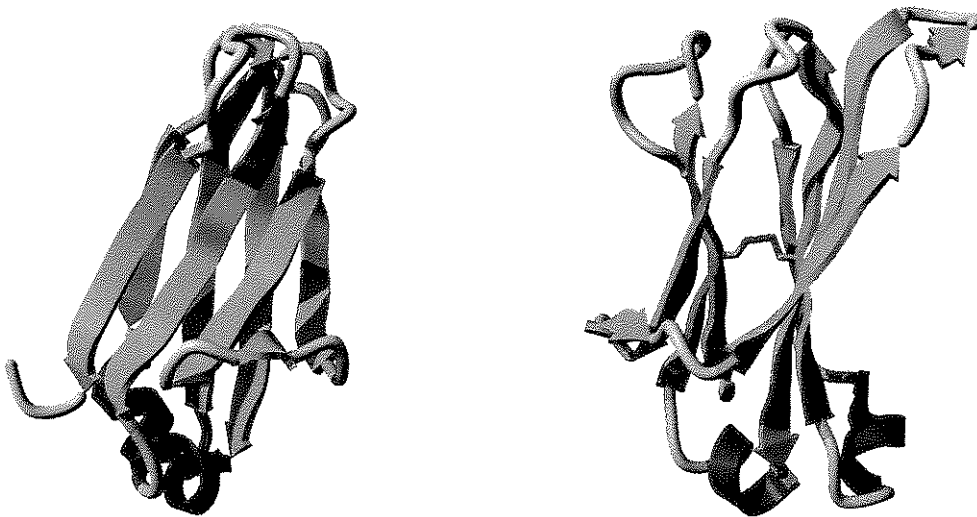


Abbildung 2 – Die murine IgG κ C_L Domäne. Schematische Frontal- und Seitenansicht, die interne Disulfidbrücke ist in gelb dargestellt.

Eine stabilisierende Funktion dieser Disulfidbrücke wurde bereits vielfach in der Literatur beschrieben, jedoch existierten im Vorfeld zu unseren Arbeiten nahezu keine Einblicke, ob und inwiefern die evolutionär konservierte Disulfidbrücke den Faltungsweg einer Antikörperdomäne beeinflusst. Um dieses zu untersuchen, wurde die C_L Domäne gewählt, welche das in allen Antikörperklassen am höchsten konservierte Element darstellt. In unseren Arbeiten konnten wir zeigen, dass die Disulfidbrücke strukturell nur einen geringen Einfluss auf die C_L Domäne ausübt, ihre Anwesenheit jedoch, wie erwartet, die C_L Domäne stabilisiert. Der Hauptaugenmerk der Arbeit lag jedoch auf dem kompletten Faltungsmechanismus der Domäne in An- und Abwesenheit der intrinsischen Disulfidbrücke. Wir konnten zeigen, dass in der Tat eine Beeinflussung des gesamten Strukturierungsprozesses mit der Reduktion der Disulfidbrücke einhergeht. In ihrer Anwesenheit faltet die C_L Domäne über ein hochstrukturiertes Intermediat auf zwei parallelen Faltungswegen, abhängig von dem Isomerisierungszustand eines Prolinrestes. In Ihrer Abwesenheit hingegen populiert

die C_L Domäne ein fehlgefaltetes Intermediat, welches nicht produktiv für die Gesamtreaktion ist und zur Aggregation neigt. Das ermittelte Faltungsschema ist in Abbildung 3 dargestellt. Die neu gewonnenen Erkenntnisse zeigen eine bis dato unbekannte wichtige Rolle für die interne Disulfidbrücke in Ig Domänen: Sie stabilisiert nicht nur den nativen Zustand sondern ist gleichzeitig eine Grundlage der effizienten Faltungsreaktion einer Antikörperdomäne.

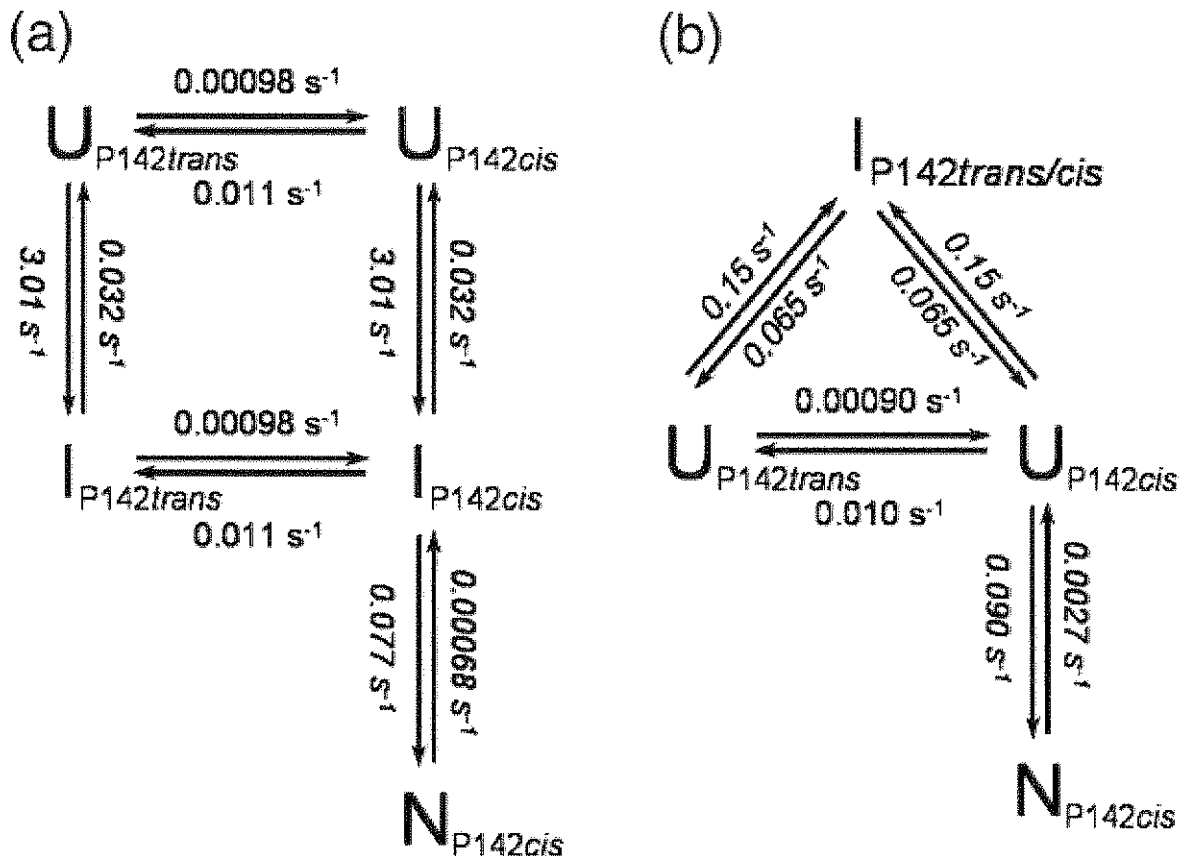


Abbildung 3 – Faltungsweg der C_L Domäne. Die oxidierte C_L Domäne (a) faltet über ein on-pathway Intermediat, wohingegen die reduzierte C_L Domäne ein fehlgefaltetes off-pathway Intermediat populierte. Die Isomerisierung des Pro142 Rests ist für einen Großteil der C_L Moleküle der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

III. Teilprojekt II – Der atomar aufgelöste Faltungsweg der C_L Domäne und die Implikationen für Fehlfaltungskrankheiten

Fehlfaltungskrankheiten wie beispielsweise Alzheimer sind in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt, aufgrund ihrer zunehmenden Prävalenz in einer alternden Bevölkerung. Ein weiteres Beispiel stellt die DLA (dialysis related amyloidosis) dar, welche auf β_2 -Mikroglobulin Ablagerungen zurückzuführen ist und bei Dialysepatienten auftritt. Neue Einsichten in die molekularen Ursachen dieser Krankheit konnten wir mit unseren Arbeiten über die Faltung der C_L Domäne gewinnen, welche zur gleichen Strukturklasse wie β_2 -Mikroglobulin gehört, der so genannten Ig-Superfamilie. NMR-spektroskopische Untersuchungen erlaubten die Charakterisierung des in vorherigen Studien (siehe II.) identifizierten Faltungsintermediats mit nahezu atomarer Auflösung. Diese zeigten, dass zwei kleine helikale Elemente in der C_L Domäne bereits im Intermediat hochstrukturiert vorliegen (Abbildung 4). Für diese kann folglich eine unterstützende Funktion bei dem Erreichen der nativen Struktur postuliert werden. Experimente, bei denen diese Elemente in β_2 -Mikroglobulin transplantiert wurden, zeigten eine dramatische Reduktion der Fehlfaltungstendenz dieses Proteins. Es konnten somit zuvor nicht erkannte, konservierte Elemente innerhalb von Antikörperdomänen als relevant für deren robuste Faltungseigenschaften identifiziert werden.



Abbildung 4 – Strukturelle Charakterisierung des C_L Faltungsintermediats. Die Farbgebung beschreibt den Grad der Strukturierung im Faltungsintermediat und ist besonders hoch in den zwei kleinen helikalen Elementen an der Basis der Domäne.

IV. Teilprojekt III – Die Kristallstruktur des unglykosylierten IgG Fc Fragments und deren Implikationen für IgG Effektorfunktionen

Ein wesentlicher Einfluss der Glykosylierung der C_H2 Domäne auf alle Effektorfunktionen des Fc Fragments ist schon seit einigen Jahren Kenntnisstand der molekularen Immunologie. Mit zunehmender Verkürzung des komplexen, zweiästigen Oligosaccharids wurde eine geringere Affinität für Fc-Rezeptoren beobachtet und Kristallstrukturen partiell deglykosylierter Fc Fragmente legten eine Kompaktierung des Fc Fragments als strukturelle Erklärung nahe. Komplette Deglykosylierung führt zu komplettem Verlust der Effektorfunktionen. Für diesen dramatischen Effekt fehlte bislang noch eine strukturelle Erklärung. Wir konnten innerhalb dieses Projekts die Struktur des bakteriellen, rekombinanten und damit unglykosylierten Fc Fragments aufklären und dadurch diese Lücke schließen. Es zeigte sich eine äußerst starke Kompaktierung des unglykosylierten Fc Fragments sowie eine erhöhte Flexibilität einiger C_H2 loops (Abbildung 5) im Vergleich zu bekannten Strukturen glykosylierter Fc Fragmente. Zusammengenommen liefern die Daten eine strukturelle Erklärung für die fehlende Rezeptorbindung sowie das Fehlen anderer Effektorfunktionen des komplett deglykosylierten Fc Fragments.

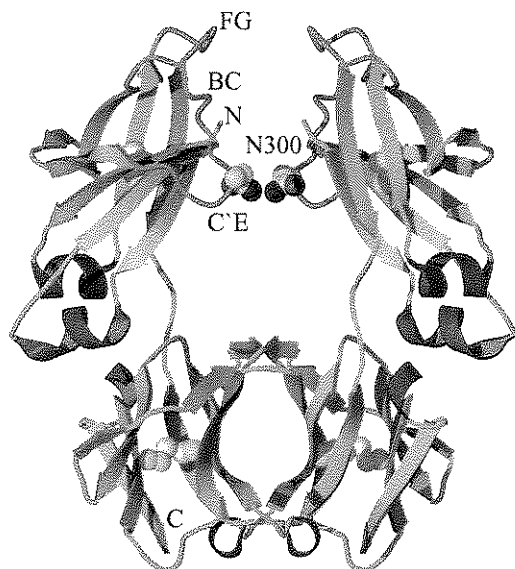


Abbildung 5 – Unglykosyliertes murines IgG Fc Fragment. Flexible loops der zuckerfreien C_H2 Domäne sind türkis dargestellt. Die Bezeichnung richtet sich nach den sieben β -Faltblattsträngen der C_H2 Domäne – ABCC'EFG Die normalerweise glykosylierte Aminosäure, Asn300, ist weit nach innen versetzt gegenüber glykosylierten Fc Fragmenten und spiegelt die starke Kompaktierung wider.

V. Zusammenfassung der Arbeiten

Zwei wesentliche Schwerpunkte wurden innerhalb der durch die Max-Buchner-Forschungsstiftung geförderten Arbeitsperiode angegangen.

Zum einen konnten fundamentale neue Einsichten in den Faltungsprozess der C_L Domäne gewonnen werden. Eine wichtige Rolle der internen Disulfidbrücke sowie kleiner helikaler Elemente, zuvor in dieser Rolle uncharakterisiert, konnten beschrieben werden. Neue Einsichten nicht nur in die Antikörperfaltung sondern auch in die Fehlfaltung anderer Mitglieder der Ig-Superfamilie waren das Ergebnis.

Zum anderen konnten wir durch die Aufklärung der Kristallstruktur des unglykosylierten Fc Fragments eine wichtige Lücke in der Korrelation zwischen Fc Glykosylierung und Fc Effektorfunktionen schließen.

Beide Teilbereiche lieferten nicht nur neue Einsichten auf der Ebene der Grundlagenforschung sondern sind darüber hinaus von großem Interesse für die zielgerichtete Optimierung von Antikörpermolekülen für diagnostische und therapeutische Anwendungen. Drei wissenschaftliche Publikationen sind aus der Arbeit in der durch die Max-Buchner-Forschungsstiftung geförderten Periode hervorgegangen:

1. Influence of the internal disulfide bridge on the folding pathway of the C_L antibody domain. Feige MJ, Hagn F, Esser J, Kessler H, Buchner J. J Mol Biol. 2007 Jan 26;365(4):1232-44.
2. The structure of a folding intermediate provides insight into differences in immunoglobulin amyloidogenicity. Feige MJ, Groscurth S, Marcinowski M, Yew ZT, Truffault V, Paci E, Kessler H, Buchner J. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 9;105(36):13373-8.
3. Structure and stability of the murine unglycosylated Fc fragment. *Manuscript in preparation.*