

# Modellierung der Adsorption von Proteinen an Oberflächen

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik  
der Universität Stuttgart zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

**Alexander Patrick Steudle**

aus Pforzheim

Hauptberichter: Prof. Dr. Jürgen Pleiss  
Mitberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid  
Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2009

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart  
2009



# Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid, MBA für die Möglichkeit meine Arbeit an seinem Institut unter ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und großer Gestaltungsfreiheit durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Pleiss danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas, die wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die bei der Bearbeitung des Themas überlassenen Freiheiten.

Herrn Prof. Dr. Roland Kontermann danke ich für die Bereitschaft den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Ich danke Herrn Dr. Alexander Faude für seine Unterstützung bei der Messung der Retentionsdaten.

Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Technische Biochemie für das angenehme Arbeitsklima sowie der großen Hilfsbereitschaft, speziell in der Arbeitsgruppe Bioinformatik. Zu erwähnen sind hier insbesondere Frau Dipl. Bioinf. Demet Sirim, Herr Dipl. Bioinf. Sascha Rehm, Herr Dipl. Biol. (t.o.) Michael Widmann und Herr Thomas Hamm. Unvergessen werden die vielen gemeinsamen Unternehmungen und Erlebnisse mit den ehemaligen Kollegen des Ältestenrates bleiben: Herr Dr. Fabian Bös, Herr Dr. Michael Knoll, Herr Dr. Stephan Tatzel und Herr Dr. Peter Trodler.

Ich danke herzlich meiner Freundin Silvana für ihre Unterstützung und Geduld sowie meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir stets gegeben haben.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Finanzierung des Projekts.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Vorbemerkungen und Abkürzungen</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Kurzzusammenfassung</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Abstract</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>Einleitung</b>	<b>17</b>
4.1	Bereiche der Proteinadsorption . . . . .	17
4.2	Proteinaufreinigung . . . . .	18
4.2.1	Allgemeines . . . . .	18
4.2.2	Prinzip der Chromatografie . . . . .	18
4.2.3	Kenngößen in der Chromatografie . . . . .	19
4.2.4	Einflussgrößen bei der Adsorption von Proteinen . . . . .	20
4.3	Chromatografische Methoden . . . . .	23
4.3.1	Proteinadsorption in der Ionenaustauschchromatografie . . . . .	23
4.3.2	Hydrophobe Interaktionschromatografie . . . . .	24
4.3.3	Porenstruktur chromatografischer Adsorptionsmaterialien . . . . .	25
4.4	Verwendete Proteine . . . . .	28
4.4.1	Lysozym . . . . .	28
4.4.2	Cytochrom P450-BM3 Monooxygenase . . . . .	31
4.4.3	Antikörper . . . . .	34
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
5.1	<i>Ab initio</i> -Parametrisierung von Liganden . . . . .	39
5.1.1	Parametrisierung von Anionenaustauscherliganden . . . . .	39
5.1.2	Parametrisierung von Kationenaustauscherliganden . . . . .	44
5.2	Wechselwirkungen von Lysozym mit Kationenaustauschern . . . . .	46
5.2.1	Berechnung des elektrostatischen Potentials von Lysozym und Einteilung der Oberfläche in positive <i>patches</i> . . . . .	47

5.2.2	Berechnung der bevorzugten Orientierung von Lysozym auf Kationenaustauschern über elektrostatische Bindungsenergien (starre Methode) . . . . .	47
5.2.3	Simulation der Bindung von Lysozym an einen Kationenaustauscher (flexibles Modell) . . . . .	53
5.3	Wechselwirkungen von Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit Anionenaustauschern . . . . .	59
5.3.1	Modellierung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit <i>linker</i> . . . . .	59
5.3.2	Simulation der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit <i>linker</i> . . . . .	61
5.3.3	Berechnung der Titrationskurve und der Protonierungszustände . . . . .	63
5.3.4	Berechnung der bevorzugten Orientierung der P450-BM3-Hämdomäne auf einem Anionenaustauscher über elektrostatische Bindungsenergien . . . . .	64
5.3.5	MD-Simulationen der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne und verschiedenen Anionenaustauschern . . . . .	65
5.3.6	Berechnung der Bindungsenergien mittels GBSA ( <i>generalized Born/surface area</i> ) und Vergleich mit experimentellen Werten . . . . .	71
5.4	Wechselwirkung von IgG1-Antikörpern mit Kationenaustauschern . . . . .	76
5.4.1	Modellierung von IgG1-Antikörpern . . . . .	76
5.4.2	MD-Simulation von IgG1-Antikörpern . . . . .	80
5.4.3	Berechnung der bevorzugten Orientierung von IgG1-Antikörpern auf Kationenaustauschern über elektrostatische Bindungsenergien . . . . .	86
5.5	Vorhersage von Retentionszeiten in der hydrophoben Interaktionschromatografie mittels Berechnung des hydrophoben Interaktionsfelds . . . . .	88
5.5.1	Korrelation bestehender dimensionsloser Retentionszeiten von Proteinen bei der hydrophoben Interaktionschromatografie . . . . .	88
5.5.2	Korrelation experimentell gemessener Retentionszeiten bei der hydrophoben Interaktionschromatografie . . . . .	89
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
6.1	Untersuchungen zur Vorhersage von Wechselwirkungen von Proteinen mit Ionenaustauschern . . . . .	93
6.1.1	Untersuchungen zur Wechselwirkung von Lysozym mit Kationenaustauschern . . . . .	93

6.1.2	Untersuchungen zur Wechselwirkung von Lysozym mit Kationenaustauschern über Orientierungsbestimmung mittels elektrostatischer Bindungsenergien (starre Methode) . . . . .	94
6.1.3	Untersuchungen zur Wechselwirkung von Lysozym mit Kationenaustauschern mittels MD-Simulationen (flexible Methode) . . . . .	96
6.1.4	Vergleich der Orientierungsbestimmung über elektrostatische Bindungsenergien mit MD-Simulationen . . . . .	98
6.2	Untersuchungen zur Wechselwirkung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit Anionenaustauschern . . . . .	99
6.2.1	Modellierung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne und MD-Simulation des <i>linker</i> -Bereichs . . . . .	99
6.2.2	Untersuchungen zur Wechselwirkung von CYP mit Anionenaustauschern über Orientierungsbestimmung durch elektrostatische Bindungsenergien (starre Methode) . . . . .	99
6.2.3	Untersuchungen zur Wechselwirkung von CYP mit Anionenaustauschern über Orientierungsbestimmung durch MD-Simulationen (flexible Methode) . . . . .	100
6.2.4	Vergleich der Orientierungsbestimmung über elektrostatische Bindungsenergien mit MD-Simulationen für CYP . . . . .	100
6.2.5	Vergleich der Orientierungsbestimmung von CYP und Lysozym über elektrostatische Bindungsenergien mit MD-Simulationen . . . . .	101
6.3	Untersuchung der Bindungsstärke der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit Anionenaustauschern bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen . . . . .	102
6.4	Parametrisierung von Ionenaustauscherliganden . . . . .	103
6.5	Modellierung der Adsorberoberfläche . . . . .	103
6.6	Untersuchungen zur Wechselwirkung von Antikörpern . . . . .	104
6.6.1	Simulation von vollständigen Antikörpern und Auswirkungen der Glykosylierung . . . . .	104
6.6.2	Untersuchung zur Wechselwirkung von IgG1-Antikörpern mit Kationenaustauschern . . . . .	106
6.7	Vorhersage von Retentionszeiten in der hydrophoben Interaktionschromatografie mittels Berechnung des hydrophoben Interaktionsfelds . . . . .	107
6.8	Ausblick . . . . .	108

<b>7</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>111</b>
7.1	Theoretische Arbeiten . . . . .	111
7.1.1	Verwendete Software . . . . .	111
7.1.2	Eingesetzte Hardware . . . . .	112
7.1.3	Suche nach homologen Sequenzen (BLAST) . . . . .	112
7.1.4	Homologiemodellierung . . . . .	112
7.1.5	Berechnung des elektrostatischen Potentials . . . . .	113
7.1.6	Bestimmung der $pK_a$ -Werte . . . . .	115
7.1.7	Überlagerung der PDB-Strukturen von Lysozym . . . . .	115
7.1.8	Bestimmung der bevorzugten Orientierung von Lysozym über einer negativ geladenen Fläche . . . . .	115
7.1.9	Bestimmung der bevorzugten Orientierung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne über einer positiv geladenen Fläche . . . . .	118
7.1.10	Bestimmung der bevorzugten Orientierung von Antikörpern über einer negativ geladenen Fläche . . . . .	118
7.1.11	Molekulardynamische Simulationen . . . . .	118
7.1.12	Parametrisierung der Liganden . . . . .	122
7.1.13	MD-Simulationen . . . . .	126
7.1.14	Bestimmung der Orientierung des Proteins während des Bindungsvorgangs bei MD-Simulationen . . . . .	128
7.1.15	Bestimmung der Orientierung beim globalen Minimum, der Richtung des mittleren energiegewichteten Moments und der experimentellen Ausrichtung von Lysozym . . . . .	130
7.1.16	Berechnung des hydrophoben Interaktionsvolumens und der SAS . . . . .	130
7.2	Experimentelle Arbeiten . . . . .	131
7.2.1	Verwendete Materialien und Geräte . . . . .	131
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>133</b>
8.1	Abstand von Lysozym zur Ionenaustauscheroberfläche während der MD-Simulationen . . . . .	134
8.2	Orientierungsänderung bei wiederholten Simulationen von Lysozym mit Struktur II . . . . .	142
8.3	Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den positiv geladenen Aminosäuren von Lysozym und der Adsorberoberfläche . . . . .	150
8.4	Retentionen der HIC-Experimente . . . . .	151



8.5	Abstand der P450-BM3-Hämdomäne zur Ionenaustauscheroberfläche während der MD-Simulationen . . . . .	153
8.6	Orientierung des C-Terminus von Lysozym bei verschiedenen PDB-Einträgen	154



# 1 Vorbemerkungen und Abkürzungen

Aus dem englischen Sprachgebrauch stammende Fachbegriffe, deren Übersetzung entweder keinen Sinn ergeben oder zu einem falschen Verständnis geführt hätten, wurden im Text kursiv dargestellt.

$\mu$	Mikro
$\mu\text{l}$	Mikroliter
Å	Angström
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cm	Zentimeter
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase
D	Debye
DEAE	Diethylaminoethyl
DRT	Dimensionslose Retentionszeit
$\epsilon$	Dielektrizitätskonstante
FAB	<i>Fragment, antigen binding</i>
FC	<i>Fragment, crystallizable</i>
FDBP	Finite-Differenzen Poisson-Boltzmann Methode
FMN	Flavin Mononukleotid
g	Gramm
GBSA	<i>generalized Born/surface area</i>
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
H.Vol	Hydrophobes Volumen
IgG1	Immunoglobulin gamma 1
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
l	Liter

## 1 Vorbemerkungen und Abkürzungen

pI	isoelektrischer Punkt
m	Milli
M	Mol pro Liter
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation-time Of flight</i>
MCCE	<i>Multi-Conformation Continuum Electrostatics</i>
MD	Molekulardynamik
N-Terminus	Amino-Terminus
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
QAE	<i>quaternary aminoethyl</i>
s	Sekunde
SAS	<i>solvent accessible surface</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RESP	<i>restrained electrostatic potential</i>
T	Temperatur
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel

## 2 Kurzzusammenfassung

Die Adsorption von Proteinen an Oberflächen ist ein äußerst komplexer Prozess, der in vielen Bereichen, wie der Medizin, Pharmazie, Nanotechnologie und Biotechnologie, von großer Bedeutung ist. In der vorliegenden Arbeit wurden computergestützte Methoden zur Vorhersage der Orientierung und des Bindungsverhaltens von Proteinen bei der Adsorption entwickelt. Die Arbeit konzentrierte sich hierbei auf die Gebiete der Ionenaustauschchromatografie, der hydrophoben Interaktionschromatografie und der Immobilisierung. Als untersuchte Proteine wurden Hühnereiweiß-Lysozym, die Häm-domäne der bakteriellen Cytochrom P450-BM3 Monooxygenase und humane monoklonale Antikörper verwendet. Lysozym gehört zu den am besten charakterisierten und meisten analytisch verwendeten Proteinen, da es billig und in großen Mengen hergestellt werden kann. Viele bisherige Untersuchungen wurden mit Lysozym durchgeführt und die adsorbierte Orientierung auf Kationenaustauschern konnte experimentell bestimmt werden. Der Adsorptionsvorgang von Cytochrom P450-BM3 ist von Interesse bei Immobilisierungen, welche zu verbesserten Eigenschaften bei Betrieb und Lagerung sowie zu einer einfachen Separation des Produkts führen. Wichtig ist hierbei eine Orientierung des Enzyms mit freiliegendem Substratzugang. Auch bei der Bindung auf beschichteten Elektroden, durch welche sich die Möglichkeit der Entwicklung analytischer und biokatalytischer Anwendungen sowie eine einfache und billige Elektronenquelle ergibt, ist die Orientierung wichtig. Ebenso wie der Substratzugang ist hier die korrekte Orientierung des elektronenakzeptierenden Bereichs wichtig, da dieser mit der Elektrodenoberfläche in Kontakt stehen sollte. Antikörper gehören zu den am häufigsten eingesetzten therapeutischen Proteinen. Ihre Produktion ist teuer, da sie meist über Protein A aufgereinigt werden. Es besteht großes Interesse an billigeren alternativen Verfahren, wie der Ionenaustauschchromatografie. Früher wurden Adsorptionsprozesse meist mit vereinfachten Modellen eines Proteins, beispielweise als kugelförmiges Gebilde, modelliert. Durch die zunehmende Aufklärung der Proteinstrukturen in atomarer Auflösung wurden auch weiter entwickelte Adsorptionsmodelle erstellt, jedoch wurden Proteine dabei meist als unflexible Objekte modelliert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch ein unflexibles Modell des Proteins, abhängig von der verwendeten Struktur und dem Abstand zur Oberfläche, bei der Modellierung

## 2 Kurzzusammenfassung

von Adsorptionen zu Abweichungen von der experimentell bestimmten Orientierung kommen kann. Eine grobe Abschätzung der Bindungsorientierung ist bei einem kurzen Abstand aber noch möglich. Durch multiple Molekulardynamische Simulationen (MD-Simulationen), in welchen das Protein frei und flexibel an die Oberfläche binden konnte, hat sich am Beispiel Lysozym gezeigt, dass der Mittelwert der festgestellten gebundenen Orientierungen mit der experimentell bestimmten Orientierung, unabhängig von der zu Beginn verwendeten Proteinstruktur, übereinstimmte.

Im Vergleich zeigten verschiedenen Proteine auch ein unterschiedliches Bindungsverhalten. Während bei Lysozym die Simulationen über einer negativ geladenen Oberfläche nur ein ähnliches Bindungsverhalten mit ähnlichen Bindungsorientierungen zeigte, erfolgte die Bindung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne auf einer positiv geladenen Oberfläche aufgrund ihres starken Dipolmoments immer in gleicher Weise und mit gleicher Orientierung. Die Orientierung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne in der frühen Phase der Bindung konnte auch mittels der rigiden Bestimmungsmethode festgestellt werden. Ein Kippen der kompletten Proteinstruktur nach dem ersten Kontakt zur Oberfläche wurde jedoch nur mittels MD-Simulationen vorhergesagt. Es konnte am Modell gezeigt werden, dass die adsorbierte Orientierung auf einer positiv geladenen Oberfläche zu einer Beeinträchtigung des Substratzugangs führt und, im Falle der Immobilisierung auf einer positiv geladenen Adsorberoberfläche, welche beispielsweise bei beschichteten Elektroden eingesetzt wird, eine ungünstige Ausgangsorientierung für die Elektronenübertragung vorliegt.

Mittels MD-Simulationen der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne über verschiedenen Anionenaustauscherliganden konnte eine Korrelation der Bindungsenergien bei verschiedenen Salzkonzentrationen mit experimentell gemessenen chromatografischen Daten bestimmt werden.

MD-Simulationen mit Antikörper waren durch die rechenintensiven, langreichweitigen Wechselwirkungen zwischen Adsorber und Protein im Rahmen der zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten nicht durchführbar. Es konnten dennoch die Regionen, die bei der Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatografie Einfluss auf die Retention nehmen und somit für eine Optimierung des Proteins für den Aufreinigungsprozess infrage kommen, beispielsweise durch gezielte Mutationen in diesem Bereich, an der Proteinoberfläche mittels eines starren Modells bestimmt werden.

### 3 Abstract

The adsorption of proteins at surfaces is a very complex process. It is of great importance in different fields like medicine, pharmacy, nanotechnology and biotechnology. In the present paper computer aided methods for predicting the orientation and binding behavior of proteins during adsorption processes have been developed. It is focused on the areas of ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography, and immobilization. The proteins hen egg white lysozyme, cytochrome P450-BM3-heme domain, and monoclonal antibodies were analyzed. Lysozyme is one of the best characterized and most analyzed proteins because its low costs and availability in huge amounts. Many previous analyses have been made using lysozyme and it was possible to obtain an adsorbed orientation on a cation exchanger experimentally. The adsorption process of cytochrome P450-BM3 is of great interest in the area of immobilization, especially on electric surfaces which offer the possibility of developing analytical and biocatalytic applications. The correct orientation is of great importance on a cathode surface as the substrate channel has to be accessible and the electron accepting area should be in contact with the surface. Antibodies belong to the most applied therapeutic proteins. The production is extremely expensive as purification is done via protein A. The interest in cheap alternative processes like ion exchange chromatography is given.

In former times adsorption processes were modelled by simplified protein models, for example spherical shapes. With the increasing number of solved protein structures in atomic resolution further developed models of adsorption processes have been established, though proteins have only been treated rigidly, so far.

In this paper it could be shown that the use of rigidly treated proteins may lead deviations of the experimentally determined orientation depending on structure and distance to the surface. By the use of MD-simulations in which the protein was able to bind free and flexible to the surface the example of lysozyme showed that slight changes of the protein structure during the adsorption process may lead to different orientations on the adsorber. The average of all simulated orientations equalled the experimentally determined orientation independent of the used protein structure.

The used proteins showed a very different binding behavior in comparison. The cytochrome

### 3 Abstract

P450-BM3 heme domain bound in an identical orientation on positively charged surfaces in all simulations due to its strong dipole moment. It was also possible to obtain this orientation by rigid modelling methods. However, an additional tilting at the surface could only be shown by MD-simulations. It was demonstrated that the adsorbed orientation at positive charged surfaces leads to a covering of the substrate channel. The immobilization on positive charged surfaces which are used for enzyme coated cathodes leads to a disadvantageous arrangement of the electron accepting area on the surface. Additionally, a correlation was found between the computed binding energies and experimentally determined chromatographic retentions at different salt concentrations.

MD-Simulations of antibodies with long-range interactions are too time consuming at the moment. Nevertheless, it could be shown by rigid orientation detection methods which regions of the protein surface have influence at purification processes and could be relevant for an optimization.



# 4 Einleitung

Die Vorgänge bei der Bindung von Proteinen an Oberflächen spielen eine zentrale Rolle bei chromatografischen Adsorptionen und Immobilisierungen. Die Interaktion wird von der Summe von molekularen Einflüssen wie zum Beispiel elektrostatischen Kräften, Van-der-Waals-Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Interaktionen gesteuert. Im Folgenden werden die Grundlagen dieser Arbeit beschrieben. Neben einer allgemeinen Einführung zu den biochemischen Eigenschaften, Funktionen und Vorkommen der verwendeten Proteine Lysozym, Cytochrom P450 und IgG1-Antikörper wird eine Einführung zur Adsorption von Proteinen an Oberflächen und ein Einblick in die untersuchten chromatografischen Verfahren und Messmethoden gegeben.

## 4.1 Bereiche der Proteinadsorption

Die Adsorption von Proteinen an Oberflächen ist von großer Bedeutung bei verschiedenen Anwendungen und Bereichen wie z. B. der Medizin, Pharmazie, Nanotechnologie und Biotechnologie. Bei medizinischen Applikationen sind Erkenntnisse über das Kontaktverhalten zwischen Protein und Materialoberflächen überall dort von Interesse, wo Festkörperoberflächen biokompatibel gestaltet werden müssen, wie beispielsweise bei Implantaten [207]. Die Proteinadsorption an Glasoberflächen, z. B. die Blutgerinnung durch den Kontakt von Plasmaproteinen an der Wand von medizinischen Geräten soll möglichst vermieden werden [139]. Auch diagnostische Geräte wie Sensoren und Glasfasern, wie z. B. bei endoskopischen Eingriffen verwendet, sind davon betroffen. Unerwünschte Proteinadsorptionen sind auch an bakteriellen Plaquebildungen auf Zähnen beteiligt [27], bei der Beeinträchtigung von Kontaktlinsen durch Proteine der Tränenflüssigkeit [89], Verstopfung von Filtrationsmembranen [16] oder bei der bakteriellen Verschmutzung von Schiffsrümpfen [75]. In der Nanotechnologie müssen zum einen oft Oberflächen gegen eine unerwünschte Adsorption von Biomolekülen geschützt werden, zum anderen sollen spezifische Biomoleküle an Sensoroberflächen immobilisiert werden, um dort als molekulare Erkennungsstellen zu fungieren [102]. Die Immobilisierung von Enzymen ist auch im biotechnologischen Bereich für Katalyseprozesse im industriellen Maßstab

außerordentlich interessant [184]. Hier dargelegt sind nur einige Beispiele aus einer großen Masse von Anwendungsgebieten. Die Adsorption von Proteinen an Oberflächen spielt auch in der Chromatografie, welche zur Trennung und Aufreinigung eingesetzt wird, eine entscheidende Rolle und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit mittels rechnergestützter Methoden genauer untersucht.

## 4.2 Proteinaufreinigung

### 4.2.1 Allgemeines

Die Proteinaufreinigung beinhaltet eine Reihe von Prozessen, die dazu dienen ein einzelnes Protein aus einem komplexen Gemisch zu trennen. Das aufgereinigte Protein wird zum einen für wissenschaftliche Belange, wie Charakterisierung von Funktionen, Struktur und Interaktionen mit anderen Molekülen benötigt. Zum anderen liegt die große Bedeutung in der großtechnischen Gewinnung therapeutischer biologischer Präparate, wie z. B. monoklonale Antikörper, Insulin, Cytokine oder Fibrinolytika [171], welche höchste Anforderungen an Reinheit erfüllen müssen. Das Verfahren der Bioseparation kann hierfür in vier Schritte aufgeteilt werden: Beseitigung der unlöslichen Bestandteile, Isolierung (Auftrennung), Aufreinigung und *polishing*. Ein typischer Ablauf beinhaltet dabei Schritte wie Zellyse, Zentrifugation, Filtration, Membranseparation, Ausfällung und Chromatografie.

### 4.2.2 Prinzip der Chromatografie

In der Chromatografie wird ein Stoffgemisch mittels unterschiedlicher Verteilung der Komponenten zwischen der stationären und mobilen Phase aufgetrennt. Die mobile Phase bezeichnet das bewegliche Stoffgemisch, welches aufgetrennt werden soll (Adsorbent). Die stationäre Phase bezeichnet im Gegensatz dazu die unbewegliche Phase (Adsorber), mit der die Substanzen des Stoffgemisches Wechselwirkungen eingehen. Sie besteht typischerweise aus porösem Material mit einer inneren Oberfläche, welche spezielle Eigenschaften besitzt, um Interaktionen mit den gelösten Stoffen ausbilden zu können. Bei allen chromatografischen Trennmethode wird das zu untersuchende Substanzgemisch in einer flüssigen oder gasförmigen mobilen Phase gelöst. Über das Prinzip dieser Interaktionen, durch welche die Aufreinigung vollzogen wird, können die chromatografischen Verfahren unterteilt werden. Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten flüssigen Säulenchromatografie stehen folgende Interaktionsprinzipien im Vordergrund:

- Die Ionenaustauschchromatografie wirkt über elektrostatische Interaktionen zwischen Proteinen und geladenen funktionellen Gruppen auf dem Adsorber. Diese können mittels pH- und Salzkonzentration der mobilen Phase beeinflusst werden, um eine möglichst hohe Selektivität zu erreichen.
- Bei der Affinitätschromatografie werden für das zu bindende Protein spezifische immobilisierte Liganden eingesetzt. Es handelt sich hierbei um eine äußerst selektive Methode.
- Werden hydrophobe Interaktionen als Basis für die Trennung verwendet, so spricht man von hydrophober Interaktionschromatografie (HIC). Die Bindung hydrophober Proteine an die Säulenmatrix wird durch die Zugabe von Salzen zum Chromatografie-Puffer noch verstärkt, weshalb meist die bei hoher Salzkonzentration gebundenen Proteine bei einem absteigenden Salzgradienten eluiert werden.
- Bei der *size exclusion chromatography* (Größenausschlusschromatografie) werden poröse Partikel als stationäre Phase eingesetzt. Kleine Moleküle können tiefer eindringen und benötigen deshalb mehr Zeit zum Passieren des Materials.

### 4.2.3 Kenngrößen in der Chromatografie

Um die Trennung der Komponenten nach dem Verlassen der Trennsäule beurteilen zu können, wird die mobile Phase mittels eines Detektors überprüft und die Komponenten aufgrund ihrer physikalischen oder chemischen Eigenschaften als *peaks* innerhalb des gesamten Chromatogramms erfasst. Hieraus können verschiedene qualitative und quantitative Informationen über das getrennte Stoffgemisch entnommen werden (Abbildung 4.1):

- Die Fläche unterhalb des *peaks*, sowie oft die Höhe  $h$  über der Basislinie sind proportional zur Menge der gemessenen Komponente und können unter der Verwendung eines kalibrierten Detektors bestimmt werden.
- Die Bruttoretentionszeit  $t_i$  einer Substanz  $i$  ist die Zeit, welcher von der Probenaufgabe zum Zeitpunkt  $t=0$  bis zur Detektion des Peakmaximums verstreicht. Diese qualitative Information kann zur Identifikation einer Substanz verwendet werden.
- Die Durchflusszeit  $t_0$  („Totzeit“) entspricht der Retentionszeit, die eine nicht zurückgehaltene Substanz benötigt.

## 4 Einleitung

- Die Netto-Retentionszeit  $t'$  ist die Differenz aus Bruttoretentions-  $t_i$  und Totzeit  $t_0$ . Sie zeigt die Aufenthaltszeit der Komponenten ausschließlich innerhalb der stationären Phase an.
- Die Basispeakbreite  $w$  und Peak-Halbwertbreite  $w_{1/2}$  dienen zur Berechnung von weiteren Chromatografiekenngößen.

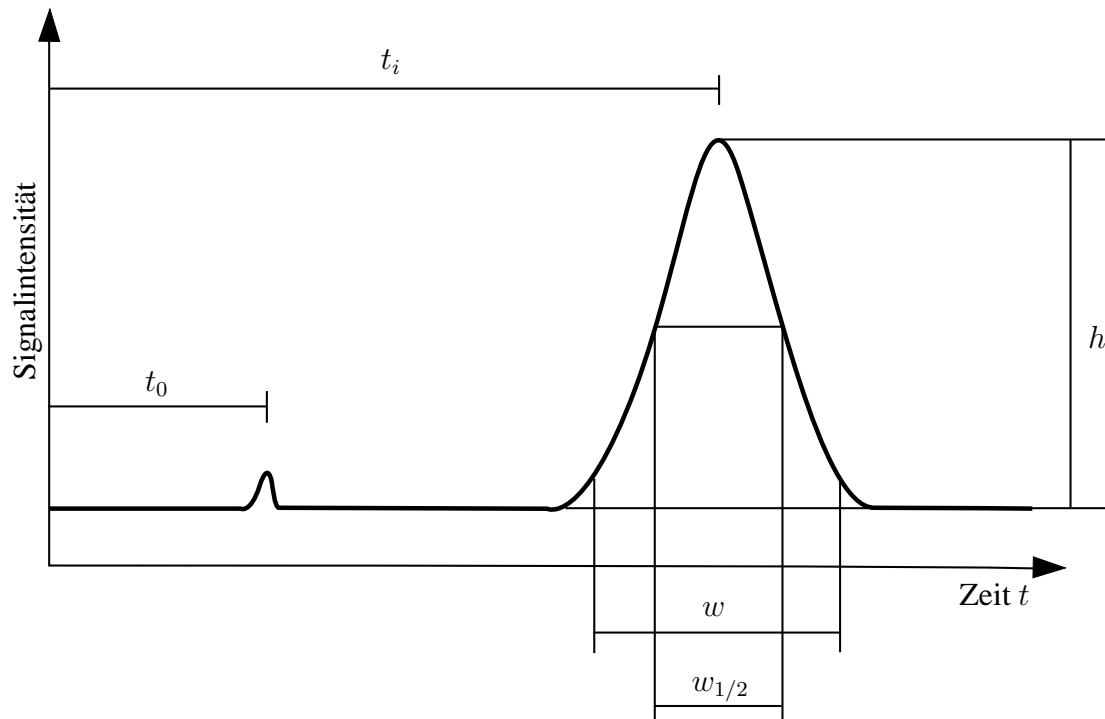


Abbildung 4.1: Kenngrößen eines Chromatogramms.

### 4.2.4 Einflussgrößen bei der Adsorption von Proteinen

Die Adsorption von Proteinen ist ein komplexer Vorgang, welcher durch unterschiedliche Einflüsse bestimmt wird. Vorwiegend werden elektrostatische und Van-der-Waals-Interaktionen zusammen mit Solvatisierungseffekten für die nicht kovalente Bindung des Proteins an eine Oberfläche verantwortlich gemacht. Die Veränderung der Proteinstruktur während des Bindungsvorgangs kann dabei auch den Beitrag des jeweiligen Einflusses verändern.

#### 4.2.4.1 Elektrostatische Interaktionen

Die Oberfläche von Proteinen wird charakterisiert durch die Verteilung von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren und die Verteilung von geladenen und ungeladenen Aminosäu-

ren, die Kräfte sind vorwiegend elektrostatischer Natur. Die Elektrostatik von Proteinen ist sowohl wichtig für die Wechselwirkung von Proteinen untereinander, die Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins, als auch für die Wechselwirkungen mit Oberflächen.

Die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und die Ionenstärke der Lösung haben einen Einfluss auf das elektrostatische Potenzial eines Proteins. Die Modellierung des elektrostatischen Potenzials wurde in mehreren Reviews beschrieben [42]. In der klassischen Elektrostatik werden Materialien als dielektrisch homogen betrachtet, die durch elektrische Ladungen polarisiert werden können. In diesem Kontinuum-Modell wird eine dielektrische Konstante benutzt anstelle von expliziten Ladungen eines Atoms. Das einfachste Modell wird hier durch das Gesetz von Coulomb beschrieben, wo die elektrostatische Energie zwischen zwei Ladungen  $i$  und  $j$  gegeben ist durch:

$$G_{ij} = \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}$$

und das Potenzial eines Atoms  $i$  durch die Ladung des Atoms  $j$  durch:

$$\phi_i = \frac{q_j}{\epsilon r_{ij}}$$

$q_j$  = Ladung des Atoms  $j$

$\epsilon$  = Dielektrizitätskonstante

$r_{ij}$  = Abstand zwischen Atomen  $i$  und  $j$

Dieses Modell ist nur gültig für ein unbegrenztes Medium mit einer einheitlichen Dielektrizitätskonstante, dies ist aber bei Anwendung auf Makromoleküle nicht der Fall. Makromoleküle wie zum Beispiel Proteine haben niedrige Dielektrizitätskonstanten, da unter anderem die polaren Gruppen durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden und sich nicht im äußeren elektrostatischen Feld ausrichten können. Ein Protein in Wasser mit  $\epsilon=80$  ist ein System mit unterschiedlichem dielektrischem Medium. Während ein System eines Proteins in organischem Medium mit  $\epsilon=2-20$  ein wesentlich homogeneres dielektrisches Medium bildet. Dieser Unterschied wird im elektrostatischen Modell durch die Verwendung der Poisson-Boltzmann Gleichung (PBE) berücksichtigt. In der PBE werden Lösungsmittleigenschaften als Durchschnittswerte in einem Kontinuum beschrieben, die Eigenschaften des Makromoleküls werden im Atomdetail beschrieben. Das elektrostatische Potenzial  $\phi(r)$  wird mittels der Poisson-Boltzmann Gleichung berechnet:

## 4 Einleitung

$$\nabla\varepsilon(r)\nabla\phi(r) = -4\pi\rho(r)$$

Die Verteilung der Ionen wird in der PBE in folgender Form berücksichtigt:

$$\nabla\varepsilon(r)\nabla\phi(r) - \kappa' \sinh[\phi(r)] = -4\pi\rho(r)$$

mit

$$\kappa^2 = \frac{\kappa'^2}{\varepsilon} = 8\pi q^2 l / e k T$$

$\varepsilon$  = Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels

$\phi$  = elektrostatisches Potenzial in kT/e

$I$  = Ionenstärke

$k$  = Boltzmann Konstante

$T$  = absolute Temperatur

$l$  = Debye-Hückel Länge

$q$  = Ladung eines Protons

$\rho(r)$  = die Ladungsdichte im Abstand  $r$

Die linearisierte PBE lautet damit:

$$\nabla\varepsilon(r)\nabla\phi(r) - \kappa'\phi(r) = -4\pi\rho(r)$$

### 4.2.4.2 Van-der-Waals-Interaktionen

Van-der-Waals-Kräfte treten durch Fluktuationen von atomaren Dipolen und der Polarisierbarkeit von Atomen auf. Diese Interaktionen werden durch das Lennard-Jones Potenzial beschrieben.

$$U_{ij} = \sum_{i < j} \left( \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} \right)$$

$C_{ij}$  ist eine Konstante, die hauptsächlich von der Polarisierbarkeit der beiden Atome oder Gruppen abhängt (London-Kraft), aber auch von deren Dipolmoment (Keesom und Debye Wechselwirkungen). Der erste Term der Gleichung, parametrisiert durch die Konstante  $B_{ij}$ , ist die Born-Abstoßung. Die Summe der Van-der-Waals-Energien einer Ansammlung von Atomen wird gebildet durch die Summe aller Paare der Atome  $ij$  des zweiten Terms.

#### 4.2.4.3 Solvatisierung

Ist die Oberfläche von Protein und Adsorber hydrophil, so wird ihre Hydratation bevorzugt. Proteine enthalten sowohl polare, als auch unpolare Bereiche. Bei kugelförmigen Proteinen in wässriger Umgebung tendieren die unpolaren Bereiche dazu, im Inneren des Proteins vergraben zu sein. Dabei sind sie vor dem Kontakt mit Wasser geschützt. Jedoch sind durch andere Interaktionen, welche an der Bestimmung der Proteinstruktur teilhaben und durch weitere geometrische Einschränkungen, nicht alle apolaren Bereiche im Innenbereich lokalisiert sowie auch nicht alle polaren Bereiche der wässrigen Peripherie des Proteinmoleküls exponiert. Für kleinere Proteinmoleküle mit einer Masse von ca. 15 kDa belegen unpolare Atome ca. 40-50% der wasserzugänglichen Oberfläche [101]. Bei größeren Proteinen, welche ein kleineres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen haben, ist die unpolare Fraktion der Oberfläche üblicherweise geringer. Zusätzlich zeigen wasserlösliche, nicht aggregierende Proteine eine gleichmäßige Verteilung von polaren und unpolaren *residues* auf ihrer Oberfläche, sodass üblicherweise keine ausgeprägten hydrophoben *patches* ausgebildet sind. Von den Solvatisierungskräften wird angenommen, dass aus der Störung der molekularen Struktur von Wasser in der Nachbarschaft von hydrophoben Oberflächen hervorgehen. Der hydrophobe Effekt gilt als einer der Hauptfaktoren bei Adsorptionsvorgängen von Proteinen.

#### 4.2.4.4 Änderung der Proteinstruktur

Interaktionen mit einer Grenzfläche können strukturelle Veränderungen des Proteins hervorrufen. Untersuchungen von adsorbierten Proteinen zeigen, dass sich die Schichtdicke in vergleichbaren Dimensionen wie der Durchmesser des nativen Moleküls in Lösung befindet [22, 23, 43, 161]. Daraus kann geschlossen werden, dass beim Adsorptionsvorgang zumindest die kompakte Struktur des Proteins erhalten bleibt. Speziell bei hydrophoben Oberflächen werden häufiger Entfaltungen beobachtet. Diese werden mit allgemein denaturierenden Einflüssen wie z. B. zunehmender Salzkonzentration und Temperatur stärker [58, 73, 201].

### 4.3 Chromatografische Methoden

#### 4.3.1 Proteinadsorption in der Ionenaustauschchromatografie

Bei der Ionenaustauschchromatografie stehen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und dem Adsorber im Vordergrund. Üblicherweise werden Ionenaustauschersäulen bei niedrigen Salzkonzentrationen oder einem bestimmten ladungsgebenden pH

## 4 Einleitung

mit Proteinen beladen und anschließend mit höherer Salzkonzentration bzw. abweichendem pH eluiert. Ein detaillierteres Verständnis für die Mechanismen bei der Adsorption führt zu einer besseren Interpretation der experimentellen Ergebnisse und hilft der weiteren Entwicklung von chromatografischen Prozessen.

In vielen Fällen konnte die Gesamtladung eines Proteins erfolgreich eingesetzt werden, um Retentionsdaten mit Proteinen unterschiedlicher Ladung modellhaft zu beschreiben. Jedoch gab es auch Abweichungen, die sich nicht mit der Gesamtladung eines Proteins erklären ließen. Beispielsweise war es in einigen Fällen möglich, die Ionenaustauschchromatografie des ungeladenen Proteins beim pI Wert [96], die Adsorption von Proteinen auf Adsorbentien mit Ladung gleichen Vorzeichens [103] oder chromatografische Selektivität trotz gleicher Nettoladungen der verwendeten Proteine [34] durchzuführen. Die festgestellten Verhaltensweisen zeigen die Notwendigkeit einer detaillierteren Betrachtungsweise auf.

Weiter entwickelte Modelle wurden benutzt, welche Proteine auch als Dipol und Quadrupol beschreiben [28]. Inzwischen wird auch mit Modellen in atomarer Auflösung gearbeitet und die Bindungsenergien für verschiedene Orientierungen berechnet [142, 177, 215]. Dennoch gibt es auch mit diesen Methoden Abweichungen von experimentellen Daten. Während die gleiche Methode bei Cytochrom *c* bei Vergleich verschiedener Varianten aus unterschiedlichen Organismen funktionierte [212], so führte sie beim Vergleich der Proteine *horse heart cytochrom c* und Lysozym zum Experiment entgegengesetzten Ergebnissen [214], oder die vermeintlich simple Methode über eine Modellierung von Lysozym als Kugel mit Ladung liefert im Vergleich zum experimentell gemessenen Gleichgewichtskonstante die genaueren Ergebnisse als eine erweiterte Modellierung mit Dipol oder als komplette Struktur [149]. Ein Nachteil aller genannten Untersuchungen ist, dass sie sowohl das Protein als auch die Oberfläche des Adsorbentien als rigide behandelten.

### 4.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatografie

Die hydrophobe Interaktionschromatografie (HIC) ist eine der wichtigsten Methoden für die Aufreinigung von Proteinen und DNA [49, 69, 135, 178]. HIC Systeme werden typischerweise bei hohen Salzkonzentrationen mit Proteinen beladen und anschließend mit abnehmender Salzkonzentration eluiert.

Unterschiedlichste Faktoren beeinflussen die Proteinadsorption bei HIC Systemen. Die Hydrophobizität [113] und Größe des Proteins [55], Struktur der Liganden der stationären Phase [111], Art und Konzentration des Salzes [116, 133], pH [210], Temperatur und die angewendete chromatografische Methode (Isokratische oder Gradienten-Methode) sind die wichtigsten bekannten Einflüsse. Momentan haben sich zwei Theorien etabliert, welche die Salzeffekte



bei der HIC beschreiben, die *solvophobic theory* [116] und die *preferential interaction theory* [56]. Die *solvophobic theory*, basierend auf der Assoziation und Solvation des Adsorbers und des Adsorbents, beschreibt die Retention durch eine Zunahme der molalen Oberflächenspannung des Salzes. Es wurde gezeigt, dass die Proteinretention auch von Interaktionen zwischen einigen Proteinen und dem Salz abhängig ist. Die *preferential interaction theory* [133, 15] beschreibt den Effekt des Salzes auf die Retention von Proteinen über die Änderung der Verteilung von Salzionen und Wassermolekülen. Die *preferential interaction theory* wurde erfolgreich bei der Vorhersage des Verhaltens bei der Proteinadsorption unter linearen (Verteilungskoeffizient bleibt konstant) [133] und nicht-linearen (Verteilungskoeffizient bleibt nicht konstant) [209, 211] Konditionen angewendet, sowie bei Studien zum Effekt von pH [210], Kettenlängen der Liganden und der Temperatur [47] auf die Proteinbindung bei der HIC. Proteineigenschaften, wie z. B. die Menge der aromatischen Aminosäuren, wurden benutzt, um die Selektivität bei der HIC zu erklären [106]. Es wurden Untersuchungen zur Vorhersage der Retentionszeiten von Proteinen alleine aus deren Primärsequenz vorgenommen [154]. In jüngster Zeit wurden auch alternative Vorgehensweisen entwickelt, die die dreidimensionalen Eigenschaften der Proteinstrukturen mittels entsprechenden Modellierungen für die Beschreibung der Proteinadsorption bei der HIC miteinbeziehen. Die durchschnittliche Hydrophobizität der Proteinoberfläche wurde benutzt, um die Retention vorherzusagen [105, 154]. Experimentelle chromatografische Ergebnisse mit spezifischen physikochemischen Eigenschaften des Proteins wurden mittels *non-linear support vector machines* korreliert und *quantitative structure property relationship* Modelle entwickelt [30, 31, 32, 99].

### 4.3.3 Porenstruktur chromatografischer Adsorptionsmaterialien

Die geometrischen und topologischen Eigenschaften der Poren spielen eine wichtige Rolle beim Transport gelöster Stoffe durch chromatografische Adsorptionsmaterialien [52]. Die Porengrößenverteilung stellt dabei eine statistische Information über Größenverteilung der Poren dar, während die Konnektivität die Ausbildung von Verbindungen zwischen den Poren beschreibt [44]. Hauptsächlich wurden bisher indirekte Methoden zur strukturellen Charakterisierung von chromatografischen Materialien wie z. B. die *size exclusion chromatography* (siehe 4.2.2) angewandt. Hierbei werden jedoch keine Informationen über Verbindungen zwischen den Poren erhalten [109]. Es wurden deshalb Modelle entwickelt, die das Verhalten von porösem Material mittels funktioneller Methoden zur Charakterisierung, wie z. B. Gassorption, Quecksilberintrusion und Größenausschlusschromatografie [136, 188, 189], interpretieren halfen und dadurch konnte die Porengrößenverteilung abgeschätzt werden. Die erhaltenen Werte waren jedoch abhängig vom benutzten Modell. Die Porenstruktur wurde mittels zwei-

#### 4 Einleitung

und dreidimensionaler elektronenmikroskopischer Aufnahmen untersucht. Über die Elektronenmikroskopie von chromatografischen Adsorptionsmaterialien konnten schließlich morphologische Eigenschaften der Pore aufgeklärt werden [8, 71, 86, 122, 174, 181]. Detaillierte geometrische Parameter wie Porosität, Porengrößenverteilung und die zugängliche Oberfläche konnten über zweidimensionale Aufnahmen [59, 98] und mittels quantitativer Stereologie bestimmt werden [151, 190]. Eine komplette Beschreibung der dreidimensionalen Topologie überstieg jedoch die Möglichkeiten der Stereologie [151].

In jüngster Zeit wurden auch dreidimensionale Strukturen von chromatografischen Adsorptionsmaterialien mittels Elektronentomografie bestimmt [213]. Hierbei wurden über eine schrittweise Drehung der Probe mehrere Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskopie erstellt und in dreidimensionale Daten übersetzt (Abbildung 4.2). Es sind jedoch bisher keine Methoden bekannt, mit denen sich experimentell die direkte Wechselwirkung der Oberfläche chromatografischer Adsorptionsmaterialien mit Proteinen beobachten ließe.

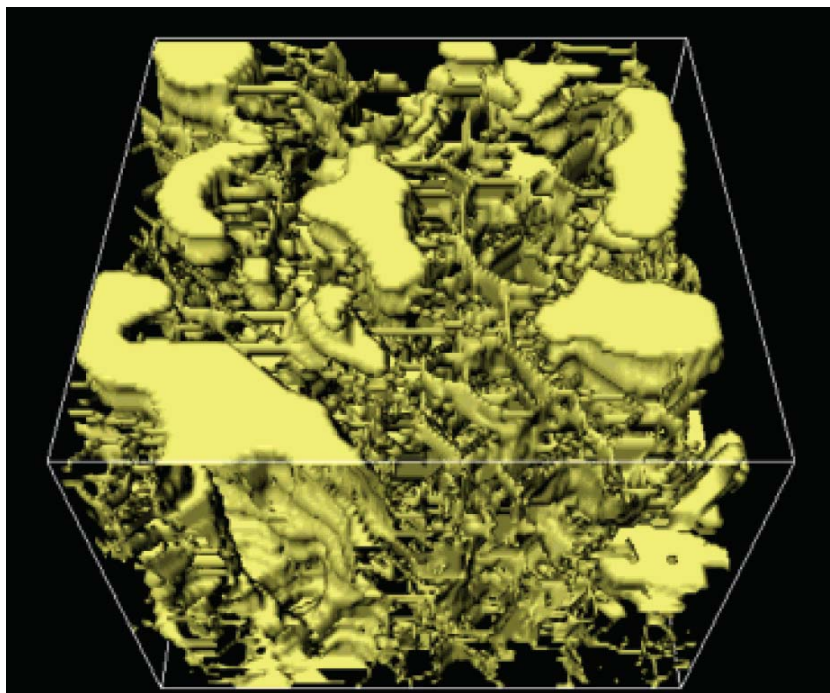


Abbildung 4.2: Dreidimensionale Rekonstruktion aus transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen des Kationenaustauschers Toyopearl SP-550C [213]. Das Adsorbent wurde mit Lysozym beschichtet, um den Kontrast zu erhöhen. Abmessungen:  $0.375 \times 0.375 \times 0.300 \mu\text{m}$ , der schwarze Bereich repräsentiert den leeren Raum, die gelb gefärbte Region stellt die Grundmatrix zusammen mit dem Harz dar.

Einige chromatografische Materialien bestehen aus einem *tentacle*-Adsorbent, dessen „Tentakel“ aus sehr flexiblen, mit Liganden versehenen Polyelektrolytketten besteht [120]. Es wird angenommen, dass zusätzliche geladene Bereiche der Proteinoberfläche mit der stationären Phase interagieren können. Die hydrophilen Tentakel formen ein dreidimensionales Hydrogel. Durch eine stapelförmige Anordnung der Proteine zwischen mehreren Schichten von Tentakeln wird so eine höhere Kapazität erreicht. Die *tentacle*-Adsorber wurden im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der unbekannteren atomaren Strukturen des Hydrogels und dem damit verbundenen erhöhten Schwierigkeitsgrad bei der Modellierung nicht verwendet.

## 4.4 Verwendete Proteine

### 4.4.1 Lysozym

#### 4.4.1.1 Allgemeines

Bereits 1922 wurde Lysozym (E.C. 3.2.1.17) von Alexander Fleming beschrieben, der dessen bakterizide Eigenschaft bemerkte [57]. Lysozym kommt in einer großen Anzahl von Sekreten vor. Es ist in der Tränenflüssigkeit, dem Speichel, den Nasen- und Darmschleimhäuten sowie in den Granulozyten des Blutplasmas vorhanden. Große Mengen werden aus Hühnereiklar gewonnen.

Durch Hydrolyse einer  $\beta(1,4)$ -glykosidischen Bindung zwischen den Grundbausteinen N-Acetyl-Glucosamin und N-Acetyl-Muraminsäure der Polysaccharide von bakteriellen Zellwänden tritt die antibakterielle Eigenschaft zutage. Lysozym wird deshalb auch als Muramidase bezeichnet.

#### 4.4.1.2 Aufbau

*Hen-egg-white*-Lysozym (HEW-Lysozym) ist ein relativ kleines, kugelförmiges Protein, welches aus 129 Aminosäuren besteht und ein Gewicht von 14.4 kDa besitzt. Seine dreidimensionale Struktur war eine der ersten durch Röntgenkristallografie bestimmten Proteinstrukturen [20]. Die Struktur besteht aus vier  $\alpha$ -Helices und einer kleinen  $\beta$ -Faltblattstruktur (Abbildung 4.3). Beide Domänen bilden einen Spalt, in welchem das Substrat gebunden wird.

Lysozym ist ein stark kationisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von etwa 11.0 [10] und einem optimalen pH von 9.2 [41].

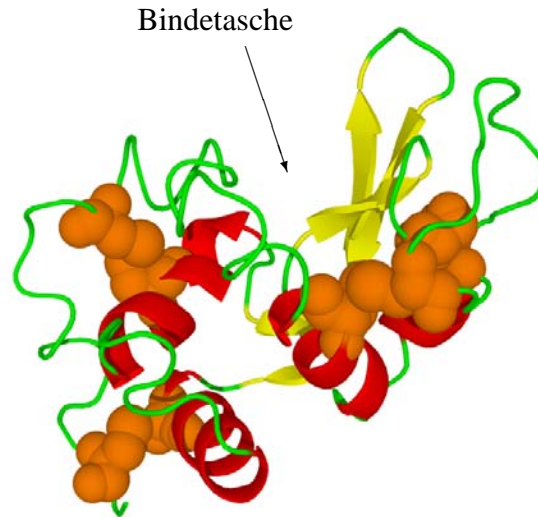


Abbildung 4.3: Kristallstruktur von *hen-egg-white*-Lysozym (PDB-Entry: 1LYZ).  $\alpha$ -Helices sind in Rot dargestellt,  $\beta$ -Faltblattstrukturen in Gelb und Disulfidbrücken in Orange.

#### 4.4.1.3 Verwendung

Unter der Bezeichnung E1105 wird Lysozym als Lebensmittelzusatzstoff verwendet. Es wird zum Beispiel in der Weinbereitung verwendet, um den Säureabbau durch Milchsäurebakterien zu kontrollieren und zur Verhinderung von Spätblähungen bei der Käsezubereitung. Weitere Anwendung im Lebensmittelbereich findet Lysozym auch als Konservierungsmittel. Da es in großen Mengen herstellbar und damit billig zu beziehen ist, wird es in vielen biotechnologischen Forschungsbereichen als Standardprotein verwendet.

#### 4.4.1.4 Adsorptionsverhalten von Lysozym

Auch bei der Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Proteinen wird Lysozym häufig verwendet. Verschiedenste Materialien wie z. B. Hydroxyapatite [94], Polymere [170] und Kompositmaterialien [199] wurden dabei untersucht. Es hat sich herausgestellt, dass die Struktur von HEL äußerst stabil bei Adsorptionsvorgängen ist [14, 62, 125].

Um die Vorgänge auf molekularer Ebene in Bezug zu den experimentellen Beobachtungen bei der Adsorption zu setzen, wurde versucht verschiedene experimentelle Charakteristiken von HEL mittels unterschiedlicher Modelle zu beschreiben bzw. vorherzusagen. Über ein ku-

#### 4 Einleitung

gelförmiges, geladenes Modell konnte das lineare Verhalten der Gleichgewichtskonstante zur Salzkonzentration (unter logarithmischer Auftragung) bei der Adsorption auf einer negativen Oberfläche für Lysozym und Cymotrypsinogen A modelliert [150] und mit experimentellen Daten verglichen werden [149]. Dabei wurden zusätzlich unterschiedlich komplexe, kugelförmige Modelle verglichen. Das einfachste Modell als Kugel mit Ladung im Zentrum lieferte dabei erstaunlicherweise das beste Ergebnis für Lysozym. Dieses Proteinmodell wurde wiederum benutzt, um den entropischen und enthalpischen Energieanteil unter Einbeziehung von Protein-Oberflächen- und Protein-Protein-Interaktionen zu modellieren [148]. Es konnte gezeigt werden, dass der entropische Anteil durch die Verdrängung von Gegenionen dominierend sein kann.

Auch *Brownian dynamics* Simulationen zur Adsorption von Proteinen an Oberflächen wurden mit Lysozym durchgeführt. Bei *Brownian dynamics* Simulationen werden die Diffusionsbewegungen von interagierenden Partikeln simuliert ohne die Moleküle des Lösungsmittels explizit miteinzubeziehen. Meist werden die interagierenden Partikel dabei vereinfacht als Kugeln mit bestimmten Eigenschaften dargestellt. Die Lösungsmittelmoleküle werden als viskoses Medium behandelt und deren Einfluss über eine stochastische Kraft modelliert. Dadurch können größere System und größere Zeitspannen simuliert werden als bei MD-Simulationen. Das Verhalten von Lysozym und Latexpartikeln mit einer entgegengesetzt geladenen Oberfläche bei verschiedenen Salzkonzentrationen wurde mittels *Brownian dynamics* Simulationen simuliert [126]. Eine Adsorption, welche ungewöhnlicherweise durch die Repulsion der Partikel bei niedrigen Salzkonzentrationen kontrolliert wird, wurde für Lysozym vorhergesagt, allerdings ohne experimentellen Nachweis. Eine ähnliche *Brownian dynamics* Simulation prognostizierte mögliche double-layer screening Effekte [142].

Komplexere Modelle für die Adsorption als die Beschreibung des Proteins über Ladungen auf einer kugelförmigen Oberfläche oder als Punktladungen wurden mittels der Verwendung von Strukturen in atomarer Auflösung von Proteinen erstellt. Die unterschiedlichen Retentionszeiten von Lysozym und Cytochrom *c* und die zwei unterschiedlichen Fibroblast-Wachstumsfaktoren FGF-1 und FGF-2 wurden untereinander verglichen [214]. Allerdings hat sich hier gezeigt, dass das entwickelte Modell zwar beim Vergleich der Fibroblast-Wachstumsfaktoren FGF-1 und FGF-2 die Retentionszeiten vorhersagen konnte, die Retentionszeiten der Proteine Lysozym und Cytochrom *c* damit aber nicht erklärt werden konnten.

Die Orientierung im adsorbierten Zustand wurde mittels einer empirischen Energiefunktion und eines rigiden Modells für Lysozym auf verschieden geladenen SAM (*self-assembled monolayer*) Oberflächen vorhergesagt [177]. Durch ein schrittweises Drehen des Proteins über der Oberfläche wurde ein Energieprofil erstellt und das globale Minimum als bevorzugte

Orientierung gewertet. Es war nur ein indirekter Bezug zu experimentellen Daten verfügbar: Eine Vorhersage der Adsorption auf einer Oberfläche mit Ladung gleichen Vorzeichens konnte gemacht werden [103]. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde auch schon früher mit  $\alpha$ -Lactalbumin und Lysozym zur Orientierungsvorhersage auf einem Anionenaustauscher verwendet [124] und die Bindung von Lysozym auf Oberflächen mit Ladungen gleichen Vorzeichens bereits vorhergesagt, allerdings noch ohne experimentellen Nachweis.

## 4.4.2 Cytochrom P450-BM3 Monooxygenase

### 4.4.2.1 Allgemeines

Cytochrom P450 (CYP) Monooxygenasen sind Enzyme einer großen Superfamilie, die in allen Organismen wie Bakterien, Pilzen und Pflanzen bis hin zu Säugetieren vorkommen. Ihr Name wurde ihnen aufgrund des charakteristischen Absorptionsmaximums bei 450 nm im Komplex mit Kohlenmonoxid verliehen. Sie sind einerseits am Biosynthesestoffwechsel von Steroiden, Prostaglandinen und Retinoiden beteiligt, andererseits dienen sie auch der Stoffwechsellung (Entgiftung) lipophiler Substanzen und tragen deshalb auch dem Abbau von Arzneistoffen im Körper bei.

Cytochrom P450-BM3 (CYP102A1) stammt von dem Bakterium *Bacillus megaterium* [203] und katalysiert die NADPH-abhängige Hydroxylierung verschiedenster langkettiger Fettsäuren an den  $\omega$ -1 bis  $\omega$ -3 Positionen [121]. Es kann in *Escherichia coli* hergestellt und im präparativen Maßstab in einem einzigen Chromatographieschritt aufgereinigt werden [164]. Aufgrund der Tatsache, dass es eine Vielzahl nicht natürlicher Substrate umsetzen kann (wie z. B. Styrol [68]), ist es für die industrielle Anwendung äußerst interessant. Im Unterschied zu vielen anderen bekannten CYP ist P450-BM3 ein natürliches Fusionsprotein, welches alle drei Domänen (FAD, FMN und P450) eines Monooxygenasesystems in einer Polypeptidkette enthält.

### 4.4.2.2 Aufbau

Die hier verwendete Cytochrom P450-BM3-Häm-domäne besteht aus 4  $\beta$ -Faltblattstrukturen und 13  $\alpha$ -Helices (Abbildungen 4.4 und 4.5 (a)). Den Kern der Struktur bilden die vier aneinandergelagerte  $\alpha$ -Helices D, L, I, und E. Darum sind die Helices J und K, die zwei  $\beta$ -Faltblattstrukturen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2, sowie ein *loop*, welcher als „Mäander“ bezeichnet wird, angeordnet [204]. Das aktive Zentrum befindet sich zwischen den Helices I und L und enthält ein Häm-Eisen, welches über ein Cystein mit dem Protein verbunden ist. Der Bereich über dem Häm, in dem sich auch der F-G-*loop* befindet, wird als distale Seite bezeichnet, während der

#### 4 Einleitung

Bereich unterhalb des Häm als proximale Seite bezeichnet wird. Im Bereich des F-G-loops wird auch der Substratzugangskanal zum aktiven Zentrum vermutet.

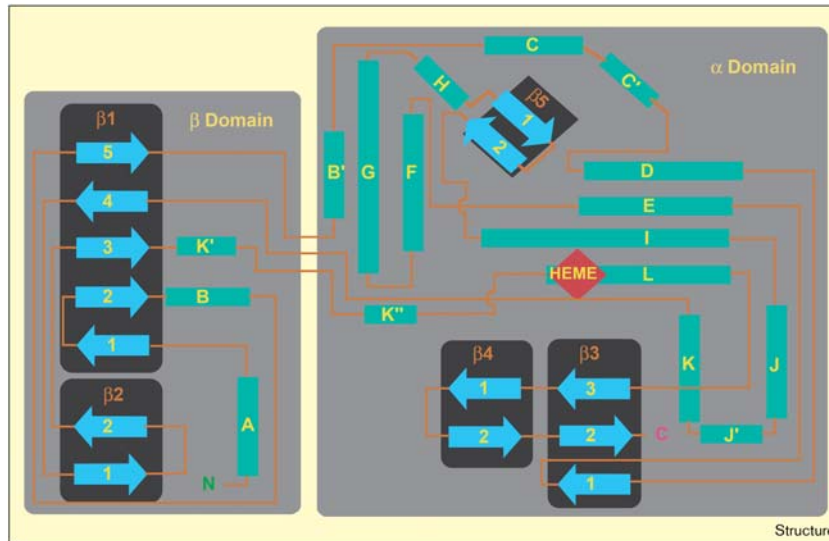


Abbildung 4.4: Aufbau der typischen Sekundärstrukturtopologie in der Familie der P450 Monooxygenasen. Grüne Rechtecke repräsentieren  $\alpha$ -Helices, blaue Pfeile  $\beta$ -Faltblattstrukturen [134].

Das elektrostatische Potenzial der Oberfläche ist größtenteils negativ mit einem positiven Bereich auf der proximalen Seite an der Bindestelle der FMN-Domäne [166] (Abbildung 4.5 (b)). Die Ladungsverteilung des Enzyms bewirkt einen starken Dipolcharakter [80]. Über diesen wird vermutet, dass er die Interaktion zwischen P450 und dem Redoxpartner beschleunigt und die korrekte Bindung beider Domänen unterstützt.



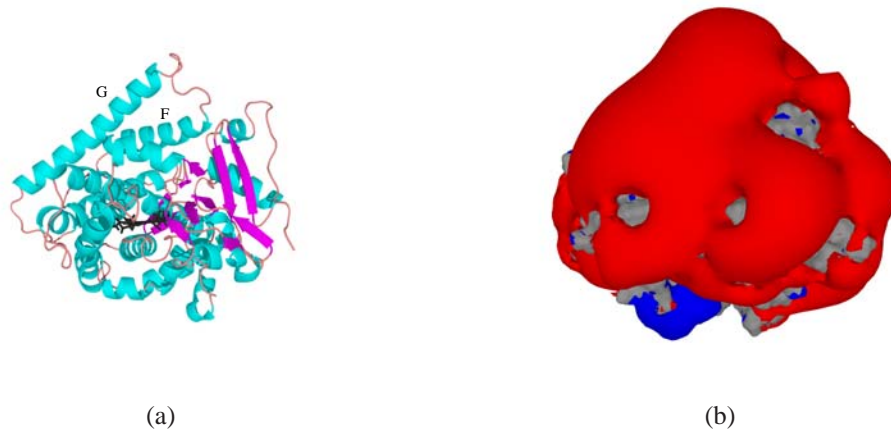


Abbildung 4.5: Struktur der Hämdomäne von P450-BM3 in identischer Ausrichtung. (a) *Cartoon*-Darstellung:  $\alpha$ -Helices in Cyan,  $\beta$ -Faltblatt Strukturen in Violett und Häm in Dunkelgrau. (b) Darstellung des elektrostatischen Potentials als *isosurface* bei  $-3.5$  kT (rot) und  $0.5$  kT (blau). Die Oberfläche des Proteins ist in Hellgrau dargestellt.

#### 4.4.2.3 Adsorptionsverhalten der P450-BM3-Hämdomäne

Interesse findet die Immobilisierung von Cytochrom P450 an verschiedenen Oberflächen [100, 145, 146, 183]. Dabei sollte der Substratkanal möglichst nicht von der Oberfläche versperrt werden. Die Immobilisierung von Cytochrom P450 findet auch im Bereich der enzymbeschichteten Elektroden Anwendung [129, 176]. Auch hier spielt die Ausrichtung des Enzyms eine wesentliche Rolle für die Funktionsfähigkeit. Der distale, Substrat akzeptierende Bereich sollte dabei von der Elektrodenoberfläche hinweg zeigen und der proximale, elektronenakzeptierende Bereich mit der Elektrode in Verbindung stehen.

Im Rahmen eines Forschungsprojekts „Programm des Projektbezogenen Personenaustauschs (PPP)“ wurde an unserem Institut das Retentionsverhalten der P450-BM3-Hämdomäne auf unterschiedlichen Anionenaustauschern von Dong-Qiang Lin untersucht. Hierfür wurden isokratische Retentionsuntersuchungen mittels eines AKTAexplorer Systems durchgeführt und unterschiedliche Säulen mit jeweils 1 ml Volumen verwendet. Darunter befanden sich die Säulen DEAE FF und Q FF von Amersham Biosciences, sowie DEAE 650M, QAE 550C und Super Q 650M von Tosohaas. Lineare Beziehungen des Retentionsfaktors  $k'$  bzw. der Gleichgewichtskonstante  $K$  und der Salzkonzentration wurden vorgefunden (Abbildung 4.6). Diese Beobachtungen waren konsistent mit bestehender Literatur.

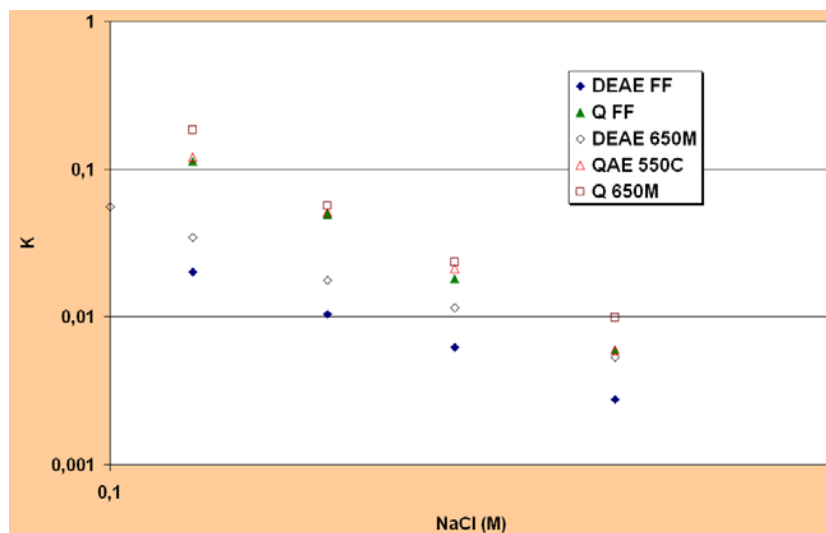


Abbildung 4.6: Vergleich der Gleichgewichtskonstanten  $K$  mit der Salzkonzentration für verschiedenen Anionenaustauscher bei doppellogarithmischer Auftragung. Eine lineare Beziehung wurde festgestellt.

### 4.4.3 Antikörper

#### 4.4.3.1 Allgemeines

Antikörper (Immunglobuline) sind Proteine, die im Rahmen einer adaptiven Immunantwort im Körper von Vertebraten zum Schutz gegen eingedrungene Pathogene und andere als fremd erkannte Strukturen (Antigene) gebildet werden. Sie werden als Teil der humoralen, adaptiven Immunantwort von den Plasmazellen sezerniert und befinden sich im Blut sowie in der extrazellulären Flüssigkeit. Die Antigene werden vom Antikörper erkannt und nicht kovalent gebunden. Die Wirkung erfolgt entweder über die Inaktivierung des Antigens oder dessen Markierung für weitere Prozessierung über das Komplementsystem [88] oder Makrophagen [7]. Es werden verschiedene Klassen von humanen Antikörpern entsprechend ihrer Funktionen und Eigenschaften unterschieden in IgG, IgM, IgA, IgE und IgD.

#### 4.4.3.2 Aufbau

Antikörpermoleküle sind zum großen Teil aus  $\beta$ -Faltblatt-Domänen aufgebaut (Abbildung 4.7). Diese werden über Disulfidbrücken zusammengehalten. Die in dieser Arbeit verwendeten IgG-Antikörper bilden den Hauptbestandteil der Serum-Immunglobuline (ca. 80%). Sie bestehen aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten sowie N-

glykosylierten Kohlenhydraten. Zusammen beträgt die molare Masse etwa 160 kDa. Jede Kette enthält variable Bereiche ( $V_H$  und  $V_L$ ), welche wichtig bei der Bindung des Antigens sind. Die leichten Ketten besitzen einen konstanten Bereich ( $C_L$ ), während die schweren Ketten drei konstante Bereiche aufweisen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ). Die vier Ketten werden durch Disulfidbrücken und nichtkovalente Bindungen gebunden und ergeben die Form eines „Y“. Die proteolytische Spaltung mittels Papain führt zu drei Fragmenten, zwei identischen antigenbindenden Fragmenten (Fab) und einem Fragment (Fc), das an Komplementproteinen oder zellulären Fc-Rezeptoren binden kann. Im Fab-Fragment sind jeweils die Bereiche  $C_{H1}$  und  $V_H$  mit jeweils einer leichten Kette verknüpft. Die Bereiche  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  der beiden schweren Ketten sind im Fc Fragment verbunden. Hier befindet sich auch die N-Glykosylierung im Bereich der  $C_{H2}$ -Domäne, selten in  $C_{H3}$ . Der Bereich zwischen den Fab- und Fc-Fragmenten, in dem die Spaltung durch Papain erfolgt, ist sehr flexibel und wird als *hinge*-Region bezeichnet. Es wurden bisher nur wenige Strukturen von kompletten Antikörpern kristallisiert [77, 78, 159].

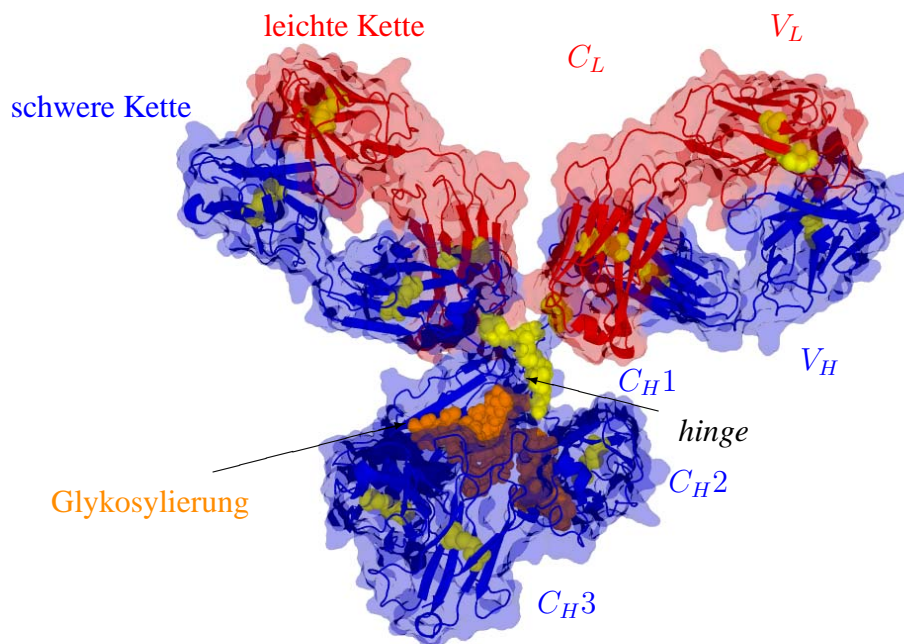


Abbildung 4.7: Kristallstruktur eines murinen IgG1-Moleküls (PDB-Entry: 1IGY). Die leichte Kette ist in Rot, die schwere Kette in Blau dargestellt. Kohlenhydrate in Orange und Disulfidbrücken in Gelb.

## 4 Einleitung

Die Grundstruktur des Glykosylierungsmusters besteht aus N-Acetylglucosamin- und Mannoseresten. Daran gebunden befinden sich oft zahlreiche weitere Zucker wie Galaktose, Fucose und N-Acetylneuraminsäure, die über  $\alpha$ - und  $\beta$ -glykosidische Verbindungen verknüpft sind. Die Funktion der Glykosylierung wird zum einen der Resistenz gegenüber Proteasen zugesprochen [53, 182] und der Stabilisierung gegenüber thermischen Einflüssen [64, 107, 117]. Sie kann auch großen Einfluss auf die Bindung an andere Proteine haben, wie z. B. Fc-Rezeptoren oder der Bindung an das erste Komplement C1q [24, 118, 182]. Auch Einflüsse auf die *feedback*-Suppression der IgG-Synthese und *in vivo* Zirkulationszeit sind nachgewiesen. Veränderungen im Glykosylierungsmuster werden unter anderem mit verschiedenen Krankheiten in Zusammenhang gebracht (z. B. rheumatoide Arthritis). Die Interaktionen von Oligosacchariden und Aminosäuren der Glykosylierungsregion sind entscheidend für die strukturelle Integrität der  $C_H2$ -Domänen [45, 160, 179]. Die Entfernung der Glykosylierung führt zu einer signifikanten Konformationsänderung in den  $C_H2$ -Domänen [53, 97, 107, 147], welche auch zur erhöhten Anfälligkeit gegenüber Proteasen führt. Die Konformationsänderungen wurden an der *hinge*-proximalen Region der  $C_H2$ -Domänen lokalisiert [97, 107]. In den variablen Bereichen  $V_H$  und  $V_L$  sind drei *loops* von besonderer Bedeutung, da sie großen Einfluss auf die Antigenbindung haben. Sie beinhalten die *complementary determining regions* (CDRs), welche große Unterschiede in den Sequenzen aufweisen.

### 4.4.3.3 Verwendung

Antikörper werden in unterschiedlichsten Bereichen der Medizin und Biologie verwendet. Oft als monoklonale Antikörper, die nur von einer ursprünglichen B-Zelle abstammen und somit alle gleichartig sind. Der größte wirtschaftliche Bedeutung liegt im therapeutischen Bereich, wobei die Hauptanwendungsgebiete in der Hämatologie und Onkologie liegen. Es gibt viele weitere Anwendungsgebiete: Sie werden z. B. bei Transplantationen, Infektionen (*respiratory syncytial virus*), allergischem Asthma, entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis oder Multipler Sklerose als Antikoagulans und bei altersbedingter Makuladegeneration eingesetzt. Speziell in der Onkologie werden oft Antikörperkonjugate und -fusionsproteine als Chemotherapeutika eingesetzt.

In der Immunohistochemie wird die Erkennung des Antikörpers von gewebespezifischen Proteinen zum Färben bestimmter Zelltypen verwendet. Auch bei der Durchflusszytometrie werden Zellen mittels fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert und anschließend durch Passieren eines Laserstrahls quantifiziert. Zum Nachweis von Proteinen, Viren sowie niedermolekularer Verbindungen wie Hormonen, Toxinen und Pestiziden werden beim ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), RIA (Radioimmunoassay) und *Western Blot* wiederum enzym-

gekoppelte bzw. radioaktiv markierte Antikörper genutzt. Viele Anwendungen wie ELISA oder *in situ*-Markierungen nutzen nur die antigenbindende Wirkung von Antikörpern und nicht deren Effektorwirkungen. Deshalb werden hier oft nur Antikörperfragmente, welche nur antigenerkennenden Bereiche enthalten, verwendet. Auch außerhalb von Laboren werden Antikörper eingesetzt, etwa bei Schwangerschaftstests oder bei Drogenwischttests.

#### 4.4.3.4 Adsorptionsverhalten von Antikörpern

Das Adsorptionsverhalten von Antikörpern bei der Immobilisierung spielt oft eine wichtige Rolle bei biomedizinischen Anwendungen wie Immunoassays und Biosensoren. Hier kommt es auf die Stabilität, als auch auf die gebundene Orientierung des Antikörpers an, da die antigenerkennenden Bereiche zur Erkennung frei bleiben müssen. Es wurden deshalb viele Untersuchungen mit unterschiedlichem Adsorbent wie beispielsweise Silikagel [93, 104], Latex Polymeren [127, 191], Teflon [194] und Kalzium Hydroxyapatiten [95] durchgeführt.

Die Adsorption von Antikörpern bei chromatografischen Prozessen hingegen soll zu einer möglichst hohen Reinheit führen, vor allem bei der Herstellung von therapeutischen Antikörpern. Deshalb wird häufig die Aufreinigung über eine spezifische Bindung an Protein A vorgenommen. Dies ist jedoch relativ kostspielig und günstigere Alternativen werden gesucht. Die Ionenaustauschchromatografie ist eine bekannte Methode, um die Heterogenität von Antikörpern zu untersuchen. Üblicherweise eluieren monoklonale Antikörper bei Untersuchungen mittels Ionenaustauschchromatografie in multiplen *peaks*. Es wurden verschiedene Faktoren dafür gefunden, wie das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von C-terminalen Lysinen [18, 84, 91, 110, 119, 138, 157, 158, 202], die Zyklisierung des N-terminalen Glutamin zu Pyroglutamat [18, 157], Desamidierung [79, 110, 132, 157, 187, 216], Isomerisierung [79], Amidierung [158], Oxidation von Methioninseitenketten [35], die Anwesenheit von Sialinsäure [110, 158] und die Abhängigkeit von unterschiedlichen Glykosylierungsmustern [61]. Eine weitere mögliche Einflussnahme wurde über die antigenerkennenden Bereiche festgestellt. Durch Änderungen in diesem Bereich konnten experimentell Änderungen der Retentionszeiten bei der Kationenaustauschchromatografie bestimmt werden [87].



# 5 Ergebnisse

## 5.1 *Ab initio*-Parametrisierung von Liganden

### 5.1.1 Parametrisierung von Anionenaustauscherliganden

Es wurden Ladungen für die starken Anionenaustauscherliganden QAE und SuperQ, sowie für den protonierbaren schwachen Anionenaustauscherliganden DEAE in protonierter als auch in deprotonierter Form mittels *ab initio*-Methoden und anschließendem RESP-*fitting* berechnet (Tabelle 5.1). Die Gesamtladung betrug bei den Molekülen QAE, SuperQ und der protonierten Form des schwachen Ionenaustauscherliganden DEAE jeweils +1 und war bei der unprotonierten Form von DEAE neutral.

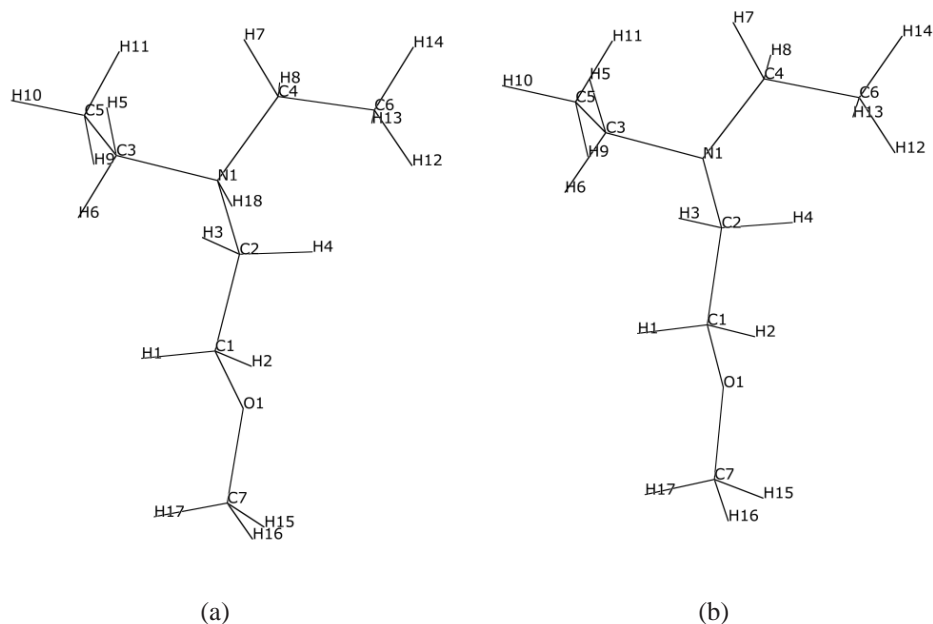


Abbildung 5.1: Minimierte Strukturen der Modelle des schwachen Anionenaustauscherliganden DEAE in protonierter (a) und in deprotonierter Form (b).

## 5 Ergebnisse

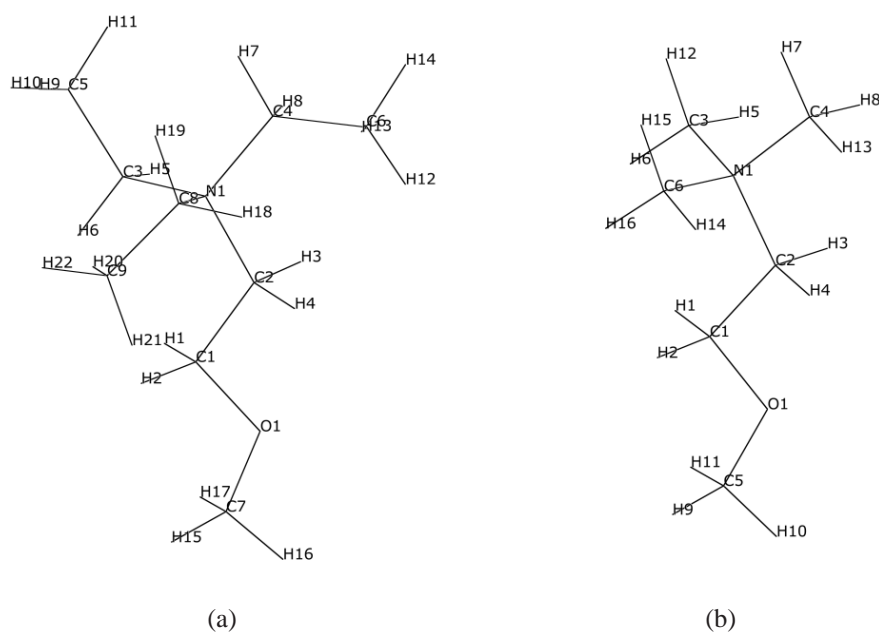


Abbildung 5.2: Minimierte Strukturen der Modelle der starken Anionenaustauscherliganden QAE (a) und SuperQ (b).

ATOMNAME	DEAEH	DEAE	ATOMNAME	QAE	ATOMNAME	SUPERQ
C5	-0.134788	-0.043402	C5	-0.086269	C3	-0.138685
H9	0.078561	0.021396	H9	0.056748	H5	0.117099
H10	0.078561	0.021396	H10	0.056748	H6	0.117099
H11	0.078561	0.021396	H11	0.056748	H12	0.117099
C3	-0.111616	0.017301	C3	0.003277	N1	0.097596
H5	0.134374	0.044596	H5	0.077432	C4	-0.138685
H6	0.134374	0.044596	H6	0.077432	H7	0.117099
N1	-0.044534	-0.387278	N1	0.037981	H8	0.117099
C4	-0.111616	0.017301	C4	0.003277	H13	0.117099
C6	-0.134788	-0.043402	C6	-0.086269	C6	-0.138685
H12	0.078561	0.021396	H12	0.056748	H14	0.117099
H13	0.078561	0.021396	H13	0.056748	H15	0.117099
H14	0.078561	0.021396	H14	0.056748	H16	0.117099
H7	0.134374	0.044596	H7	0.077432	C2	-0.012248
H8	0.134374	0.044596	H8	0.077432	H3	0.103907
C2	-0.128896	0.008666	C8	0.003277	H4	0.103907

Tabelle 5.1: Mittels *ab initio*-Methoden und RESP bestimmte Ladungen von Anionenaustauscherliganden.



ATOMNAME	DEAEH	DEAE	ATOMNAME	QAE	ATOMNAME	SUPERQ
H3	0.140759	0.062819	C9	-0.086269	C1	0.052274
H4	0.140759	0.062819	H20	0.056748	H1	0.063681
C1	0.035792	0.138960	H21	0.056748	H2	0.063681
H1	0.066697	0.036829	H22	0.056748	O1	-0.361973
H2	0.066697	0.036829	H18	0.077432	C5	0.017945
O1	-0.341255	-0.401503	H19	0.077432	H9	0.077798
C7	0.022067	0.048286	C2	0.027400	H10	0.077798
H15	0.076850	0.046338	H3	0.081033	H11	0.077798
H16	0.076850	0.046338	H4	0.081033	C3	-0.138685
H17	0.076850	0.046338	C1	0.061896	H5	0.117099
H18	0.295310		H1	0.051163		
			H2	0.051163		
			O1	-0.363260		
			C7	0.013940		
			H15	0.077100		
			H16	0.077100		
			H17	0.077100		

Tabelle 5.1: Mittels *ab initio*-Methoden und RESP bestimmte Ladungen von Anionenaustauscherliganden.

Vergleicht man die starken Anionenaustauscherliganden und die protonierte Form von DEAE miteinander, so zeigt sich, dass hier das stärkste positive elektrostatische Potenzial in Richtung des Atoms N1 des Liganden über die Wasserstoffatome verteilt, vorliegt. Für den unteren terminalen Bereich wurden sehr ähnliche Ladungswerte für die Liganden erhalten (C7, H15, H16 und H17 bei DEAEH; C7, H15, H16 und H17 bei QAE; C5, H15, H16 und H17 bei SuperQ). Die sehr ähnliche Verteilung der Ladungen zeigt sich auch bei der visuellen Betrachtung des elektrostatischen Potenzials (Abbildung 5.3).

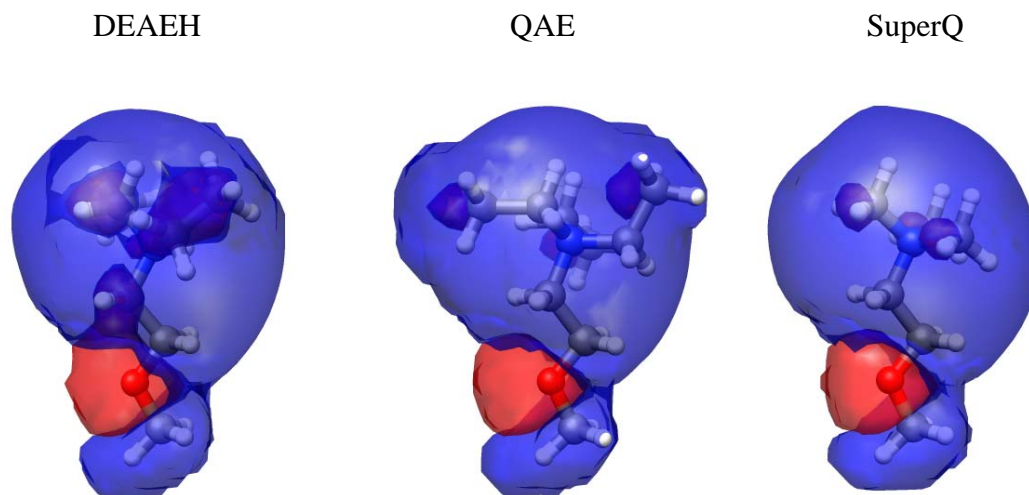


Abbildung 5.3: Vergleich der Oberfläche des elektrostatischen Potentials bei -2 kT (rot) und +2 kT (blau) der positiv geladenen Anionenaustauscherliganden DEAE in protonierter Form, QAE und SuperQ. Das Potenzial ist bei allen Liganden annähernd gleich.

Im Vergleich von protonierter und deprotonierter Form des DEAE Liganden liegt der Hauptanteil der positiven Ladung am angefügten Atom H18 der protonierten Form sowie der abgeschwächten negativen Ladung des Stickstoffatoms N1. Der Rest der positiven Ladung verteilt sich über die Wasserstoffatome. Der Zugewinn der Ladung zeigt sich auch am stärkeren positiven elektrostatischen Potenzial bei der protonierten Form (Abbildung 5.4) im Bereich um das Atom N1 des Liganden. Die Unterschiede im elektrostatischen Potenzial des unteren terminalen Bereichs des Liganden sind gering. Die größte negative Ladung befindetet jeweils am Sauerstoffatom O1.

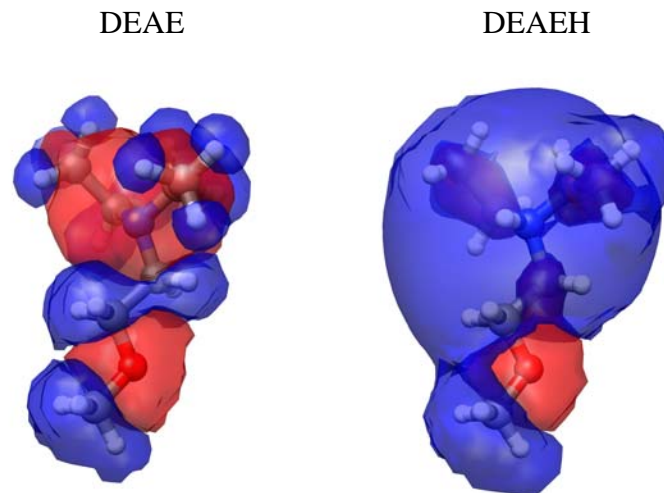


Abbildung 5.4: Vergleich der Oberfläche des elektrostatischen Potentials bei  $-2$  kT (rot) und  $+2$  kT (blau) der protonierten (DEAEH) und deprotonierten Form (DEAE) des Anionenaustauscherliganden DEAE. Die Abweichungen im oberen Bereich sind hoch, während die Unterschiede im unteren Bereich gering sind.

### 5.1.2 Parametrisierung von Kationenaustauscherliganden

Es wurden die Ladungen für die Struktur des starken Kationenaustauscherliganden Source 15S mittels *ab initio*-Methoden berechnet. Die Gesamtladung beträgt -1.

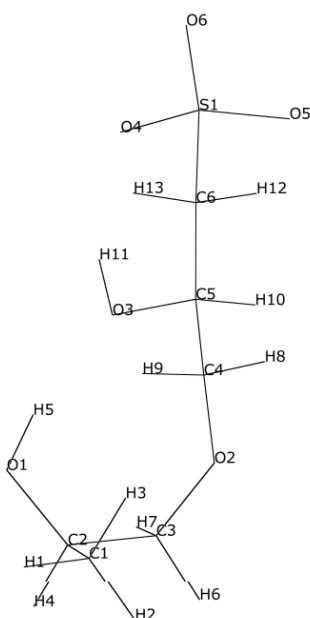


Abbildung 5.5: Minimierte Struktur des Modells des Kationenaustauscherliganden Source 15S.

ATOMNAME	ATOMTYP	SOURCE15S
C1	CT	-0.18708
H1	HC	0.04045
H2	HC	0.04045
H3	HC	0.04045
C2	CT	0.31086
O1	OH	-0.67492
H5	HO	0.40690
H4	H1	0.01608
C3	CT	-0.00102
H6	H1	0.04486
H7	H1	0.04486
O2	OS	-0.36985

Tabelle 5.2: Berechnete Ladungen des Kationenaustauscherliganden Source 15S

ATOMNAME	ATOMTYP	SOURCE15S
C4	CT	0.02815
H8	H1	0.07509
H9	H1	0.07509
C5	CT	0.15734
O3	OH	-0.53816
H11	HO	0.38265
H10	H1	0.08478
C6	CT	-0.31084
H12	H1	0.09656
H13	H1	0.09656
S1	S	1.18119
O4	O2	-0.68015
O5	O2	-0.68015
O6	O2	-0.68015

Tabelle 5.2: Berechnete Ladungen des Kationenaustauscherliganden Source 15S

Die stärkste negative Ladung befindet sich an den Sauerstoffatomen der Sulfatgruppe O4, O5 und O6 (Tabelle 5.2). Auch das stärkste negative elektrostatische Potenzial befindet sich somit in diesem Bereich (Abbildung 5.6). Die stärkste positive Ladung befindet sich am Schwefelatom S1. Die positive Ladung wird von den negativ geladenen Sauerstoffatomen abgeschirmt.

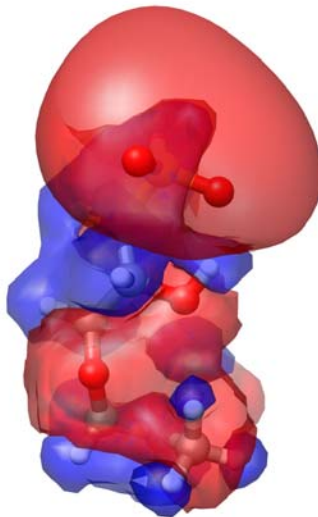


Abbildung 5.6: Oberfläche des elektrostatischen Potentials bei -2 kT (rot) und +2 kT (blau) des negativ geladenen Kationenaustauscherliganden Source 15S. Der Bereich des stärksten negativen elektrostatischen Potentials befindet sich im Bereich der Sulfatgruppe.

## 5.2 Wechselwirkungen von Lysozym mit Kationenaustauschern

Bisher wurden experimentelle Daten zur Orientierung von Proteinen auf chromatografischen Oberflächen nur ungenau bestimmt. Im Rahmen eines BMBF-Projekts gelang der Arbeitsgruppe um Jürgen Hubbuch am FZ Jülich eine Bestimmung der Orientierung von Lysozym auf Kationenaustauschern mittels Fluoreszenzlabelmarkierung und MALDI-TOF-Analyse [50]. Diese wurde zur Validierung der ermittelten Daten herangezogen. Im Folgenden wurde zum einen eine Methode untersucht, die der bisherigen Herangehensweise zur theoretischen Bestimmung der Orientierung entsprechend, keine Flexibilität im Modell des Proteins miteinbezieht. Interaktionsenergien des Proteins in atomarer Auflösung werden in verschiedenen Orientierungen und Abständen mit einer Oberfläche aus Punktladungen, welche die Liganden des Ionenaustauschers repräsentieren, berechnet (im weiteren Verlauf als „starre Methode“ bezeichnet). Zum anderen wurde eine neu entwickelte Methode, welche die Adsorption über eine MD-Simulation berechnet und somit die Flexibilität sowohl des Proteins, als auch der Ligandenmoleküle in atomarer Auflösung integriert (im weiteren Verlauf als „flexible Methode“ bezeichnet), angewandt.

### 5.2.1 Berechnung des elektrostatischen Potentials von Lysozym und Einteilung der Oberfläche in positive *patches*

Durch die visuelle Analyse des elektrostatischen Potentials von Lysozym bei pH 7 konnten 5 positive *patches*, verteilt über die Oberfläche des Proteins, bestimmt werden (Abbildung 5.7). Die größten *patches* *patch* 1 und *patch* 2 befinden sich auf entgegengesetzten Seiten des Proteins. *Patch* 1 liegt am C-Terminus und besteht aus den Aminosäuren Arg5, Ly13, Arg14, Lys33, Arg125 und Arg128. *Patch* 2 besteht aus Arg45, Arg61, Arg68 und Arg73. Die *patches* mittlerer Größe sind *patch* 3 mit den Aminosäuren Arg112, Arg114 und Lys116, sowie *patch* 4 mit Arg21, Lys96 und Lys97. Der kleinste *patch* 5 besteht aus dem positiv geladenen N-terminalen Lys1.

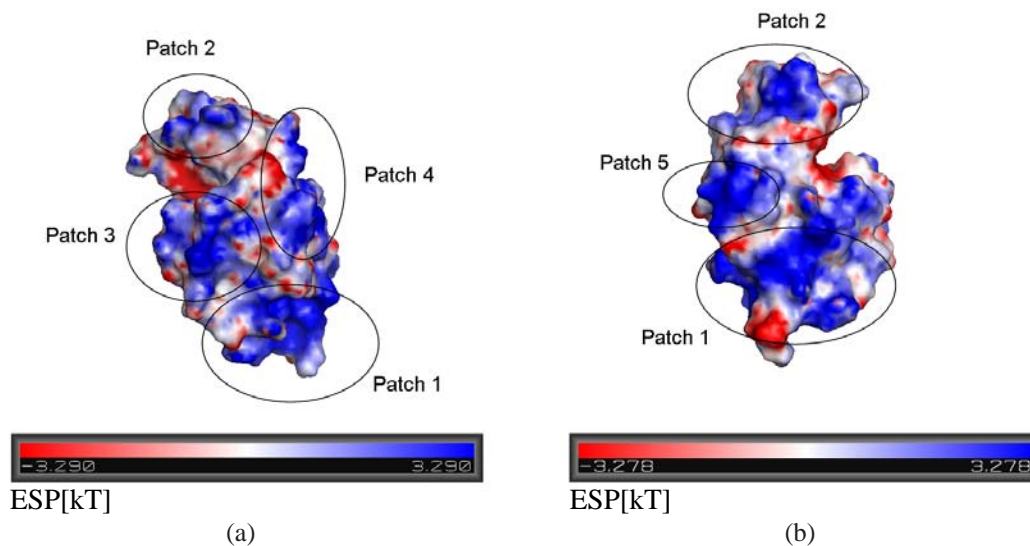


Abbildung 5.7: Einteilung der *patches* über das elektrostatische Potenzial (ESP) von Lysozym (PDB-Eintrag: 132L). Dargestellt sind (a) Vorderansicht und (b) Rückansicht des Proteins.

### 5.2.2 Berechnung der bevorzugten Orientierung von Lysozym auf Kationenaustauschern über elektrostatische Bindungsenergien (starre Methode)

Zur Bestimmung der Orientierung wurden zwei verschiedene Strukturen verwendet. Zum einen der erste Eintrag der NMR-Strukturen aus dem PDB-Eintrag 1E8L [163], welcher im weiteren Verlauf als Struktur I bezeichnet wird, zum anderen eine Kristallstruktur 132L [206],

## 5 Ergebnisse

im weiteren Verlauf als Struktur II bezeichnet (Abbildung 5.8). Die *root-mean-square deviation* (RMSD) des *backbone* zwischen beiden Strukturen beträgt 1.26 Å. Speziell die Struktur des C-Terminus unterscheidet beide Strukturen voneinander. Er ist bei Struktur I dem Protein zugewandt, während er bei Struktur II vom Protein abgewandt ist. Bei der Untersuchung weiterer 252 NMR- und Röntgenstrukturen der PDB wurde keine Zuwendung des C-Terminus zum Protein wie bei Struktur II festgestellt (siehe Anhang 8.6).

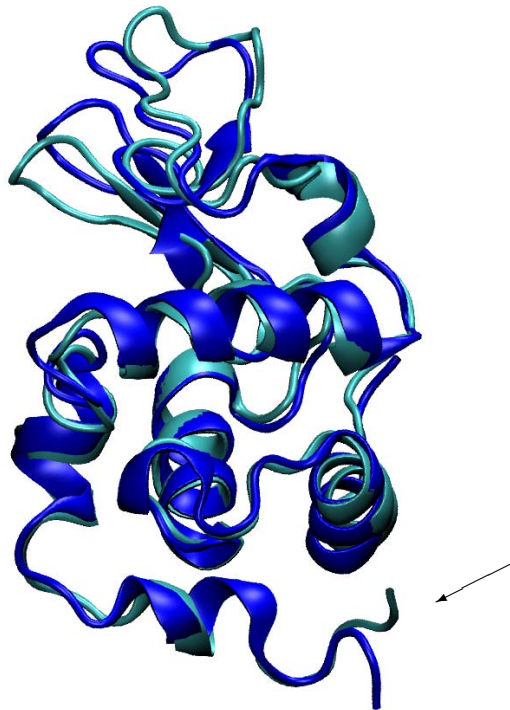


Abbildung 5.8: Überlagerte Sekundärstrukturen der verwendeten PDB-Einträge von 1E8L (grün) und 132L (blau). Der C-terminale Bereich wurde mit einem Pfeil markiert.

Für die Bestimmung der bevorzugten Orientierung auf einem Kationenaustauschermaterial wurden 312 Orientierungen, jeweils mit beiden Strukturen, für 5 verschiedene Abstände zur Oberfläche erzeugt und die elektrostatischen Bindungsenergien für jede Orientierung berechnet (Abbildung 5.9).



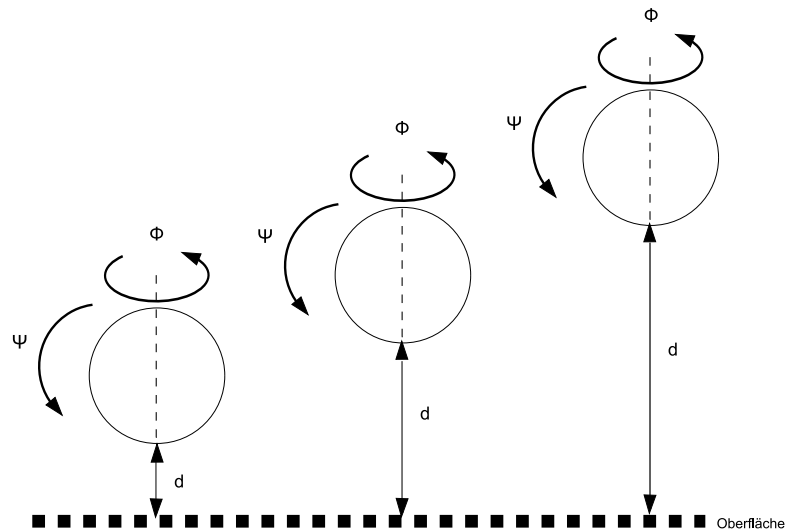


Abbildung 5.9: Skizziertes Schema der Generierung verschiedener Orientierungen und Abstände des Proteins über der Oberfläche. Für jeden Abstand  $d$  zur Oberfläche wurden die elektrostatischen Bindungsenergien für 312 Orientierungen berechnet. Die Orientierungen wurden durch das Drehen der Proteinstruktur um die Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$  erzeugt.

Die berechneten Bindungsenergien waren generell positiv (Abbildungen 5.10 und 5.11). Die Energieminima für beide Proteinstrukturen befanden sie sich im Bereich der *patches* 1, 2 und 5. Orientierungen der Energiemaxima befanden sich im Bereich der *patches* 3 und 4. Struktur I zeigte eine Abhängigkeit der Orientierung des globalen Energieminimums vom Abstand des Proteins zur Oberfläche. Das globale Energieminimum beim Abstand von  $20 \text{ \AA}$  entsprach einer Bindung über *patch* 2, während bei einem Abstand von  $1 \text{ \AA}$  die Bindung über die Region zwischen *patch* 1 und 5 bevorzugt wurde. Die Orientierungen lagen für den größten und kleinsten Abstand des Proteins zur Oberfläche auf gegenüberliegenden Seiten des Proteins. Gleichartige Ergebnisse wurden für die Orientierung des mittleren energiegewichteten Moments für unterschiedliche Abstände erhalten. Die Orientierung der globalen Minima bei Struktur II binden bei allen Abständen über *patch* 1. Die Orientierung der mittleren energiegewichteten Momente waren abhängig vom Abstand und entsprachen einer Bindung über *patch* 5 bei einem Abstand von  $20 \text{ \AA}$  und über *patch* 1 bei einem Abstand von  $1 \text{ \AA}$ .

Die Orientierung des globalen Energieminimums, die des mittleren energiegewichteten Moments und die experimentelle Orientierung war für Struktur I am ähnlichsten für kleine Abstände. Mittels des globalen Energieminimums hatte die beste Vorhersage eine Abweichung von  $5^\circ$  vom experimentellen Wert bei einem Abstand von  $5 \text{ \AA}$ . Die beste Vorhersage über das mittlere energiegewichtete Moment wurde bei einem Abstand von  $1 \text{ \AA}$  mit einer Abwei-

## 5 Ergebnisse

chung von  $46^\circ$  gemacht. Im Gegensatz dazu waren die besten Vorhersagen über das globale Energieminimum mit Struktur II bei über  $15 \text{ \AA}$ .

Im Vergleich zu den ermittelten *patches* zeigt sich, dass nach diesem Bestimmungsverfahren die Orientierungen der *patches* 1, 2 und 5 in Richtung der Adsorberoberfläche bevorzugt werden. Die bevorzugte Orientierung der experimentellen Bestimmung liegt im Bereich des *patch* 1.

Für alle Distanzen wurde von den jeweiligen Bindungsenergien der unterschiedlichen Orientierungen das globale Minimum bestimmt und die Richtung des mittleren energiegewichteten Moments, welches sich aus der Verteilung der gesamten Bindungsenergien ergibt. Für diese Werte wurde der abweichende Winkel zur experimentell festgestellten Orientierung berechnet (Abbildung 5.12). Mit  $153^\circ$  liegt für die Berechnung bei höheren Distanzen ( $15$  und  $20 \text{ \AA}$ ) das globale Minimum von Struktur I in etwa gegenüber vom experimentell ermittelten Wert. Das globale Minimum liegt im Bereich des *patch* 2 (Abbildung 5.10). Bei näheren Distanzen ( $1$ ,  $5$  und  $10 \text{ \AA}$ ) liegt es im Areal zwischen *patch* 1 und *patch* 5, mit Abweichungen vom experimentellen Wert zwischen  $25^\circ$  und  $53^\circ$ . Das globale Minimum der Struktur II hingegen liegt bei höheren Distanzen von  $15 \text{ \AA}$  und  $20 \text{ \AA}$  mit  $22^\circ$  bzw.  $26^\circ$  näher am experimentellen Wert. Diese Orientierung liegt auch im Bereich des *patch* 1 (Abbildung 5.11). Für die Distanzen  $5 \text{ \AA}$  und  $10 \text{ \AA}$  bei einer Abweichung von  $47^\circ$  und  $60^\circ$  vom experimentell ermittelten Wert liegen diese im Bereich zwischen *patch* 1 und 5. Bei einer Distanz von  $1 \text{ \AA}$  liegt das globale Minimum wiederum im *patch* 1 mit  $35^\circ$  Abweichung.

Die Abweichung der Richtung des mittleren energiegewichteten Moments vom experimentell ermittelten Wert ist für beide Strukturen bei der größten Distanz von  $20 \text{ \AA}$  am höchsten und nimmt dann fast linear bis zur kleinsten Distanz von  $1 \text{ \AA}$  ab (Abbildung 5.12). Für Struktur I ist die Abweichung  $103^\circ$  bei der größten Distanz  $20 \text{ \AA}$ , was noch im Bereich des *patch* 2 liegt. Je geringer die Distanz ist, desto näher liegt die Richtung des Moments von dieser Position aus an der experimentellen Orientierung (Abbildung 5.10). Bei der kürzesten Distanz von  $1 \text{ \AA}$  beträgt die Abweichung noch  $46^\circ$ , was einer Orientierung der Bindungsregion mit dem Bereich zwischen *patch* 2 und *patch* 1 entspricht (Abbildung 5.11). Struktur II weicht bei größter Distanz um  $77^\circ$  ab und liegt im Bereich des *patch* 5 (Abbildung 5.11). Auch hier ist die Abweichung von dieser Orientierung aus mit kürzerer Distanz näher an der experimentellen Orientierung. Für die kürzeste Distanz von  $1 \text{ \AA}$  beträgt die Abweichung nur noch  $5^\circ$ .

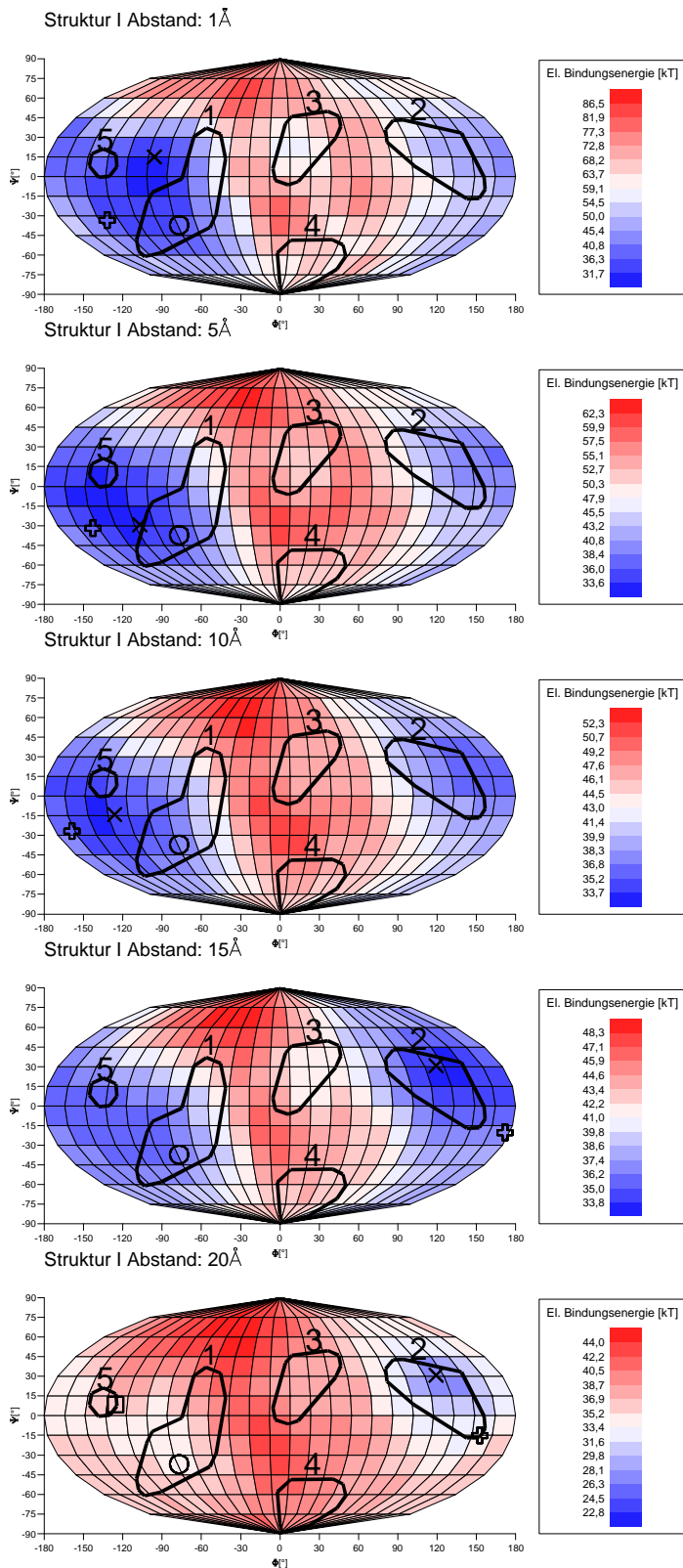


Abbildung 5.10: Elektrostatische Bindungsenergien von Struktur I bei 312 verschiedenen Orientierungen und 5 Distanzen für Struktur I. Die schwarz umrahmten *patches* sind entsprechend nummeriert. Dargestellt sind das globale Energieminimum ( $\times$ ), die Richtung des mittleren energiegewichteten Moments ( $+$ ) und die experimentell bestimmte Orientierung ( $\circ$ ).

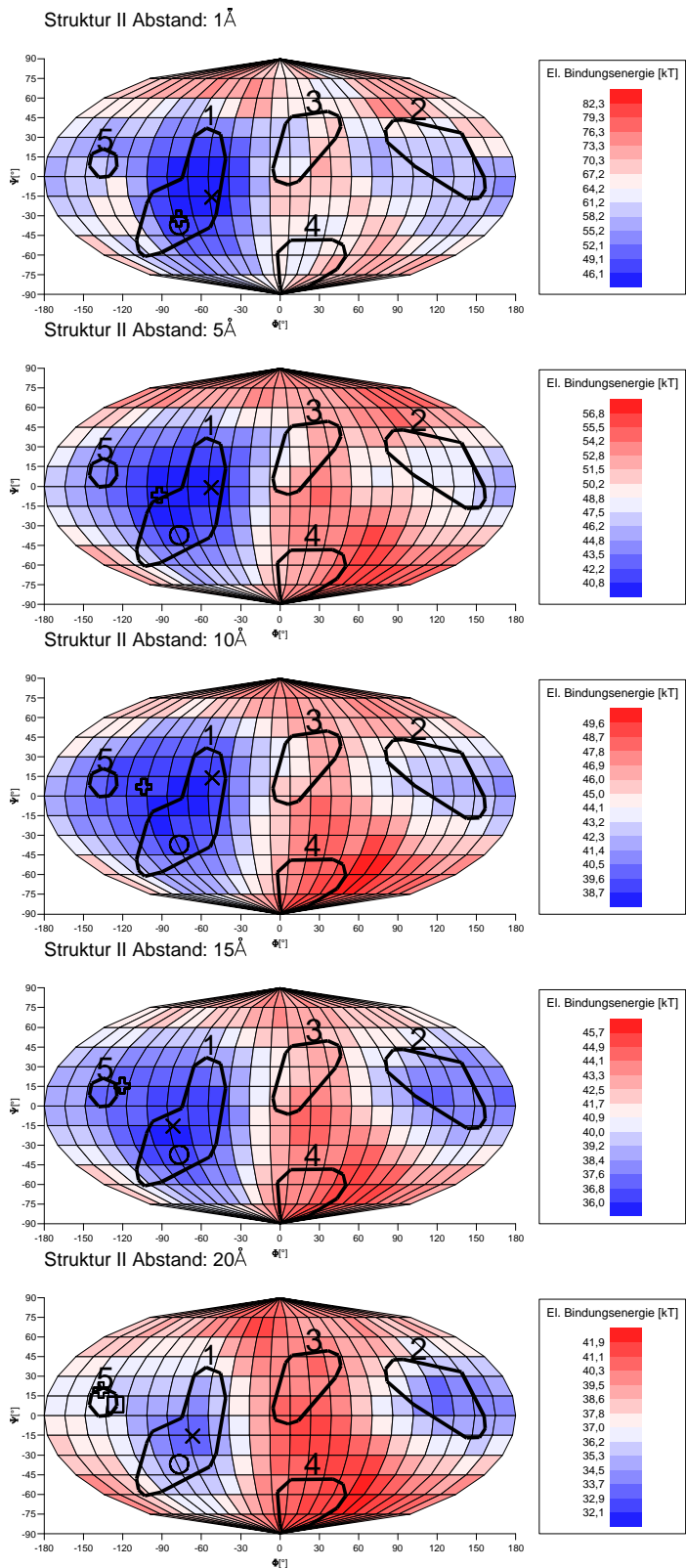


Abbildung 5.11: Elektrostatische Bindungsenergien von Struktur II bei 312 verschiedenen Orientierungen und 5 Distanzen für Struktur II. Die schwarz umrahmten *patches* sind entsprechend nummeriert. Dargestellt sind das globale Energieminimum (×), die Richtung des mittleren energiegewichteten Moments (+) und die experimentell bestimmte Orientierung (⊙).

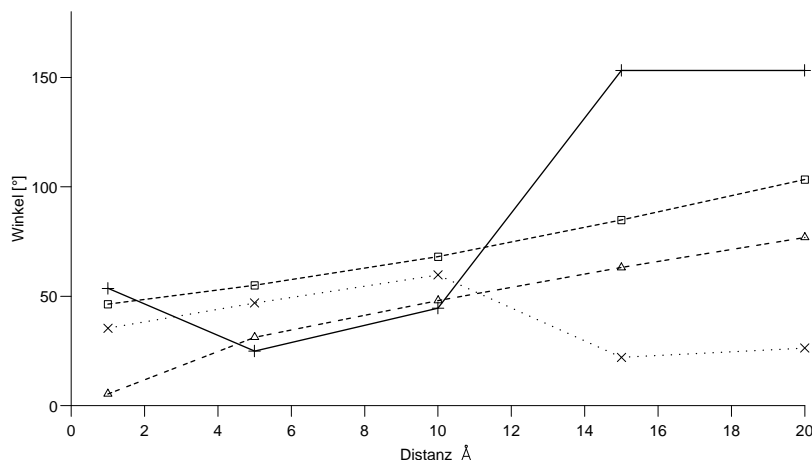


Abbildung 5.12: Abweichender Winkel der berechneten Orientierungen von der experimentellen Orientierung im Vergleich zu der Distanz bei der dieser bestimmt wurde. +: Globales Minimum von Struktur I, ×: Globales Minimum von Struktur II, □: Richtung des mittleren energiegewichteten Moments von Struktur I, Δ: Richtung des mittleren energiegewichteten Moments von Struktur II.

### 5.2.3 Simulation der Bindung von Lysozym an einen Kationenaustauscher (flexibles Modell)

Um die Rolle der Flexibilität bei der Adsorption von Lysozym auf einem Kationenaustauscher zu untersuchen, wurden MD-Simulationen mit Struktur I und II durchgeführt. Es wurden für Struktur I und II jeweils 14 verschiedene Orientierungen bei einer Distanz von 25 Å vom Adsorber als Startbedingungen gewählt. Während der MD-Simulation veränderte sich die Orientierung des Proteins vom Zustand zu Beginn der MD-Simulation bis zum gebundenen Zustand (Abbildung 5.13). Das Protein erreichte die Oberfläche innerhalb der ersten 250 ps Simulationszeit, außer bei einer MD-Simulation von Struktur II (f), die nach 300 ps die Oberfläche erreichte (siehe Anhang 8.1). Nach 500 ps wurde im Anschluss an die MD-Simulation die Orientierung des gebundenen Proteins bestimmt. Es wurden keine Reorientierungen des Proteins während der letzten 50 ps bei allen MD-Simulationen vor diesem Zeitschritt festgestellt. Zu Beginn der MD-Simulationen gab es aufgrund der zuvor durchgeführten *restraint-phase* noch leichte Änderungen der potenziellen, kinetischen und damit auch der gesamten Energie

## 5 Ergebnisse

des Systems (Anhang 8.7 und 8.8). Die Temperaturen der MD-Simulationen waren während der gesamten Zeitdauer stabil bei 300 K (Anhang 8.5 und 8.6). Die Strukturen zeigten während der MD-Simulationen unterschiedliche Abweichungen im Vergleich zur Startstruktur. Zur Quantifizierung wurden die RMSD-Werte zwischen der aktuellen Struktur und der Startstruktur berechnet (Anhang 8.10). Die RMSD-Werte blieben stabil und bei allen Simulationen unter  $2.5 \text{ \AA}$ , mit Ausnahme der MD-Simulation (I) (Anhang 8.10(I)), bei der die RMSD-Werte bis auf  $2.8 \text{ \AA}$  anstiegen.

Die detektierten Bindungsorientierungen beider MD-Simulationen bedecken ein großes Areal der Proteinoberfläche, welches einer Bindung mit dem Bereich des *patch* 1 und den Bereichen zwischen *patch* 1 und *patch* 3, 4 und 5 entspricht (Abbildung 5.13). Die Areale der detektierten Bindungsorientierungen beim Vergleich der MD-Simulationen beider Strukturen überschneiden sich. Beide Strukturen binden jeweils mit *patch* 1 und dem Areal zwischen *patch* 1 und *patch* 5. Die Bindungsorientierungen, bei welchen mit dem Areal zwischen *patch* 1 und *patch* 4 gebunden wird, treten nur bei MD-Simulationen mit Struktur I auf, während die Bindungsorientierungen mit dem Areal zwischen *patch* 1 und 3 nur bei den MD-Simulationen mit Struktur II festgestellt wurden. Die Bindungsbereiche beider Strukturen decken den Bereich der experimentell bestimmten Orientierung ab.

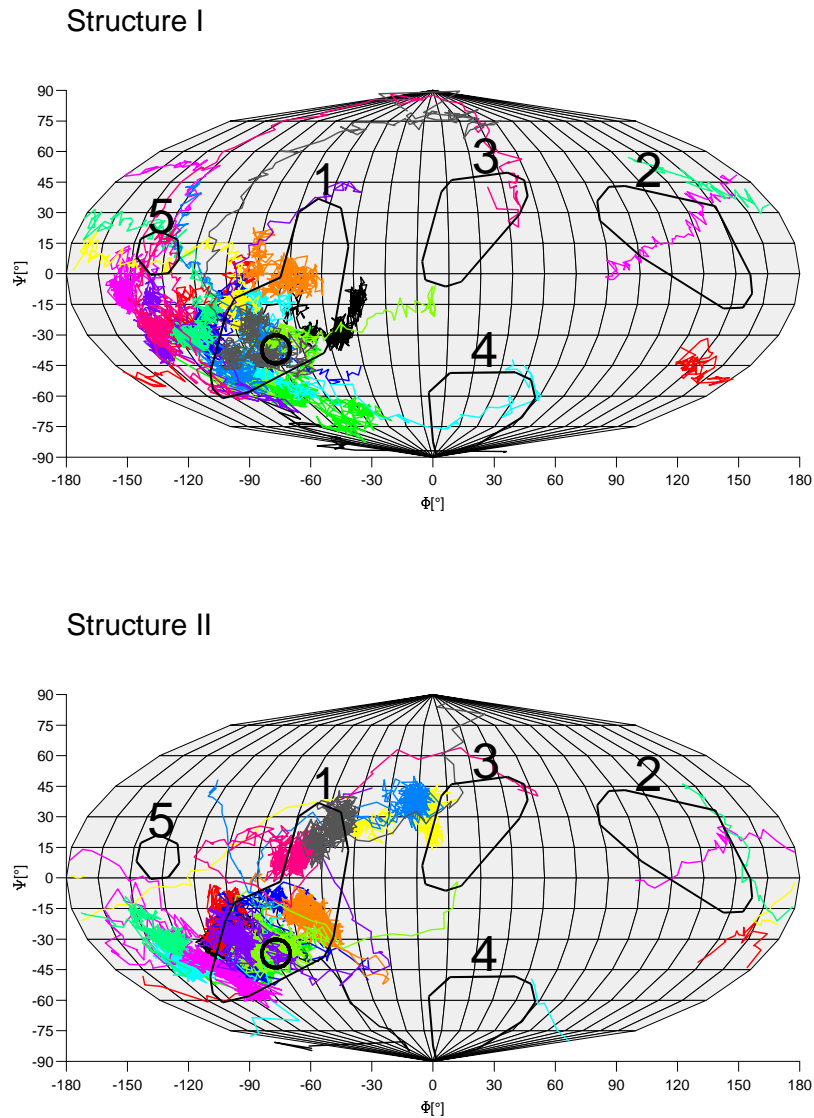


Abbildung 5.13: Änderung der Orientierung im Bezug zur Adsorberebene von Struktur I und Struktur II im Verlauf der MD-Simulationen (farbige Linien, siehe Anhang 8.1). Die Distanz zu Beginn betrug  $25 \text{ \AA}$ . Die *patches* sind entsprechend ihrer Einteilung nummeriert und die experimentell ermittelte Orientierung ( $\circ$ ) gekennzeichnet.

Für die gebundenen Orientierungen nach der Simulation wurden die elektrostatischen Bindungsenergien berechnet (Abbildung 5.14). Die höchsten Bindungsenergien traten im Bereich der vorhergesagten, experimentell bestimmten Bindungsregion auf. Zusätzlich wurde die ge-

## 5 Ergebnisse

mittelte Orientierung für die jeweilige Struktur aus den jeweiligen Orientierungen berechnet. Die stärksten Bindungsenergien wurden hauptsächlich im Bereich des *patch* 1, in direkter Umgebung der experimentell bestimmten Orientierung, beobachtet. Die gemittelten Orientierungen hatten eine Abweichung von  $16^\circ$  für Struktur I und  $18^\circ$  für Struktur II. Die maximale Abweichung einer Simulation vom experimentellen Wert betrug  $62^\circ$ .

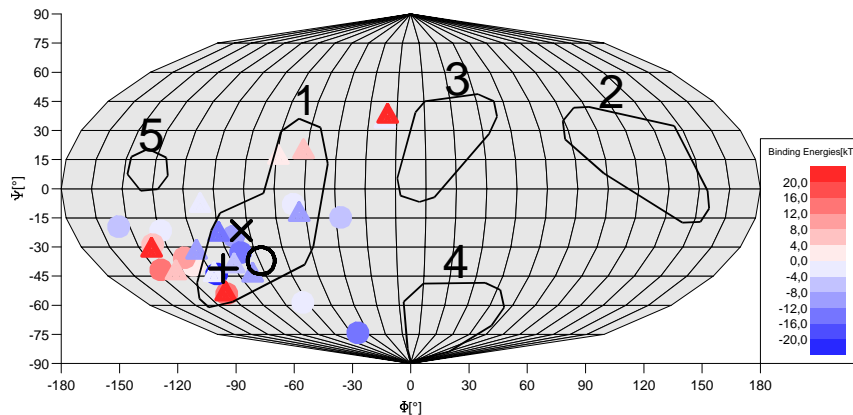


Abbildung 5.14: Orientierung nach der Bindung und elektrostatische Bindungsenergien von Struktur I (●) und Struktur II (▲). Die gemittelten Bindungsorientierungen sind für Struktur I (+), Struktur II (×) dargestellt und die *patches* entsprechend ihrer Einteilung nummeriert. Die experimentell bestimmte Orientierung (○) ist gekennzeichnet.

Die Orientierungen der MD-Simulationen mit Struktur II wurden im Anschluss an die erste Simulation angehoben und für weitere 500 ps simuliert. Diese Prozedur wurde vier Mal wiederholt. Die Distanzen wurden dabei von  $25 \text{ \AA}$  bei der ersten Simulation auf  $20$ ,  $15$ ,  $10$  und  $5 \text{ \AA}$  verringert. Dadurch wurde überprüft, ob sich bei Verminderung der Distanz eine Konvergenz hin zu einem stärker eingeschränkten Bindungsareal oder einer spezifischen Bindungsorientierung ergeben würde. Bei allen MD-Simulationen mit wiederholt angehobener Proteinstruktur waren die Energiewerte stabil (Anhang 8.14 - 8.16). Die RMSD-Werte waren stabil und blieben unter  $2.5 \text{ \AA}$  (Anhang 8.17 - 8.19). Die Ergebnisse zeigen, dass der Bereich der Binderegion nicht verringert wurde und somit wurde auch keine Konvergenz festgestellt (Anhang 8.11 - 8.13). Die Orientierungen änderten sich nur innerhalb der Region und um den *patch* 1 (Anhang 8.2). Bei MD-Simulationen mit einem Abstand von  $5 \text{ \AA}$  des Proteins zur Oberfläche war das Protein nicht mehr in der Lage, frei und in ausreichender Zeit vor der Bindung zu rotieren. Die Berechnungen der elektrostatischen Bindungsenergien zeigten eine



Präferenz für die experimentell ermittelte Bindungsorientierung (Abbildung 5.15). Die gemittelte Orientierung änderte sich im Vergleich zur ersten Simulation nur unmerklich ( $\pm 5^\circ$ ).

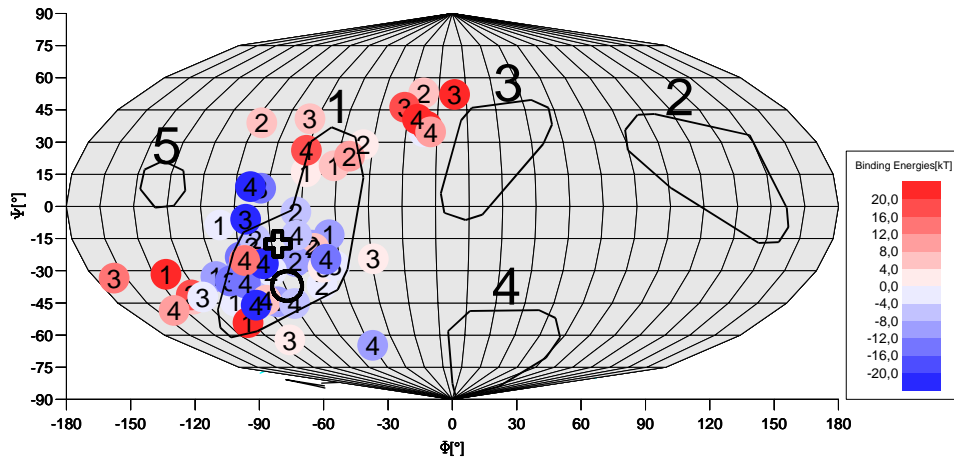


Abbildung 5.15: Farblich dargestellt sind die Orientierungen und deren Bindungsenergien nach MD-Simulationen von Struktur II bei Startdistanzen von 25(1), 20(2), 15(3) und 10(4) Å. Die daraus ermittelte gemittelte Bindungsorientierung (+) und die experimentell bestimmte Orientierung (○) sind gekennzeichnet. Die *patches* sind entsprechend ihrer Einteilung nummeriert.

Es wurde ein quantitativer Vergleich der verschiedenen MD-Simulationen von Struktur II zueinander über einen 2D RMSD erstellt (Abbildung 5.16). Die Strukturen der ersten drei Simulationen blieben bei den meisten Simulationen stabil unter 3.0 Å. Erst zum Ende der 4. Simulation hin wurden strukturelle Unterschiede  $> 3.0$  Å bei etwa der Hälfte der Simulationen festgestellt. Diese Unterschiede ließen sich jedoch nicht vereinheitlichen, sondern bestanden aus verschiedenen strukturellen Abweichungen an der Proteinoberfläche.

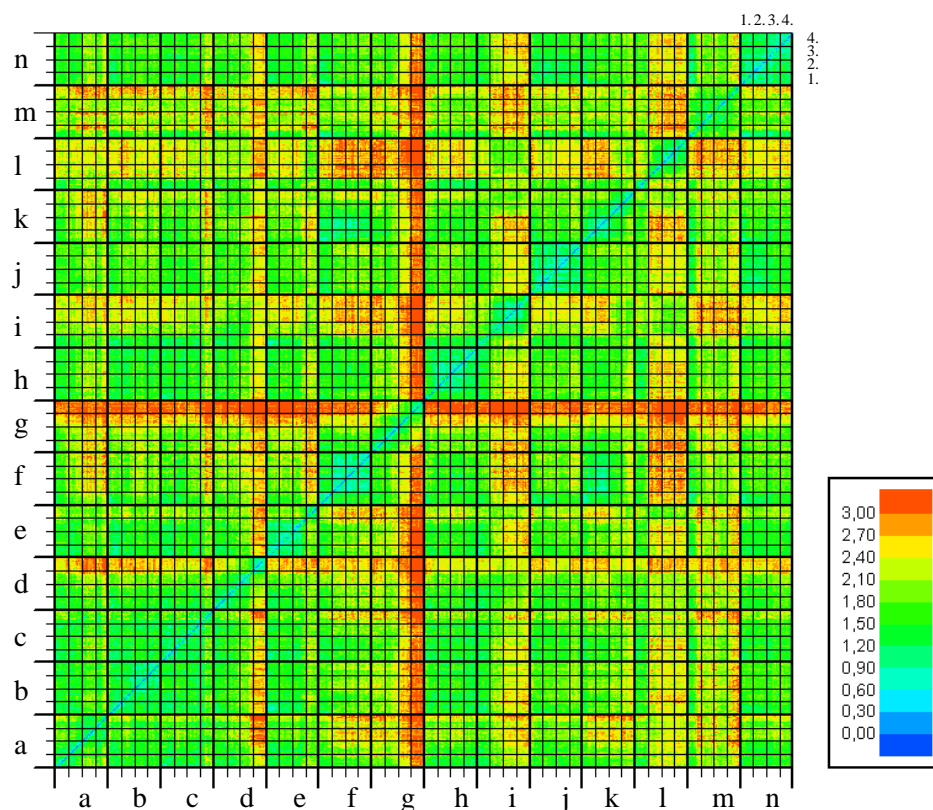


Abbildung 5.16: Vergleich der wiederholten MD-Simulationen über einen 2D RMSD. Die grobe Einteilung des Rasters erfolgt nach der ursprünglichen Ausgangsorientierung, die feinere Einteilung unterscheidet die erste und die daraufhin wiederholten MD-Simulationen (Index oben rechts, Zuordnung der Buchstaben siehe Anhang 8.1). Größere Unterschiede ( $> 3 \text{ \AA}$ ) traten etwa bei der Hälfte der MD-Simulationen erst bei der 4. MD-Simulation mit  $10 \text{ \AA}$  Abstand zur Ligandenebene auf.

Die Auswirkungen der Einbeziehung der Flexibilität beim Bindungsprozess und die dadurch entstandenen Veränderungen der Proteinstruktur wurden einer detaillierten visuellen Überprüfung unterzogen. Bei MD-Simulationen, welche nahe der experimentell präferierten Region endeten, geschah der Adsorptionsprozess ähnlich (Abbildung 5.17). Er fand hier durch den positiv geladenen *patch* 1 im Bereich der C-terminalen Region statt. Arg128 startete mit seiner Bindung den Adsorptionsprozess, danach folgte Arg125. Nach diesen ersten Bindungen folgte der N-terminale Bereich des Proteins durch Bindung der Aminosäuren Arg5 und Lys1. Für diesen Vorgang war ein Abwinkeln des N-Terminus zwischen Val2 und Phe3 nötig. Auch eine Rotation der kompletten Proteinstruktur in Richtung des N-Terminus wurde dabei beobachtet.

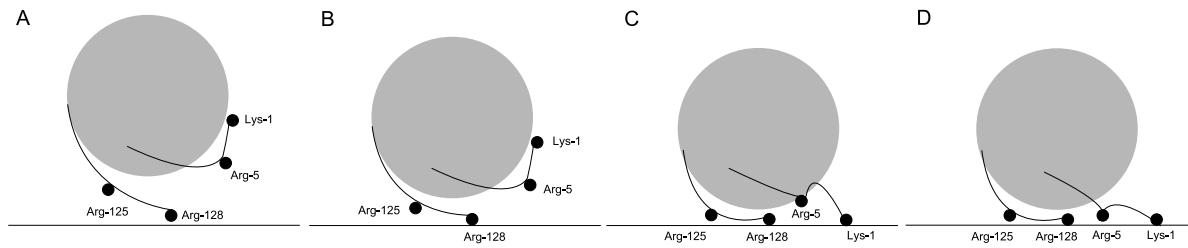


Abbildung 5.17: Skizzierter Adsorptionsprozess der MD-Simulationen von Lysozym im Bereich der präferierten Region. Der erste Kontakt erfolgte mit dem C-terminalen Bereich. Später folgte der N-Terminus durch ein Abwinkeln in der Sekundärstruktur und Rotation der kompletten Proteinstruktur.

## 5.3 Wechselwirkungen von Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit Anionenaustauschern

### 5.3.1 Modellierung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit *linker*

Bei den vorliegenden Kristallstrukturen der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne liegt der C-terminale *linker*-Bereich, welcher im exprimierten Protein vorhanden ist, nicht vor. Deshalb wurden die fehlenden Strukturbereiche modelliert. Zunächst wurden alle vorhandenen PDB-Einträge von P450-BM3 Monooxygenasen auf eine möglichst hohe Abdeckung der gesuchten Sequenz untersucht. Der Eintrag 1JPZ [74] enthielt hierbei die größte Sequenzähnlichkeit bei gleichzeitig maximal enthaltenen Strukturinformationen (Abbildung 5.18).

## 5 Ergebnisse

1JPZ	TIKEMPQPKTFGELKKNLPLLNTDKPVQALMKIADELGEIFKFEAPGRVTRYLSSQRLIKEACDES	65
Target	TIKEMPQPKTFGELKKNLPLLNTDKPVQALMKIADELGEIFKFEAPGRVTRYLSSQRLIKEACDES	65
1JPZ	RFDKNLSQALKFVRDFAGDGLFTSWTHEKNWKKAHNILLPSFSQQAMKGYHAMMVDIAVQLVQKW	130
Target	RFDKNLSQALKFVRDFAGDGLFTSWTHEKNWKKAHNILLPSFSQQAMKGYHAMMVDIAVQLVQKW	130
1JPZ	ERLNADEHIEVPEDMTRLTLDTIGLCGFNYRFNSFYRDQPHPFITSMVRALDEAMNKLQRANPDD	195
Target	ERLNADEHIEVPEDMTRLTLDTIGLCGFNYRFNSFYRDQPHPFITSMVRALDEAMNKLQRANPDD	195
1JPZ	PAYDENKRQFQEDIKVMNDLVDKIIADRKASGEQSDDLLTHMLNGKDPETGEPLDDENIRYQIIT	260
Target	PAYDENKRQFQEDIKVMNDLVDKIIADRKASGEQSDDLLTHMLNGKDPETGEPLDDENIRYQIIT	260
1JPZ	FLIAGHETTSGLLSFALYFLVKNPHVLQKAAEEAARVLVDPVPSYKQVKQLKYVGMVLNEALRLW	325
Target	FLIAGHETTSGLLSFALYFLVKNPHVLQKAAEEAARVLVDPVPSYKQVKQLKYVGMVLNEALRLW	325
1JPZ	PTAPAFSLYAKEDTVLGGEYPLEKGDDELMVLIPQLHRDKTIWGDDVEEFRPERFENPSAIPQHAF	390
Target	PTAPAFSLYAKEDTVLGGEYPLEKGDDELMVLIPQLHRDKTIWGDDVEEFRPERFENPSAIPQHAF	390
1JPZ	KPFNGQRACIGQQFALHEATLVLGMMMLKHFDFFEDHTNYELDIKETLTLKPEGFVVKAKSKKIPL	455
Target	KPFNGQRACIGQQFALHEATLVLGMMMLKHFDFFEDHTNYELDIKETLTLKPEGFVVKAKSKKIPL	455
1JPZ	GGI..... 458	
Target	GGI <b>PSPSTEQSAKKVR</b> 471	

Abbildung 5.18: *Alignment* der *template*-Sequenz der PDB-Struktur 1JPZ [74] und der *target*-Sequenz der experimentell verwendeten P450-BM3 Monooxygenase. Farblich gekennzeichnet sind Aminosäuren des *template* mit fehlenden Seitenketten (rot) und die fehlenden Aminosäuren am C-Terminus (grün).

Fehlende Aminosäuren am C-terminalen Bereich und fehlende Seitenketten der Aminosäuren 1 bis 4 und 229 enthielt die Kette A, während die Seitenketten der Aminosäuren 228 und 229 bei Kette B fehlten. Aufgrund der geringsten Abweichungen wurde die Struktur 1JPZ Kette B zur weiteren Modellierung ausgewählt (Abbildung 5.18).

Der PROSA-Qualitäts-Check zeigt, dass das Modell der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit *linker* von guter Qualität ist. Sämtliche Interaktionsenergien der Aminosäuren mit dem restlichen Protein sind negativ (Abbildung 5.19) und ähnlich den Energien der *template*-Struktur. Der PROSA-Z-score entspricht mit -12.94 dem Bereich des theoretisch vorhergesagten Wertes (-13.31).

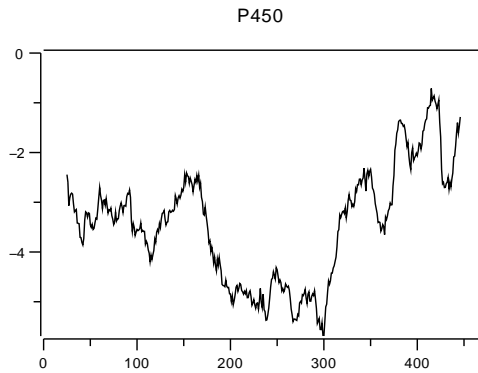


Abbildung 5.19: PROSA 2003-Energie-Plot des Modells der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit *linker*. Das Diagramm repräsentiert die Interaktionsenergien der Aminosäuren. Negative Werte entsprechen stabilen Regionen des Proteins.

### 5.3.2 Simulation der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit *linker*

Da für den C-terminalen Bereich keine *template*-Sequenzen zur Verfügung standen, wurde die modellierte Struktur aus 5.3.1 einer MD-Simulation unterzogen.

Die Reorientierung des C-Terminus erfolgte innerhalb von 180 ps und blieb während der folgenden Simulationsdauer von 900 ps stabil. Im Vergleich zur Struktur bei 180 ps blieben die RMSD-Werte des *backbone* der folgenden Simulationsdauer unter einem Wert von 2.3 Å. Der C-Terminus lagerte sich im Verlauf der Reorientierungsphase an die D-Helix der P450-BM3-Hämdomäne an (Abbildung 5.20). Der PROSA-Qualitäts-Check zeigt, dass sich das Modell der P450-BM3-Hämdomäne mit *linker* nach der MD-Simulation im C-terminalen Bereich verbessert hat (Abbildung 5.21). Die Energien sind dort negativer als im Modell vor der MD-Simulation.

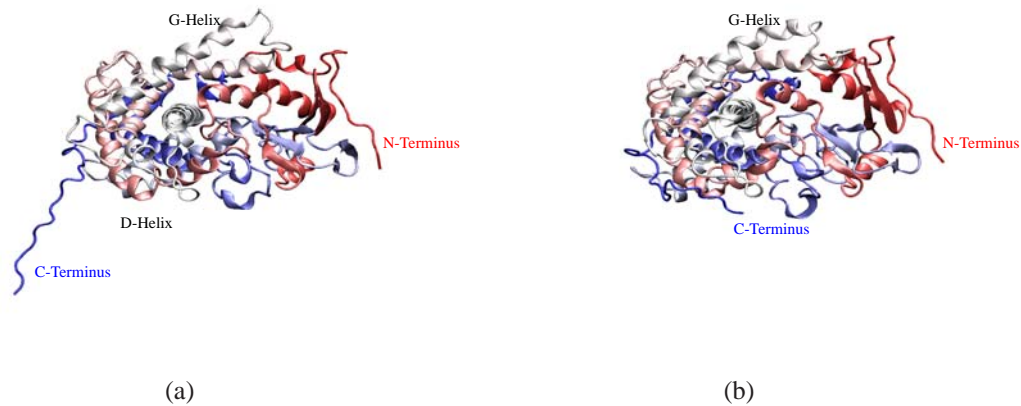


Abbildung 5.20: Struktur des Modells der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne nach der Modellierung (a) und nach der MD-Simulation (b). Der C-terminale Bereich faltete sich während der MD-Simulation und lagerte sich an die Oberfläche des Proteins an. Die Strukturen wurden vom N-Terminus in Rot über Weiß zum C-Terminus in Blau eingefärbt.

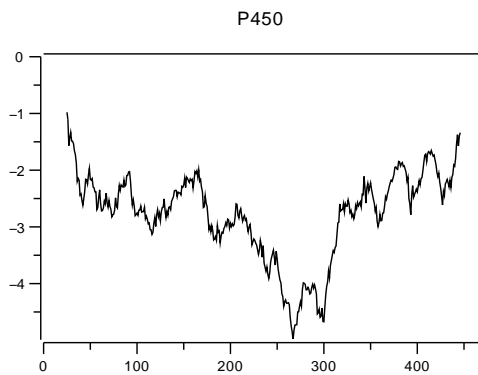


Abbildung 5.21: PROSA 2003-Energie-Plot des Modells der P450-BM3-Hämdomäne mit *linker* nach der MD-Simulation. Das Diagramm repräsentiert die Interaktionsenergien der Aminosäuren. Negative Werte entsprechen stabilen Regionen des Proteins.

### 5.3.3 Berechnung der Titrationskurve und der Protonierungszustände

Die Berechnung der Titrationskurve mittels MCCE (*Multi-Conformation Continuum Electrostatics*) zeigt, dass es sich bei der P450-BM3-Hämdomäne um ein anionisches Protein handelt, dessen isoelektrischer Punkt bei 5.5 liegt.

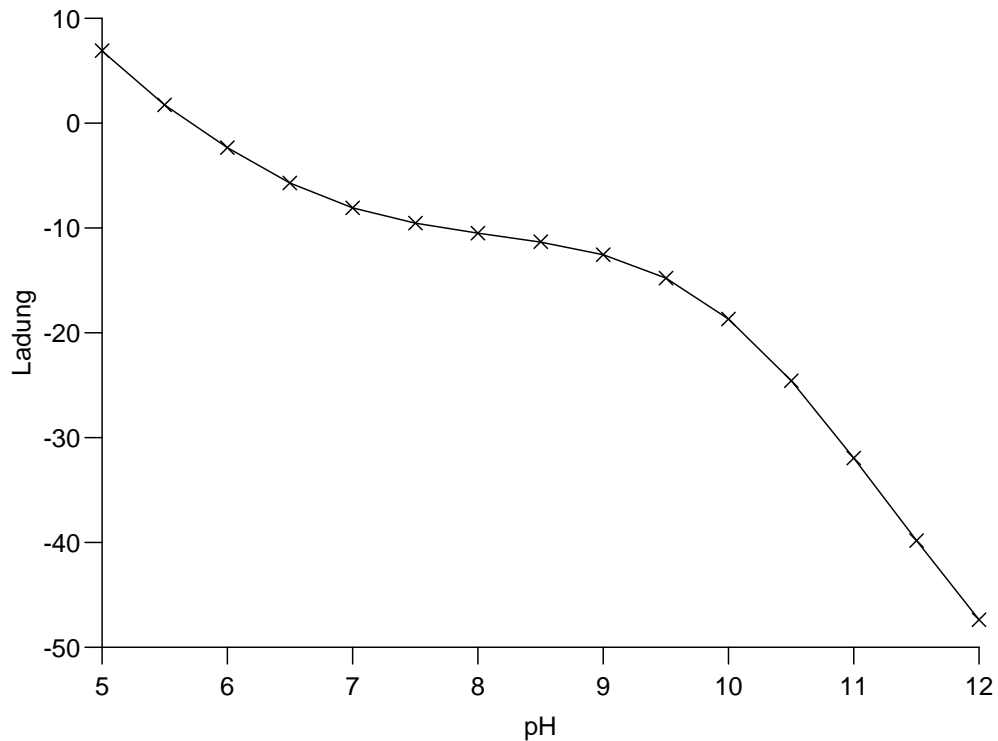


Abbildung 5.22: Berechnete Titrationskurve der Struktur der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit *linker* nach der MD-Simulation.

Die Protonierungszustände der Aminosäuren des erstellten Modells wurden mittels des Programms MCCE für pH 7 erstellt und die Ergebnisse für die anschließenden Berechnungen verwendet.

AMINOSÄURE	NUMMER	ZUSTAND
LYS	69	prot
HIS	92	prot
HIS	100	deprot
HIS	116	deprot
HIS	138	deprot
HIS	171	deprot
HIS	236	deprot
HIS	266	deprot
HIS	285	deprot
HIS	361	deprot
HIS	388	prot
HIS	408	deprot
HIS	420	deprot
HIS	426	deprot
GLU	344	prot
GLU	409	prot

Tabelle 5.3: Mit MCCE berechnete Protonierungszustände der Aminosäuren der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne bei pH 7. Aufgelistet sind nur Aminosäuren, deren Standardprotonierungszustand bei pH 7 abweicht und alle Histidine.

### 5.3.4 Berechnung der bevorzugten Orientierung der P450-BM3-Hämdomäne auf einem Anionenaustauscher über elektrostatische Bindungsenergien

Als Modell der Anionenaustauscheroberfläche diente ein Gitter, welches aus 31x31 positiven Ladungen erzeugt wurde. Die Ladungspunkte hatten eine Ladung von +1 und einen Abstand von jeweils 7 Å. Es wurden 312 Orientierungen des simulierten Modells bei einer Distanz von 1 Å zur Oberfläche erzeugt und die elektrostatischen Bindungsenergien berechnet.



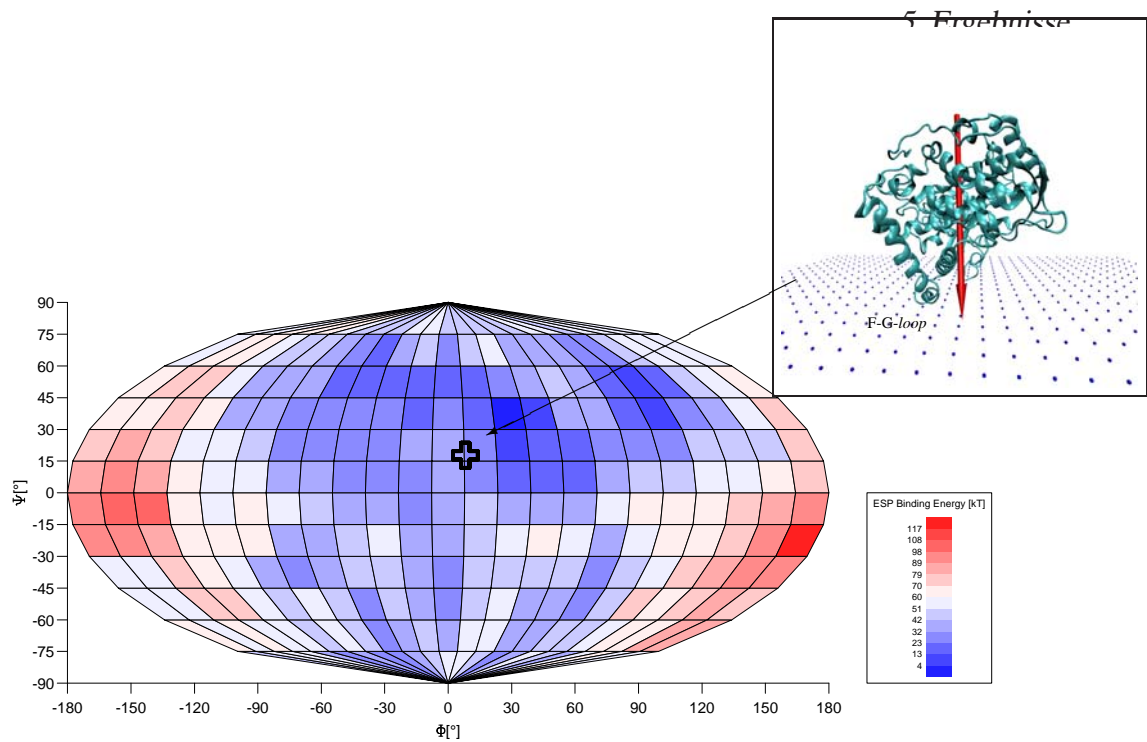


Abbildung 5.23: Berechnete elektrostatische Bindungsenergien für verschiedene Orientierungen des Modells der Cytochrom P450-BM3-Häm-domäne mit *linker*. Kennzeichnet ist die Richtung des mittleren energiegewichteten Moments (+), welches sich aus den gesamten berechneten Bindungsenergien ergibt. Das Dipolmoment ist als roter Pfeil mit Spitze zur negativen Seite des Moments weisend dargestellt.

Die berechneten Energiewerte zeigen einen großen präferierten *patch* (Abbildung 5.23). Das Modell bindet mit diesem bevorzugt in einer Ausrichtung, welche der Bindung mit der distalen Seite der P450-BM3-Häm-domäne entspricht. Die Richtung des mittleren energiegewichteten Moments, welches sich aus allen berechneten Bindungsenergien ergibt, liegt bei  $(\Phi, \Psi) = (10^\circ, 15^\circ)$ , was mit einer Bindung über den F-G-loop konform ist und einer Ausrichtung der Dipolmoments orthogonal zur Oberfläche entspricht.

### 5.3.5 MD-Simulationen der Cytochrom P450-BM3-Häm-domäne und verschiedenen Anionenaustauschern

Für die MD-Simulationen der P450-BM3-Häm-domäne wurde als Ausgangsstruktur das bereits simulierte Modell mit *linker*-Bereich nach 1 ns ausgewählt. Das Modell wurde jeweils ausgehend von 6 verschiedenen Ausgangspositionen über den drei verschiedenen Anionenaus-

## 5 Ergebnisse

tauschermaterialien DEAEH, QAE und SuperQ bei einer Ausgangsdistanz von 35 Å für 1 ns simuliert. Hierfür wurde eine Fläche von 21x21 Ligandenmolekülen mit einem Abstand von 7 Å generiert, die die Oberfläche des Adsorbers repräsentiert. Die Anionenaustauschermoleküle wurden am terminalen Sauerstoffatom O1 und Kohlenstoffatom C5 (SuperQ) bzw. C7 (DEAEH und QAE) festgehalten (Abbildung 5.3), welche den Übergang zur Matrix darstellen. Für die Bestimmung der Orientierung des Proteins wurden die Positionen der C $\alpha$ -Atome von Pro25 und Leu150 im Bezug zur Ebene verwendet.

Zur Quantifizierung der Abweichungen von der Startstruktur des Proteins während der MD-Simulationen wurden die RMSD-Werte zwischen der aktuellen Struktur und der Startstruktur berechnet (Abbildung 5.24). Die RMSD-Werte blieben bei allen MD-Simulationen unter 3.0 Å.

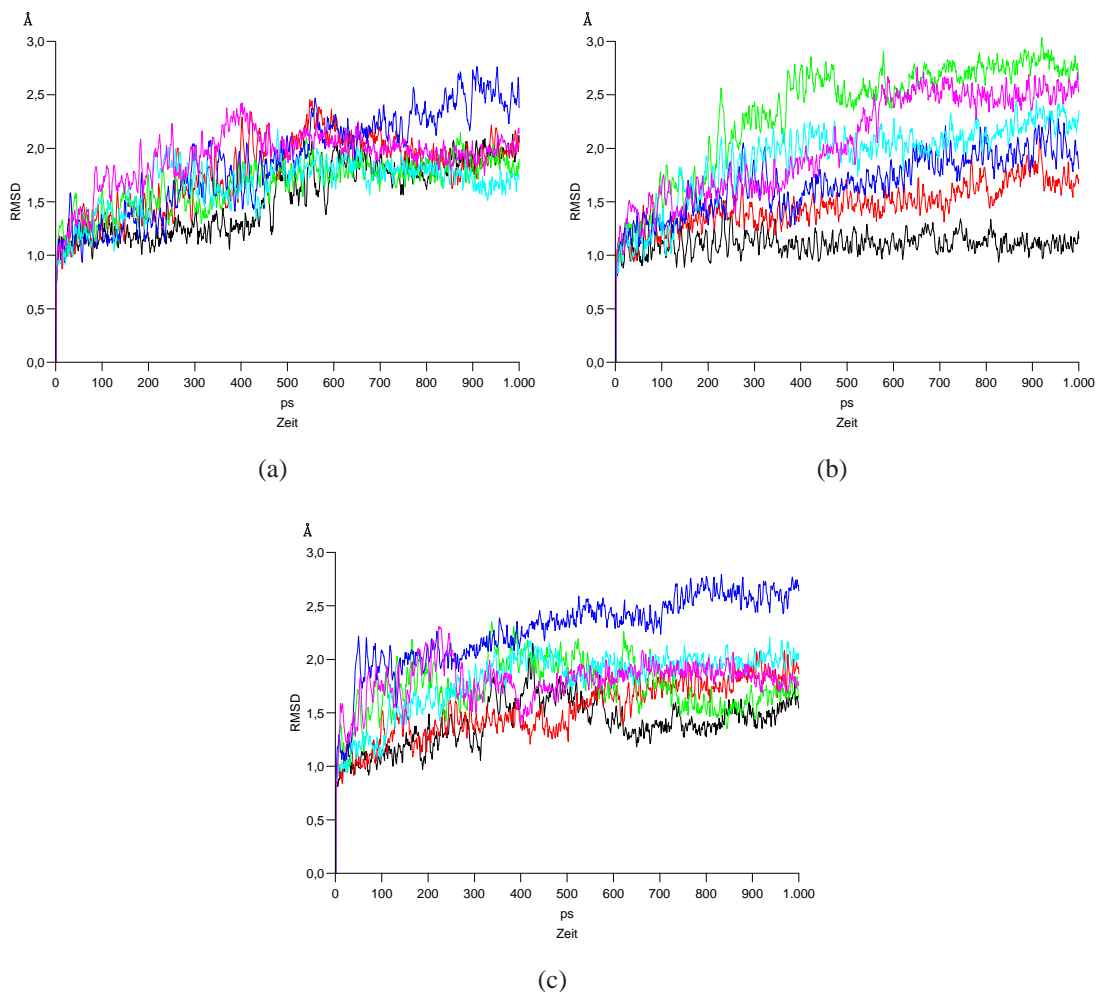


Abbildung 5.24: RMSD-Werte der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne während der MD-Simulationen mit den Liganden DEAE (a), SuperQ (b) und QAE (c). Die 6 MD-Simulationen verschiedener Ausgangsorientierungen sind farbig unterschieden (siehe Anhang 8.1).

Die Strukturen unterschiedlicher Startorientierungen der P450-BM3-Hämdomäne wiesen während der MD-Simulationen ein sehr ähnliches Verhalten auf. Nach einer Beschleunigungsphase bis etwa 200 ps Simulationszeit erfolgte eine Annäherungsphase mit konstanter Geschwindigkeit. Nach maximal 700 ps Simulationszeit wurde bei allen MD-Simulationen die Adsorberoberfläche vom Protein erreicht (Abbildung 5.25). Die zeitliche Reihenfolge, in der die Ausgangsorientierungen der Proteinstrukturen die Oberfläche erreichten, war bei den MD-Simulationen mit verschiedenen Liganden gleich. Bei den rosa markierten MD-Simulationen

## 5 Ergebnisse

erreichten die Proteinstrukturen die Oberfläche immer zuerst, während die schwarz markierten MD-Simulationen die Oberfläche zuletzt erreichten.

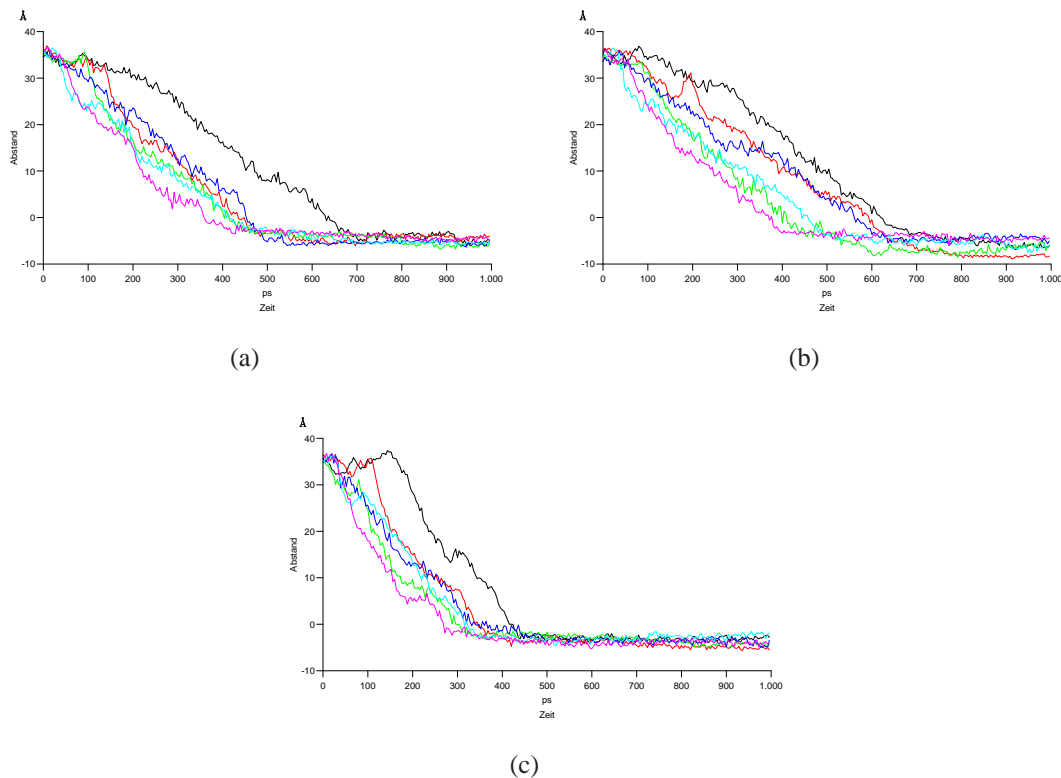


Abbildung 5.25: Abstand der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne vom Adsorber während der MD-Simulationen mit den Liganden DEAE (a), SuperQ (b) und QAE (c). Die 6 MD-Simulationen verschiedener Ausgangsorientierungen sind farbig unterschieden (siehe Anhang 8.1).

Die P450-BM3-Hämdomäne mit *linker* besitzt ein starkes Dipolmoment von 800 D. Es ist von der distalen Seite hin zur proximalen Seite des Proteins ausgerichtet und verläuft damit etwa orthogonal zur Ebene des Häm. Die Ausrichtung während der Annäherung des Proteins an die Oberfläche erfolgte bei allen Simulationen gleichartig. Die Orientierung des Proteins erreichte die Region bei  $(\Phi; \Psi) = (10^\circ \pm 10^\circ; 15^\circ \pm 10^\circ)$  innerhalb von 200 ps bei einer Distanz zu Beginn von 25 Å (Abbildung 5.26). Diese Orientierung des Proteins entspricht einer Ausrichtung des Dipolmoments orthogonal zur Ebene der Anionenaustauscheroberfläche. In dieser Lage erfolgte die restliche Annäherungsphase bis hin zur Oberfläche des Adsorbers. Nach dem ersten Kontakt mit dem F-G-loop erfolgte eine Kippbewegung hin zur Orientierung  $(\Phi; \Psi) = (-5^\circ \pm 10^\circ; 10^\circ \pm 10^\circ)$ .

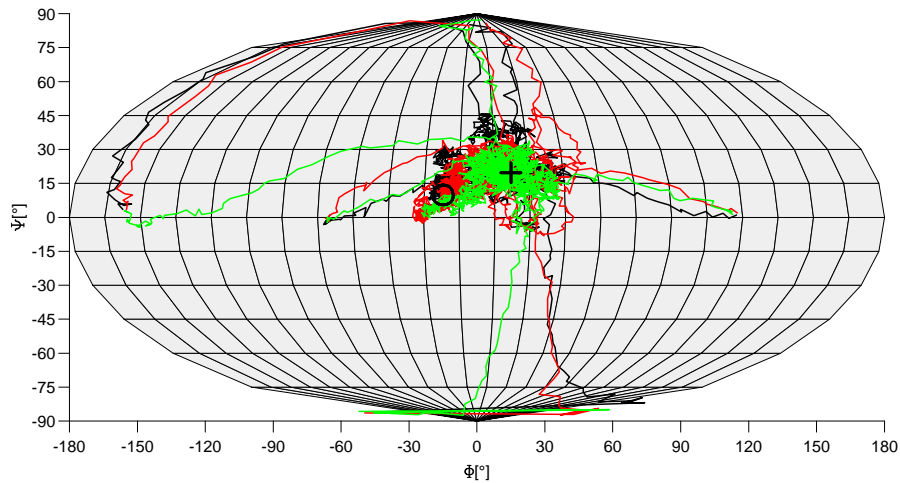


Abbildung 5.26: Orientierung der Cytochrom P450-BM3-Häm-domäne während der Adsorption an die Oberfläche. Mit „+“ markiert ist die Orientierung, mit der sich das Protein während der MD-Simulationen der Oberfläche annähert, „○“ zeigt die gebundene Orientierung. In Schwarz gehalten sind MD-Simulationen mit den Liganden DEAE, in Rot mit QAE und in Grün mit SuperQ.

Der erste Kontakt des Proteins wurde in allen MD-Simulationen mit einer der Aminosäuren Asp194, Asp195 oder Glu200 des F-G-loop aufgenommen (Abbildung 5.27). Nach dieser Kontaktaufnahme kippte das Protein in Richtung des D-E-loop und lag schließlich in gebundenem Zustand mit dem Bereich zwischen F-G-loop, dem  $\beta$ 4-sheet und dem D-E-loop auf. Während der restlichen Simulationszeit veränderte sich die Orientierung und die Struktur des Proteins nicht weiter.

## 5 Ergebnisse

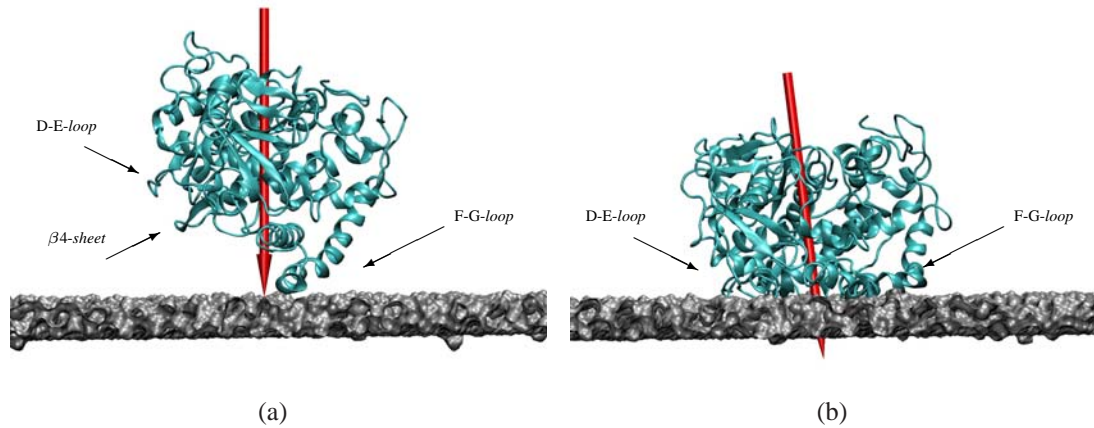


Abbildung 5.27: Adsorptionsvorgang der Cytochrom P450-BM3-Häm-domäne (Cyan, Sekundärstruktur in *cartoon* Darstellung) an eine Anionenaustauscher-Oberfläche (grau, Oberfläche in *MSMS surface* Darstellung). (a) Orientierung während der Annäherungsphase und des ersten Kontakts. (b) Orientierung des vollständig gebundenen Proteins. Das Dipolmoment ist als roter Pfeil mit Spitze zur negativen Seite des Moments weisend dargestellt.

Zu Beginn der Versuche wurden auch Simulationen bei verschiedenen Salzkonzentrationen in einem Bereich von 0.1 M bis 0.5 M vorgenommen. Jedoch war dabei eine Annäherung des Proteins zum Adsorber innerhalb 1 ns Simulationsdauer bei allen Simulationen nicht feststellbar. Die Ausrichtung des Dipolmoments orthogonal zur Ebene des Adsorbers ( $\Phi; \Psi$ ) = ( $10^\circ \pm 10^\circ; 15^\circ \pm 10^\circ$ ) wurde dennoch während aller MD-Simulationen eingenommen.

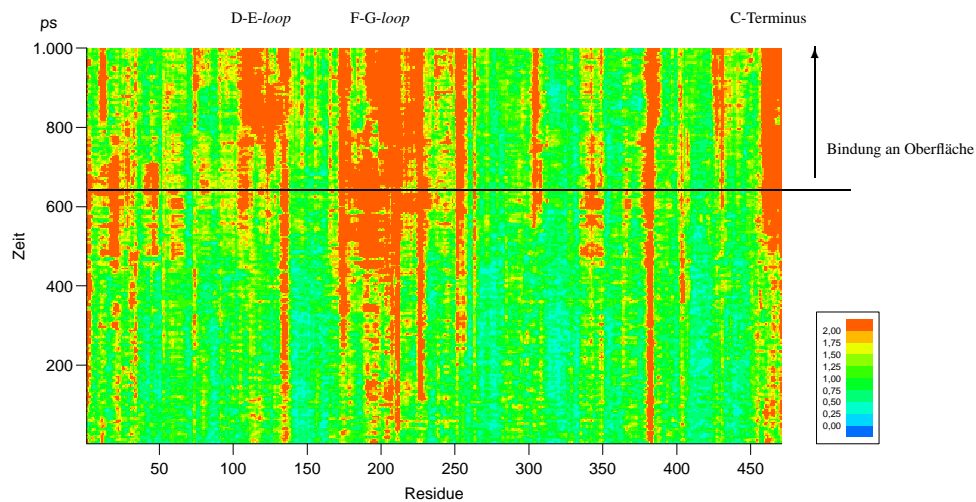


Abbildung 5.28: RMSD *per residue* der Cytochrom P450-BM3 Häm Domäne am Beispiel der MD-Simulation von DEAE(a) (siehe Anhang 8.1). Die stärksten Veränderungen liegen im Übergangsbereich der F- und G-Helix (ca. AS 175-225), der D- und E-Helix (ca. AS 110-140) und am C-terminalen Ende.

Mittels des RMSD *per residue* wurden die Veränderungen der Proteinstruktur während der MD-Simulationen analysiert. Bereiche mit starken Deformationen (RMSD *per residue* > 2 Å) fanden während der Bindung der Proteinstruktur an die Oberfläche vorwiegend im Übergangsbereich der F- und G-Helix, der D- und E-Helix und im C-terminalen Bereich statt (Abbildung 5.28).

### 5.3.6 Berechnung der Bindungsenergien mittels GBSA (*generalized Born/surface area*) und Vergleich mit experimentellen Werten

Von den letzten 100 ps der MD-Simulationen der P450-BM3-Häm-domäne mit verschiedenen Anionenaustauscheroberflächen wurden für jede MD-Simulation jeweils 10 *snapshots* erzeugt. In diesem Zeitbereich war die P450-BM3-Häm-domäne bei allen MD-Simulationen an der Oberfläche gebunden. Die GBSA-Bindungsenergien des Proteins mit der Oberfläche der

jeweiligen Liganden wurden daraufhin für die Salzkonzentrationen 0.14 M, 0.2 M, 0.3 M und 0.5 M berechnet.

Ein Vergleich der Bindungsenergien zum Logarithmus der experimentell von D.Q. Lin ermittelten Gleichgewichtskonstante  $K$  ergab eine lineare Korrelation bei allen verwendeten Materialien (Tabelle 5.4 und Abbildung 5.29). Die Harze der verwendeten Anionenaustauscher waren unterschiedlich aufgebaut. Mit der Bezeichnung FF versteht Amersham Harze, die über hohe Durchflussraten verfügen. DEAE FF und Q FF bestehen aus einer sechsprozentigen, hochgradig vernetzten Agarosematrix [2]. Tosoh Biosep verwendet als Harz ein Methacrylatpolymer und bezeichnet mit 650M Partikelgrößen von 40 - 90  $\mu\text{m}$  [3, 5] und mit 550C Partikelgrößen von 50 - 150  $\mu\text{m}$  [4].

Die starken Anionenaustauscher wiesen Bindungsenergien im gleichen Bereich auf und ergaben somit fast identische Steigungen der Korrelationsgeraden (Tabelle 5.5). Im Vergleich zu den starken Ionenaustauschern ergab die Korrelation zu den experimentell ermittelten Werten der schwachen Ionenaustauscher eine geringere Steigung. Der Vergleich der von den Herstellern unterschiedlich verwendeten Harze zeigte, dass eine Verschiebung der Korrelationsgeraden vorlag. Die aus Methacrylatpolymer bestehenden Harze mit der Bezeichnung 650M lieferten dabei für den jeweiligen Liganden DEAE und Q die höhere Werte, als die aus Agarose bestehenden mit der Bezeichnung FF.

Ligand		Salzkonzentration [M]			
		0.13	0.2	0.3	0.5
DEAE	$K_{\text{DEAE FF}}$	0.0200	0.0103	0.0062	0.0027
	$K_{\text{DEAE 650M}}$	0.0345	0.0177	0.0115	0.0053
	$\Delta G_{\text{GBSA}}[\text{kcal/mol}]$	-12.75	-3.56	4.57	12.04
SuperQ	$K_{\text{Q FF}}$	0.1129	0.0496	0.0180	0.0060
	$K_{\text{Q 650M}}$	0.1853	0.0568	0.0234	0.0098
	$\Delta G_{\text{GBSA}}[\text{kcal/mol}]$	-16.60	-7.96	-0.55	6.00
QAE	$K_{\text{QAE 550C}}$	0.1206	0.0507	0.0211	0.0060
	$\Delta G_{\text{GBSA}}[\text{kcal/mol}]$	-16.55	-7.33	0.88	8.53

Tabelle 5.4: Experimentell ermittelte Gleichgewichtskonstanten  $K$  und berechnete GBSA-Bindungsenergien  $\Delta G_{\text{GBSA}}$  für die verwendeten Liganden DEAE, SuperQ und QAE bei verschiedenen Salzkonzentrationen.



LIGAND	DEAE FF	DEAE 650M	Q FF	Q 650M	QAE 550C
Steigung	-0.077	-0.073	-0.129	-0.128	-0.117

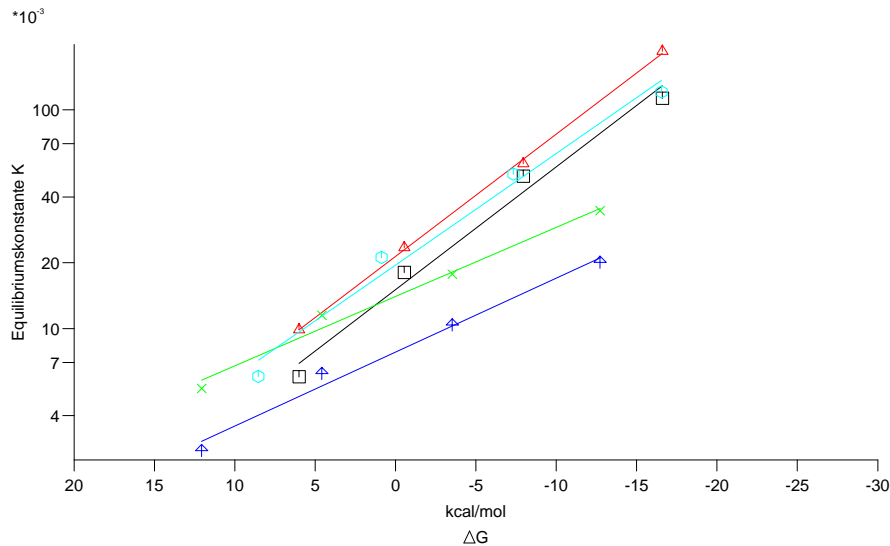
Tabelle 5.5: Ermittelte Steigungen der Korrelationsgeraden aus  $\log K$  und  $\Delta G_{GBSA}$ .

Abbildung 5.29: Korrelation der experimentell ermittelten Gleichgewichtskonstante  $K$  mit der berechneten GBSA-Bindungsenergie. Dargestellt sind die Werte für Q 650M (rot), Q FF (schwarz), QAE 550C (türkis), DEAE 650M (grün) und DEAE FF (blau). Die berechneten Energiewerte  $\Delta G_{GBSA}$  der schwachen Ionenaustauscher zeigen ein unterschiedliches Verhalten zur gemessenen Gleichgewichtskonstante im Vergleich mit den starken Ionenaustauschern.

Die Bindung der P450-BM3-Häm-domäne an den schwachen Ionenaustauscher DEAE wurde ausschließlich mit protonierten Liganden simuliert und die ersten Berechnungen der GBSA-Bindungsenergien mit den dafür berechneten Parametern durchgeführt. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei DEAE um einen schwachen Anionenaustauscher handelt, dessen Ligand beim verwendeten pH 7 teilweise in deprotoniertem Zustand vorliegt.

Zur Bestimmung des  $pK_a$ -Wertes wurde DEAE FF mit NaOH titriert. Der gemessene  $pK_a$  lag bei 7 (Abbildung 5.30). Beim verwendeten pH 7 lagen also etwa die Hälfte der DEAE-Liganden im protonierten bzw. deprotonierten Zustand vor.

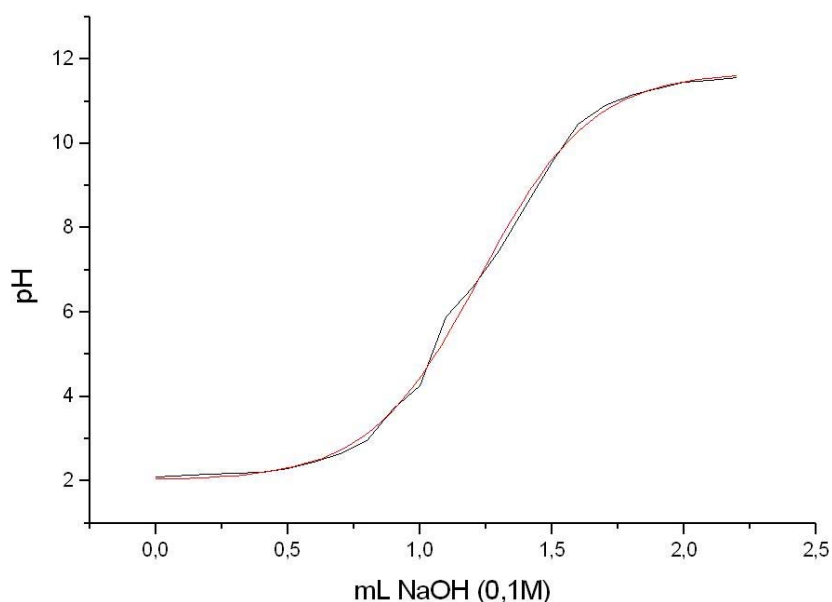


Abbildung 5.30: Titrationskurve von DEAE Sepharose FF

Um dem Effekt der Protonierbarkeit Rechnung zu tragen, wurden die berechneten Ladungen des protonierten und des unprotonierten DEAE-Liganden gemittelt (Tabelle 5.1) und die GBSA-Bindungsenergien mit den neu definierten Parametern erneut berechnet (Tabelle 5.6). Die Berechnung der GBSA-Bindungsenergien des schwachen Ionenaustauschers mit gemittelten Ladungen ergaben beim Vergleich zu den experimentell ermittelten Werten Steigungen der Korrelationsgeraden von -0.142 (DEAE FF) und -0.133 (DEAE 650M) (Abbildung 5.31). Diese lagen im Bereich der Steigungen der Korrelationsgeraden der starken Ionenaustauscher.

Ligand		Salzkonzentration [M]			
		0.13	0.2	0.3	0.5
DEAE	K DEAE FF	0.0200	0.0103	0.0062	0.0027
	K DEAE 650M	0.0345	0.0177	0.0115	0.0053
	$\Delta G_{GBSA} [kcal/mol]$	-3.90	-1.77	5.88	9.62

Tabelle 5.6: Ermittelte Bindungsenergien mit gemittelten Ladungen und Gleichgewichtskonstanten für den verwendeten Liganden DEAE bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

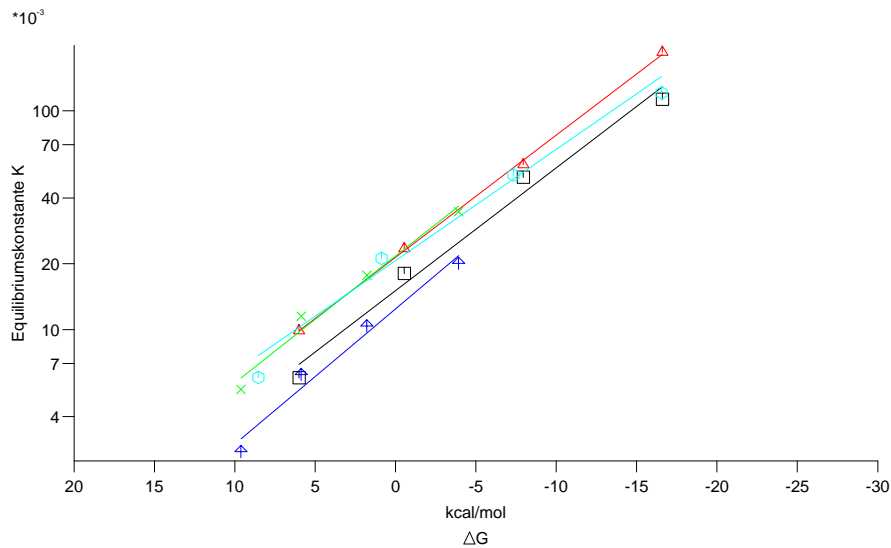


Abbildung 5.31: Korrelation der experimentell ermittelten Gleichgewichtskonstante  $K$  mit der berechneten GBSA-Bindungsenergie. Dargestellt sind die Werte für Q 650M (rot), Q FF (schwarz), QAE 550C (türkis), DEAE 650M (grün) und DEAE FF (blau). Die berechneten Energiewerte  $\Delta G_{GBSA}$ , der schwachen Ionenaustauscher zeigen nach der Anpassung der Parameter im Vergleich mit den starken Ionenaustauschern ein ähnliches Verhalten zur Gleichgewichtskonstante.



IGG1	ESVLTQPPLSASGTPGQRVTTISCTGTSSNIGSITVN...WYQQLPCMAPKLLIYRDAMRPSGVP	60
mab01	DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSLXLYSNXKNYLAWYQQKPGQPKLLIXWASTRESGVP	65
IGG1	TRFSGSKSCTSASLAISGLEAEDESDYCASWNSSDNSYVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPS	125
mab01	DRFSGSGXCTDFTLTISLQAEDEVAVYYCQQYXS...XPXTFGQGTKVLEIK.RTVAAPSVFI FPPS	127
IGG1	SFELQANKATLVCLISDFYFGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQS...NNKYAASSYISITPEQW	189
mab01	DEQLKSGTASVTVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDDSTYSLSSITITLSKADY	192
IGG1	KSHRSVSCQVTHEG...STVEKTVAPT ECS	216
mab01	EKHKVYACBVTHQGLSSPVTISFNREG EC.	220

Abbildung 5.33: *Alignment* der *template*-Sequenz des IgG1-Modells von Padlan und der *target*-Sequenz der leichten Kette verwendeten Mab01 Antikörpers. Patentrechtlich relevante Bereiche wurden mit einem „X“ versehen.

IGG1	EVQLVQSGGGLVQPGRSRLRSCSSSGFI FSSYAM YWVRQAPGKGLEWVAITWDDGSDQHYADSVK	65
mab02	EVQLVESGGGLVXPGGSLRLSCAASGFTFSXYXMSWVRQAPGKGLEWVXISXXCXXTYXXDSXK	65
IGG1	GRFTISRNDSKNITLFLOMDSLRFEDTGVYFCARDGGHGFCSSASCFGPDYWGQGTPTVTVSSASTK	130
mab02	GRFTISRDNXKNXLYLQMNSLRAEDTAVVYCARXC.....XDYWGXTXVTVSSASTK	118
IGG1	GPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV	195
mab02	GPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV	183
IGG1	TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL	260
mab02	TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL	248
IGG1	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNG	325
mab02	MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNG	313
IGG1	KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	390
mab02	KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRREXETKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	378
IGG1	ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL...	452
mab02	ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	443
IGG1	.	452
mab02	K	444

Abbildung 5.34: *Alignment* der *template*-Sequenz des IgG1-Modells von Padlan und der *target*-Sequenz der schweren Kette verwendeten Mab02 Antikörpers. Patentrechtlich relevante Bereiche wurden mit einem „X“ versehen.

## 5 Ergebnisse

IGG1	ESVLTQ.PPSASGTSGQRVTLISCTGTSSNIGSTTVN	WYQQLPGMAFKLLIYRDAMRPS	CVPTFRFS	64
mab02	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCXASS.XN.YIY	WYQQKPGQAFRLLIYXXSXXAX	CPXRFSS	62
IGG1	GSKSGTSASLAIISGLEAEDESDYYCASWNSSD	NSYVFGTGTKVTVL	GQPKANPTVTLFPPSSEEL	129
mab02	GSGSGTDFTLTISXLEPEDFAVYYCXQXXS.XPLT	FGGGTKVEIK.RTVAAPSVFI	FPPSDEQL	124
IGG1	QANKATLVCTISDFYPGAVTVANKADGSPVK.AGV	TTKPSKOSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR		193
mab02	KSGTASVVCLLNDFYPREAKVQNKVDNALQSCNSQ	ESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHK		189
IGG1	SYSQVTHEG.STVEKTVAPTECS			216
mab02	VYACEVTHEGLSSPVTKSFNRGEG.			213

Abbildung 5.35: *Alignment* der *template*-Sequenz des IgG1-Modells von Padlan und der *target*-Sequenz der leichten Kette verwendeten Mab02 Antikörpers. Patentrechtlich relevante Bereiche wurden mit einem „X“ versehen.

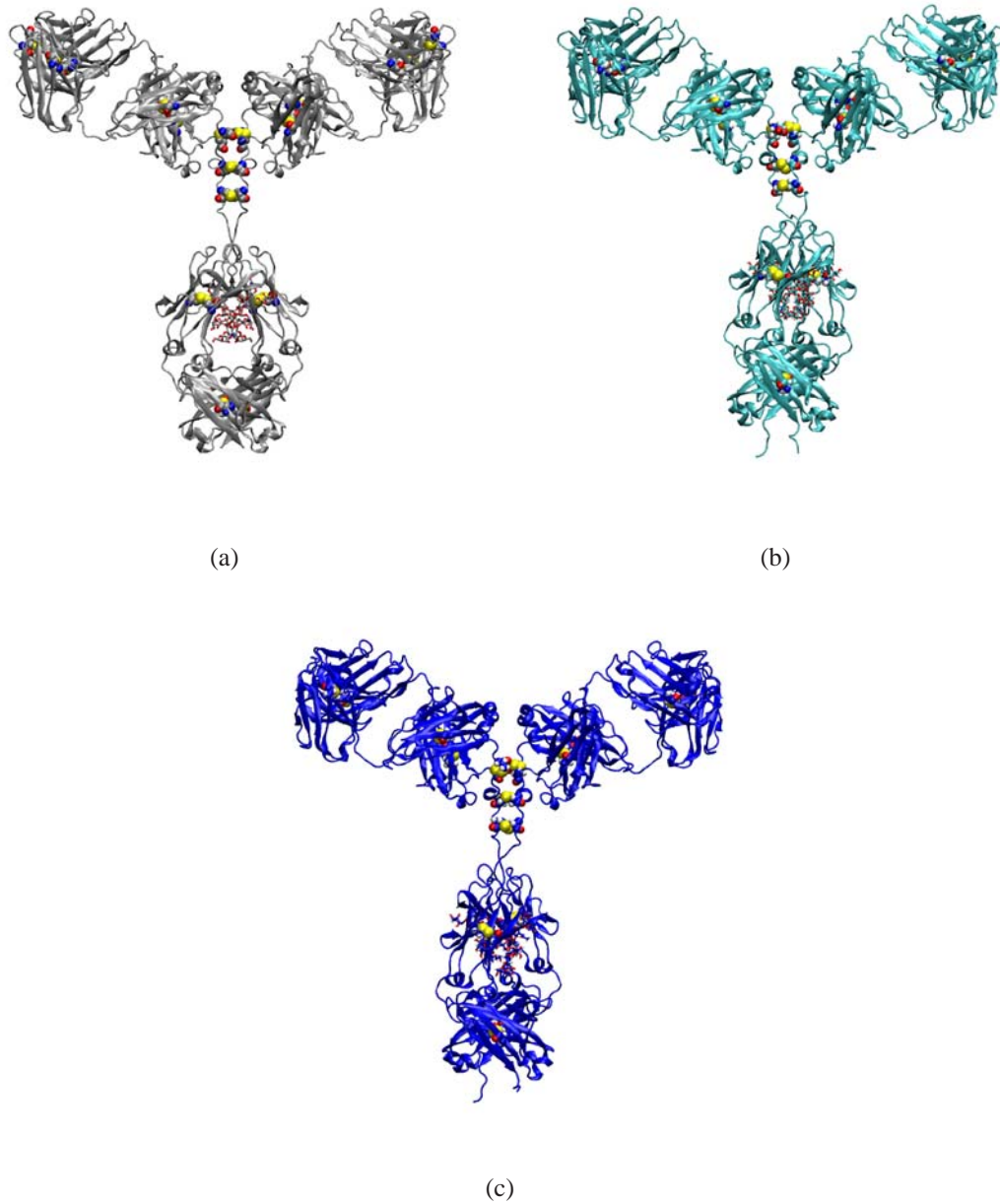


Abbildung 5.36: Strukturen des IgG1-Antikörper-*template* (a) und der erstellten Modelle von Mab01 (b) und Mab02 (c). Die Sekundärstrukturen sind als *cartoon*, die Glykosylierungen als *sticks* und die Disulfidbrücken als *Van-der-Waals-spheres* dargestellt.

Der PROSA-Qualitäts-Check zeigt, dass die Modelle von Mab01 und Mab02 von guter Qualität sind. Sämtliche Interaktionsenergien der Aminosäuren mit dem restlichen Protein sind

## 5 Ergebnisse

bis auf Regionen in den antigenerkennenden Bereichen von Mab01 negativ (Abbildung 5.37). Die Prosa-Z-scores der Modelle entsprechen denen des *template*.

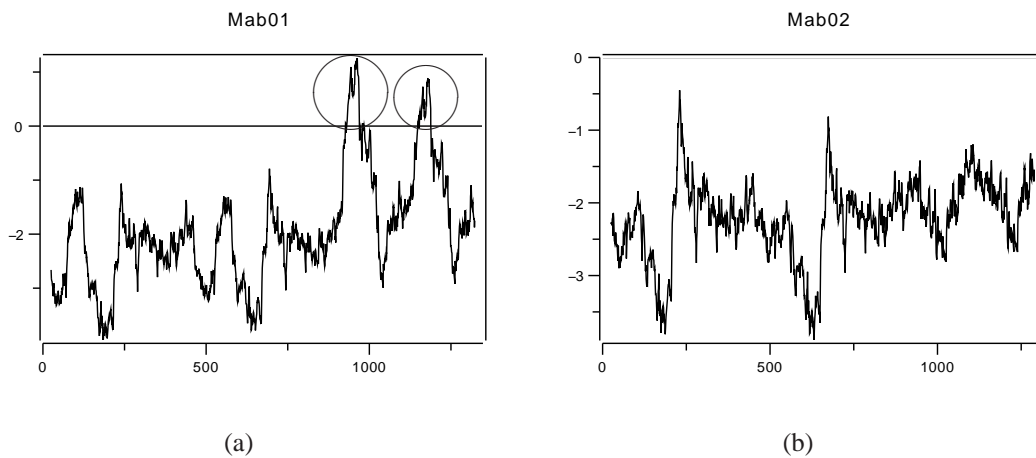


Abbildung 5.37: PROSA 2003-Energie-Plot der Modelle Mab01 und Mab02. Das Diagramm repräsentiert die Interaktionsenergien der Aminosäuren. Negative Werte entsprechen einer guten Modell-Qualität der Struktur. Mit Kreisen markiert sind die Regionen der antigenerkennenden Bereiche schlechter Modell-Qualität.

### 5.4.2 MD-Simulation von IgG1-Antikörpern

Um die Qualität der Antikörpermodelle zu überprüfen, wurde mit dem Antikörper Mab01 eine MD-Simulation in explizitem Lösungsmittel durchgeführt. Die Glykosylierung wurde hierbei in die MD-Simulation miteinbezogen. Zusätzlich wurde der Einfluss der Glykosylierung auf die Struktur von Antikörpern mittels einer weiteren MD-Simulationen mit identischer Ausgangsstruktur, aber unglykosyliertem Mab01 Antikörper untersucht. Die MD-Simulationen wurden jeweils über eine Zeitdauer von 20 ns durchgeführt.

Es hat sich bei beiden MD-Simulationen gezeigt, dass sich die Lage der Fab-Bereiche und des Fc-Bereichs im Verhältnis zueinander verändert hat. Die Fc-Bereiche haben sich im Laufe der MD-Simulationen relativ zu der Positionierung der Fab-Bereiche verschoben, sodass das Antikörpermolekül im Gegensatz zum ursprünglichen Modell nicht mehr symmetrisch aufgebaut war (Abbildung 5.43). In diesem Bezug unterlag die MD-Simulation mit Glykosylierung stärkeren Veränderungen als die MD-Simulation ohne Glykosylierung. Ein Fab-Bereich und der Fc-Bereich des glykosylierten Antikörpers näherten sich stark an. Die Fab-Bereiche, welche im Modell noch in Kontakt waren, trennten sich nach ca. 15 ns voneinander. Dies war beim unglykosylierten Antikörper nicht der Fall. Die Fab-Bereiche waren nach 20 ns immer noch in



Kontakt und die Annäherung des Fc-Bereichs zum Fab-Bereich war nicht so stark ausgeprägt wie beim glykosylierten Antikörper. Die starke Beweglichkeit der Fab-Bereiche war durch eine hohe Flexibilität in der *hinge*-Region gegeben.

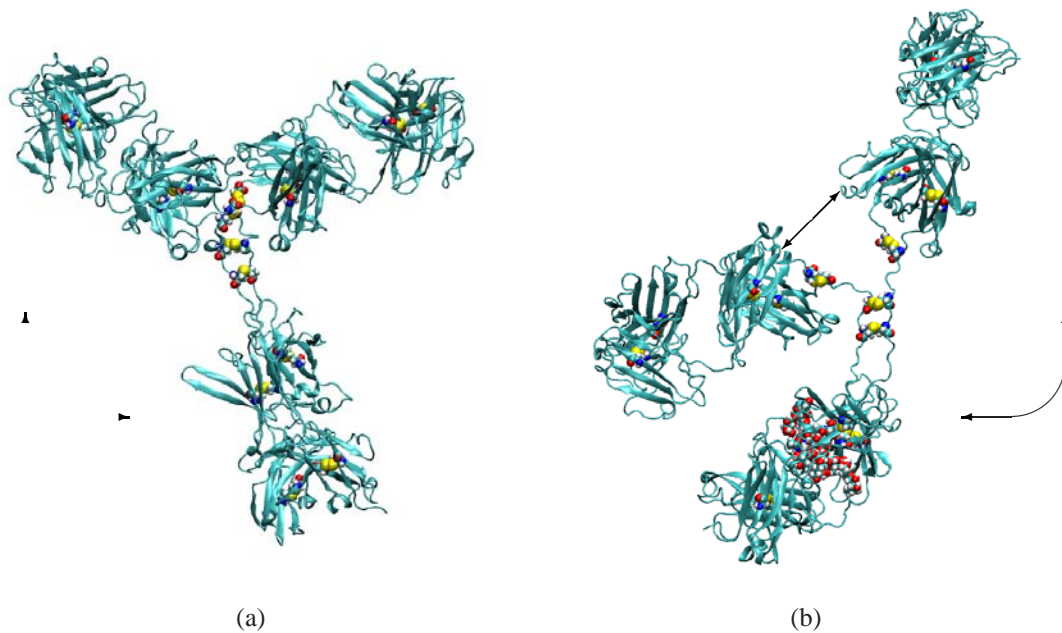


Abbildung 5.38: Strukturen der Modelle von Mab01 ohne (a) und mit Glykosylierung (b) nach 20 ns Simulationszeit. Die in Bezug zueinander asymmetrisch auseinander weichenden Fc- und Fab-Bereiche wurden mit Pfeilen markiert. Die Cysteinbrücken sowie die Glykosylierungen sind als Van-der-Waals-spheres dargestellt.

Während bei der Betrachtung der Lage von Fab- und Fc-Bereichen zueinander die Struktur des Antikörpers mit Glykosylierung größeren Veränderungen unterlag, so wurden beim direkten Vergleich der Fc-Bereiche die größeren Veränderungen bei der Struktur des Antikörpers ohne Glykosylierung festgestellt. Aufgrund der Flexibilität der *hinge*-Region und der Beweglichkeit von Fc-Bereich und Fab-Bereichen im Verhältnis zueinander, wurden zur Überprüfung des Einflusses der Glykosylierung die Berechnungen der RMSD-Werte und das *fitting* im Folgenden ausschließlich auf den Fc-Bereich angewendet.

## 5 Ergebnisse

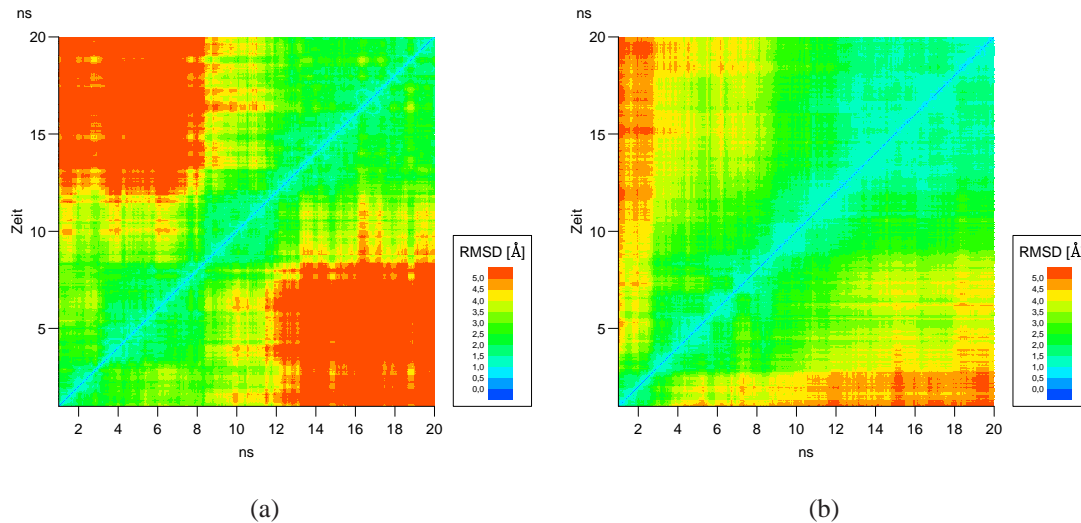


Abbildung 5.39: Abgebildet ist der 2D RMSD der Fc-Bereiche von MD-Simulationen mit (a) unglykosyliertem Mab01 und mit (b) glykosyliertem Mab01. Der Fc-Bereich des glykosylierten Mab01 (b) bleibt über die ganze Simulationszeit stabil, während der unglykosylierte Mab01 (a) nach 11 ns eine veränderte Konformation einnimmt.

Nach den ersten 2 ns der MD-Simulation des Antikörpers mit Glykosylierung befindet sich der Fc-Bereich in einem equilibrierten Zustand (Abbildung 5.39 (b)). Die visuelle Überprüfung der Trajektorie zeigte, dass der Glykosylierungsbereich bis zum Zeitpunkt von etwa 11 ns noch leichten Veränderungen unterworfen war. Die Zucker wechselten während dieses Zeitraums ihre Struktur mehrfach. Dieses hatte auch leichte Auswirkungen auf die *backbone*-Struktur des Fc-Bereichs, welche während dieser Phase etwas beweglicher als im späteren Verlauf war. Nach 11 ns nahmen die Zucker eine stabile Konfiguration ein, welche auch für den Rest der Simulationszeit in diesem Zustand bestehen blieb. Eine stabile Struktur des Antikörper-*backbone* in diesem Zeitraum war die Folge. Der Fc-Bereich blieb während der gesamten Simulationszeit symmetrisch.

Im Gegensatz hierzu trat bei der MD-Simulation ohne Glykosylierung nach den ersten 10 ns Simulationsdauer eine größere Veränderung der Struktur im Fc-Bereich ein (Abbildung 5.39 (a)). Die visuelle Analyse der Trajektorie zeigte, dass diese Veränderung durch ein Auseinanderweichen im oberen  $C_H2$  Bereich der schweren Ketten des Fc-Bereichs verursacht wurde. Das Auseinanderweichen wurde nur durch die veränderte Lage einer Kette verursacht, die andere Kette blieb während der gesamten Simulationsdauer stabil. Dies hatte ein asymmetrisches Erscheinungsbild des Fc-Bereichs zur Folge (Abbildung 5.40).

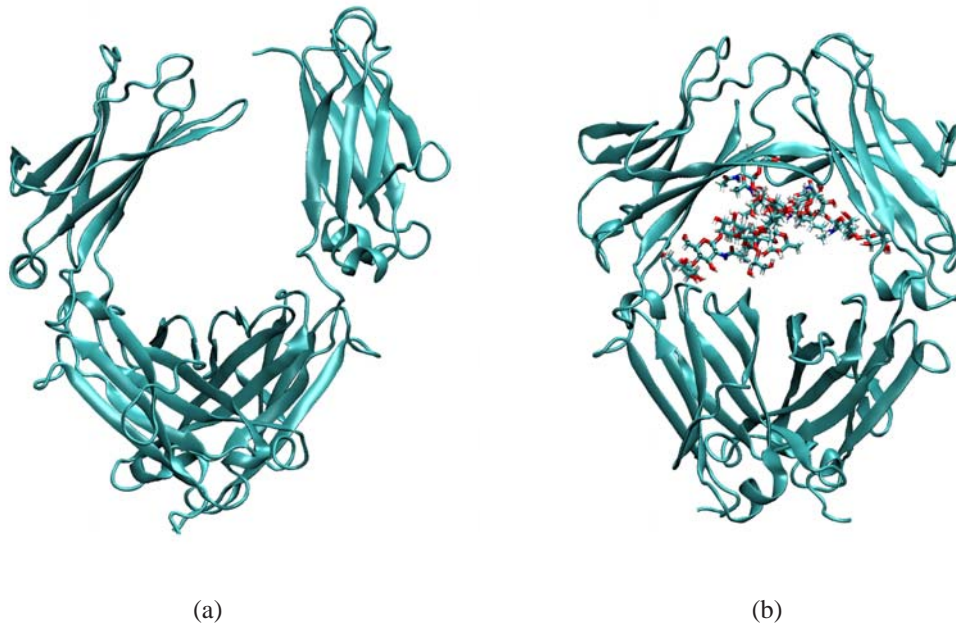


Abbildung 5.40: Strukturen des Fc-Bereichs nach 20 ns Simulationsdauer der Modelle von Mab01 ohne Glykosylierung (a) und mit Glykosylierung (b). Die übrigen Bereiche der Antikörper sind zur besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Bei der Struktur ohne Glykosylierung hat sich ein  $C_H2$ -Bereich entfernt, so dass die symmetrische Gestalt nicht mehr gegeben ist.

Nicht nur durch das Auseinanderweichen einer Struktur der  $C_H2$ -Bereiche des unglykosylierten Antikörpers wurden Veränderungen verursacht. Auch beim *backbone* der Kette mit veränderter Lage wurden Veränderungen während der MD-Simulation festgestellt (Abbildung 5.41 (b)). Die stärksten Abweichungen wurden in der Region einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und eines *loop* ermittelt (Abbildung 5.42). Die übrigen *loop*-Bereiche zeigten nur leichte Veränderungen. Die übrigen  $\beta$ -Faltblattstrukturen der Struktur blieben stabil.

## 5 Ergebnisse

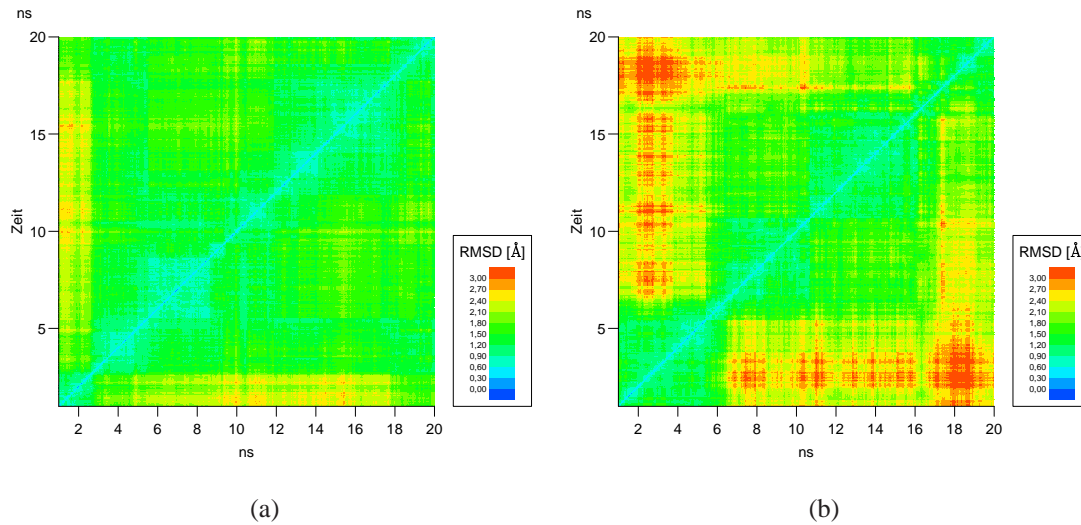


Abbildung 5.41: Abgebildet ist der 2D RMSD des *backbone* der  $C_H2$ -Bereiche von der (a) stabilen Kette (AS 245-345) und (b) der Kette mit veränderter Lage (AS 699-799) der MD-Simulationen des unglykosylierten Mab01. Auch innerhalb des  $C_H2$ -Bereichs der abweichenden Kette kommt es zu Veränderungen.

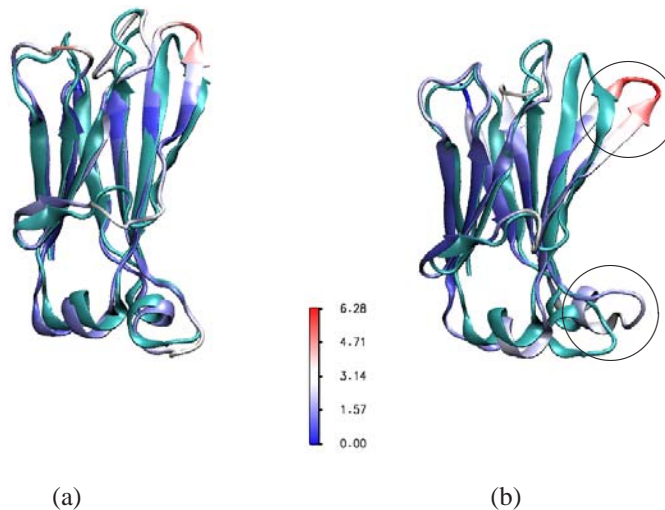


Abbildung 5.42: Die  $C_H2$ -Bereiche des unglykosylierten Mab01 nach der Simulation wurden im Vergleich zur Struktur vor der Simulation nach dem durchschnittlichen RMSD des *backbone* während der MD-Simulation gefärbt: (a) stabile Kette (AS 245-345) und (b) der abweichenden Kette (AS 699-799). Mit Kreisen gekennzeichnet sind die stärksten Veränderungen durch das Abweichen einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und eines *loop*.

Die Qualität der Modelle nach der MD-Simulation hatte sich im Vergleich zu den Modellen ohne Simulation noch einmal verbessert, speziell die Qualität der antigenerkennenden Bereiche hatte sich gesteigert (AS 906-956, AS 1127-1277, Abbildung 5.37 (a)). Die Werte lagen hier nicht mehr so stark im positiven Bereich wie direkt nach der Modellierung (vgl. Abbildung 5.43). Der Vergleich der PROSA 2003-Energie-Plots der Antikörpermodelle nach 20 ns Simulationszeit untereinander zeigt einen ähnlichen Verlauf beider Diagramme. Allerdings ist auch hier der veränderte  $C_H2$ -Bereich im Modell ohne Glykosylierung vom Modell mit Glykosylierung unterscheidbar (AS 692-800). Die Werte des Modells ohne Glykosylierung sind in diesem Bereich positiver als die des Modells mit Glykosylierung, was einer schlechteren Bewertung des Modells ohne Glykosylierung in diesem Bereich entspricht.

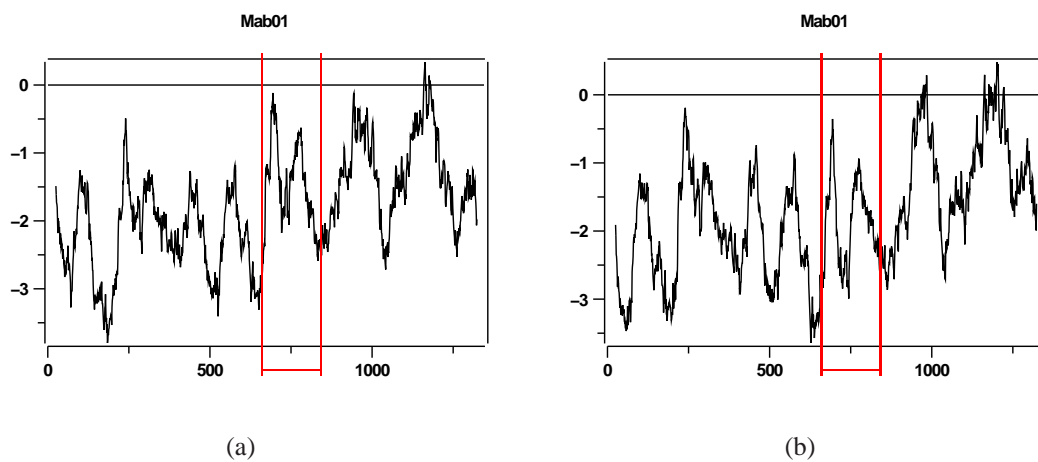


Abbildung 5.43: PROSA 2003-Energie-Plot der Modelle Mab01 ohne (a) und mit (b) Glykosylierung nach 20 ns Simulationszeit. Das Diagramm repräsentiert die Interaktionsenergien der Aminosäuren. Negative Werte entsprechen einer guten Modell-Qualität der Struktur. Rot markiert sind die  $C_H2$ -Bereiche, welche beim Modell ohne Glykosylierung positivere Werte ergaben, als beim Modell mit Glykosylierung.

### 5.4.3 Berechnung der bevorzugten Orientierung von IgG1-Antikörpern auf Kationenaustauschern über elektrostatische Bindungsenergien

Die elektrostatischen Bindungsenergien der modellierten Antikörperstrukturen Mab01 und Mab02 wurden, wie im Verfahren bei Lysozym beschrieben, über einer Fläche bestehend aus 31x31 positiven Ladungen in einem Abstand von 1 Å für alle Orientierungen berechnet.

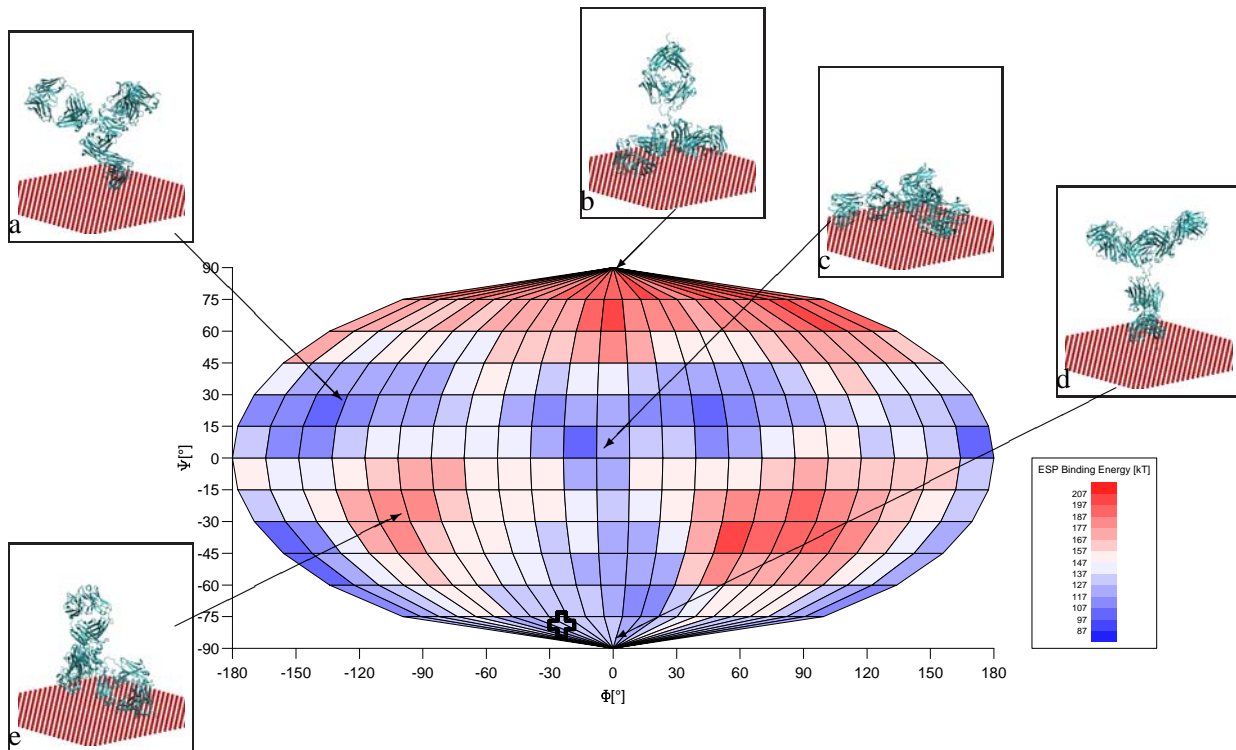


Abbildung 5.44: Berechnete ESP-Bindungsenergien für verschiedene Orientierungen des Modells von Mab01. Beispiele für verschiedene Orientierungen sind in den Abbildungen a-e gezeigt. Gekennzeichnet ist die bevorzugte Orientierung, die Richtung des mittleren energiegewichteten Moments (+).

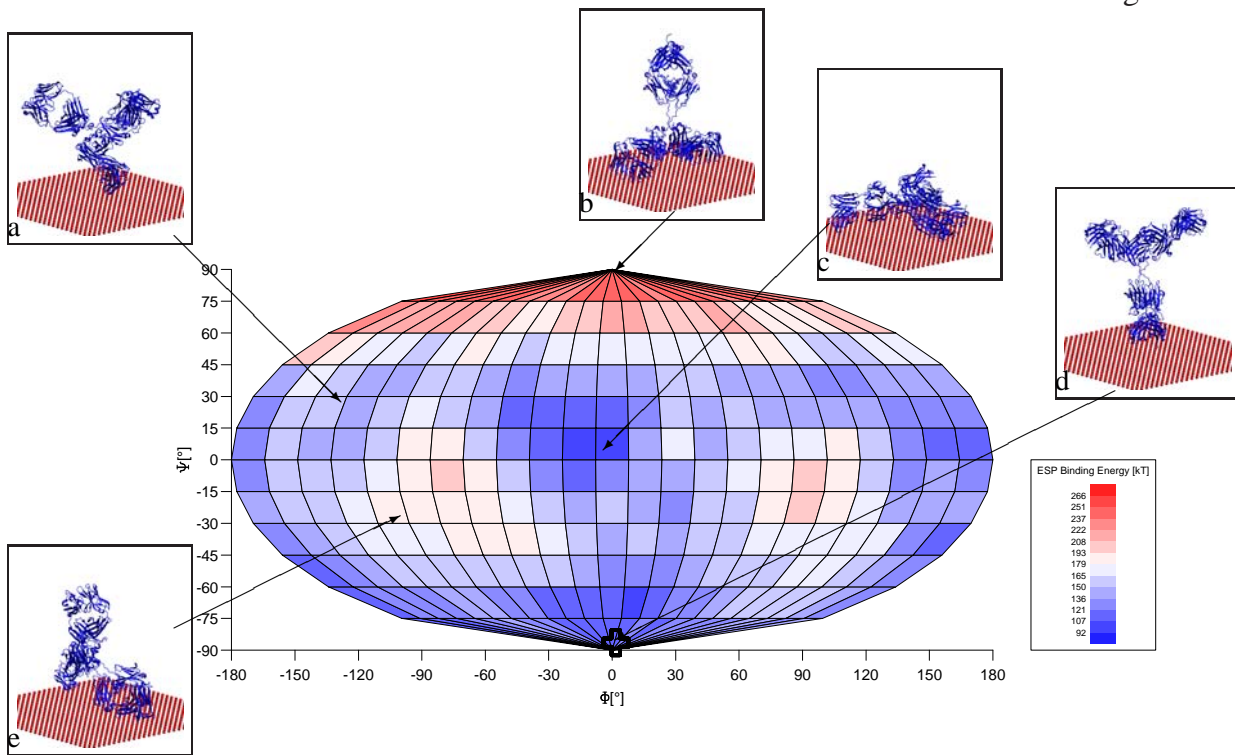


Abbildung 5.45: Berechnete ESP-Bindungsenergien für verschiedene Orientierungen des Modells von Mab02. Beispiele für verschiedene Orientierungen sind in den Abbildungen a-e gezeigt. Gekennzeichnet ist die bevorzugte Orientierung, die Richtung des mittleren energiegewichteten Moments (+).

Beide Antikörper zeigten ein gleichartiges Verhalten auf einer Kationenaustauscheroberfläche. Die Richtung des mittleren energiegewichteten Moments ist bei beiden Antikörpern mit den Fc-Bereichen hin zur Oberfläche orientiert (Abbildungen 5.44d und 5.45d). Außer dieser wird die Bindungsorientierung flach auf der Oberfläche (Abbildungen 5.44c und 5.45c) sowie die Bindung über die antigenerkennenden Regionen der Fab-Bereiche bevorzugt (Abbildungen 5.44a und 5.45a). Die am wenigsten bevorzugten Bindungsregionen sind die *up-side-down*-Orientierung (Abbildungen 5.44b und 5.45b) und die seitliche Lage mit gleichzeitiger Bindung von Fab- und Fc-Bereichen (Abbildungen 5.44e und 5.45e). Im Vergleich beider Antikörper untereinander fällt die Bindung von Mab01 allgemein stärker aus als die des Mab02.

## 5.5 Vorhersage von Retentionszeiten in der hydrophoben Interaktionschromatografie mittels Berechnung des hydrophoben Interaktionsfelds

### 5.5.1 Korrelation bestehender dimensionsloser Retentionszeiten von Proteinen bei der hydrophoben Interaktionschromatografie

Um die Retentionszeiten bei der hydrophoben Interaktionschromatografie vorherzusagen, wurden bekannte dimensionslose Retentionszeiten (DRT) verwendet [154]. Es wurden nur Strukturen verwendet, die ausschließlich proteinogene Einträge enthielten. Nach der Berechnung der *solvent accessible surface* (SAS) durch das Programm DSSP wurde das hydrophobe Interaktionsfeld mittels der *DRY-probe* mit dem Programm GRID berechnet und anschließend daraus über das Programm VOLSURF das hydrophobe Interaktionsvolumen bei einer Stärke von  $-0.2$  kcal/mol bestimmt (Tabelle 5.7). Die Relation von hydrophobem Interaktionsvolumen zur SAS wurde anschließend in Bezug zur DRT gesetzt.

PROTEIN	PDB	DRT	HYDR. VOL.	SAS	REL. H. VOL/SAS
Ribonuklease A	1AFU	0.360	72	6891	0.0104
Ovotransferrin	1OVT	0.500	594	29130	0.0203
Thaumantin	1THV	0.660	254	9650	0.0263
Invertase Inhibitor	2CJ5	0.730	296	7948	0.0372
Alpha-Amylase	1BLI	0.749	542	17619	0.0307
Alpha-Laktalbumin	1A4V	0.930	237	7220	0.0328
Ovalbumin	1OVA	0.741	380	16057	0.0237

Tabelle 5.7: Experimentell bestimmte, dimensionslose Retentionszeiten (DRT) im Vergleich zum Verhältnis des hydrophoben Volumens und der SAS.



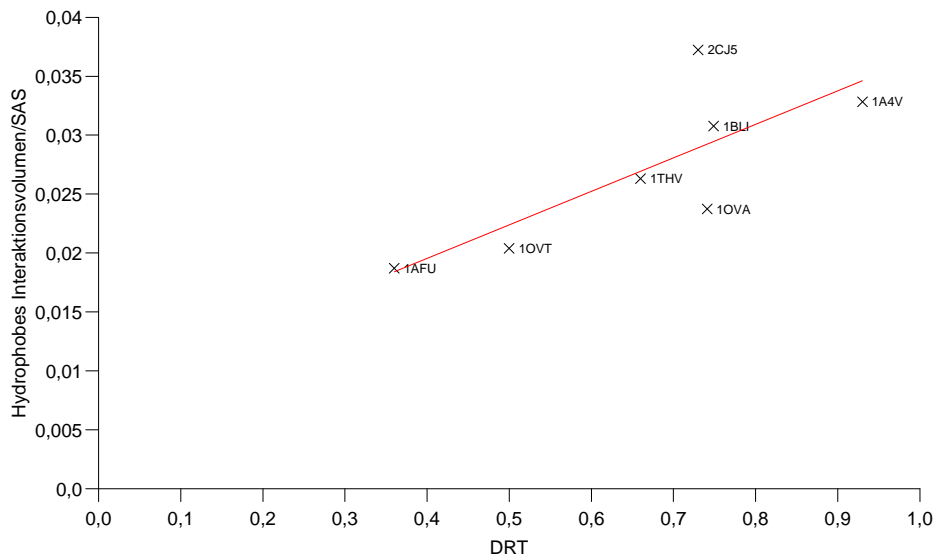


Abbildung 5.46: Der Vergleich der experimentell bestimmten, dimensionslosen Retentionszeiten (DRT) zu dem Verhältnis von hydrophobem Volumen zur SAS zeigt eine lineare Korrelation.

Der Vergleich zwischen dem berechneten Verhältnis von hydrophobem Interaktionsvolumen und der *solvent accessible surface* mit den experimentell ermittelten dimensionslosen Retentionszeiten zeigt eine lineare Korrelation (Abbildung 5.46). Der berechnete Korrelationskoeffizient liegt bei 0.78.

### 5.5.2 Korrelation experimentell gemessener Retentionszeiten bei der hydrophoben Interaktionschromatografie

Es wurden zusätzliche Retentionsdaten ermittelt. Hierfür wurden die Retentionszeiten verschiedener Proteine separat bei gleicher Salzkonzentration und pH-Wert gemessen und mit den theoretisch bestimmten Daten verglichen. Die chromatografischen Experimente wurden auf einer Äkta System (GE Healthcare) am Institut für Zellbiologie und Immunologie an der Universität Stuttgart gemessen. Es wurden HiTrap-Säulen (Amersham) für Butyl, Octyl und Phenyl (LS) mit einem Volumen von jeweils 1 ml verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Messung fand bei UV 280 nm statt.

## 5 Ergebnisse

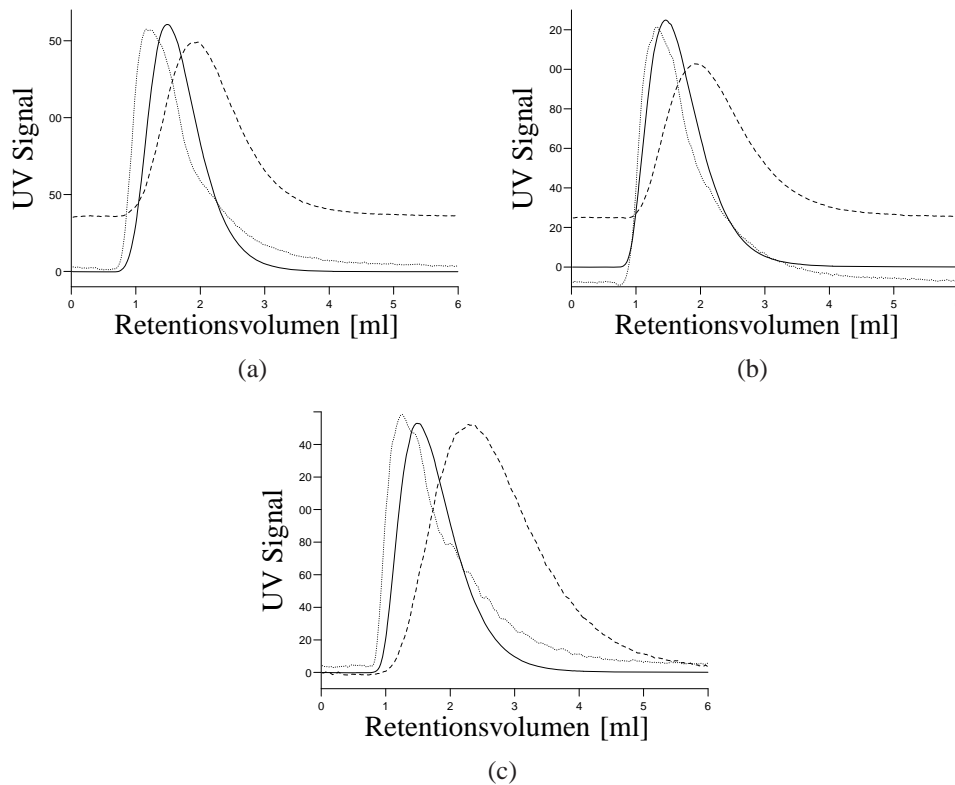


Abbildung 5.47: Experimentell ermittelte Retentionen von Mab01 (···), Chymotrypsinogen A (—) und Lysozym (---) für die Säulen mit Butyl- (a), Octyl- (b) und Phenyl- (c) liganden.

Die Reihenfolge der *peaks* für die Proteine war auf allen Säulen gleichartig. Mab01 und Chymotrypsinogen A wurden am schwächsten zurückgehalten und durchliefen die Säule am schnellsten. Sie folgten in kurzem Abstand aufeinander. Lysozym wurde im Vergleich zu den anderen Proteinen am stärksten zurückgehalten und durchlief die Säule am langsamsten. Der *peak* von Lysozym erschien mit deutlichem Abstand. Die Auftrennung der *peaks* von Mab01 und Chymotrypsinogen A war auf den Butyl- und Phenylsäulen etwas stärker als auf der Octylsäule. Der Antikörper Mab02 wurde auch gemessen. Jedoch konnte kein *peak* bei der Elution bestimmt werden.

Das Verhältnis von hydrophobem Volumen bei  $-0.2$  kcal/mol zur SAS wurden für das Modell von Mab01 und der Durchschnitt aus den PDB-Strukturen 1E8L, 2VB1 für Lysozym und den beiden Strukturen aus dem PDB-Eintrag 2CGA für Chymotrypsinogen A berechnet und mit den gemessenen Retentionszeiten verglichen. Die Ladungen der Proteine waren  $+16$  für Mab01,  $+4$  für Chymotrypsinogen A und  $+8$  für Lysozym.

PROTEIN	BUTYL	OCTYL	PHENYL	VERHÄLTNIS H.VOL/SAS
Mab01	1.155	1.338	1.256	0.095
Chymotrypsinogen A	1.487	1.458	1.488	0.082
Lysozym	1.953	1.904	2.284	0.171

Tabelle 5.8: Retentionszeiten der experimentell verwendeten Proteine im Vergleich zu den berechneten Werten aus dem Verhältnis von hydrophobem Volumen und SAS.

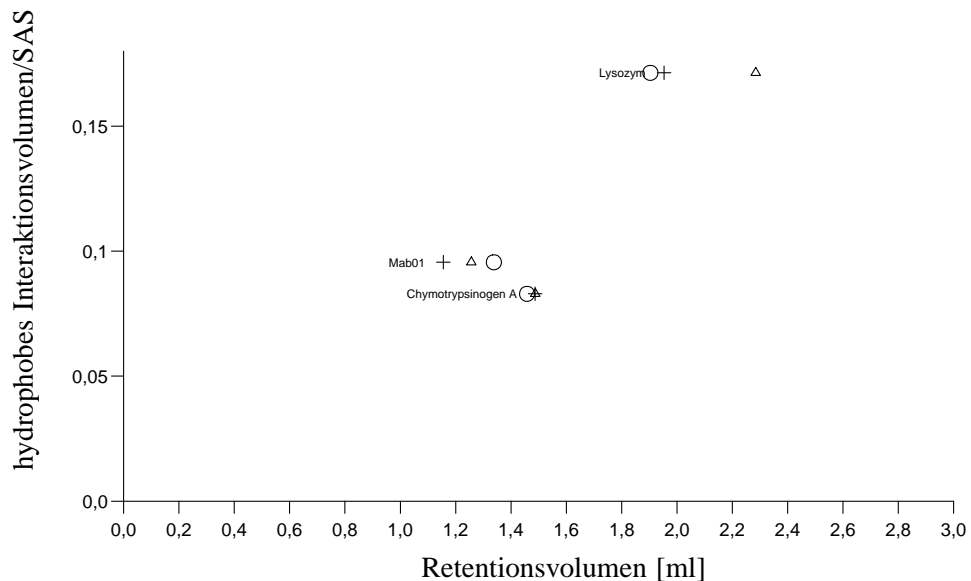


Abbildung 5.48: Der Vergleich der experimentell bestimmten Retentionszeiten zu dem Verhältnis von hydrophobem Volumen zur SAS zeigt eine lineare Korrelation. Experimentell wurde die Retentionszeit auf einer Phenyl- ( $\Delta$ ), Butyl- (+) und einer Octylsäule ( $\circ$ ) gemessen.

## 5 Ergebnisse

Die Retentionszeiten von Chymotrypsinogen A und dem Antikörper Mab01 wurden im gleichem Bereich vorhergesagt. Dies stimmte mit den experimentell ermittelten Werten überein. Auch im Bezug zu den ermittelten Werten von Lysozym ist das Verhältnis korrekt und eine lineare Korrelation kann angenommen werden. Vergleicht man die Werte der unterschiedlichen, experimentell verwendeten Säulen und deren Liganden, so war keine einheitlich stärkere bzw. schwächere Retention im Zusammenhang mit den Proteinen feststellbar.

# 6 Diskussion

## 6.1 Untersuchungen zur Vorhersage von Wechselwirkungen von Proteinen mit Ionenaustauschern

### 6.1.1 Untersuchungen zur Wechselwirkung von Lysozym mit Kationenaustauschern

Um molekulare Interaktionen von Proteinen mit Oberflächen zu modellieren, wurde bisher üblicherweise systematisch die Interaktionsenergie eines starren Modells des Proteins in verschiedenen Orientierungen und Distanzen zur Oberfläche berechnet [215, 141, 124, 177]. Es war jedoch nur eine indirekte experimentelle Validierung der Orientierung des Proteins auf der Oberfläche möglich. Für Ribonuclease A wurde bestimmt, dass die bevorzugte Orientierung mit dem aktiven Zentrum in Richtung der Oberfläche stattfinden muss [215]. Für die Validierung der Ergebnisse zur Untersuchung von Wechselwirkungen von Lysozym mit Kationenaustauschern lagen neue experimentelle Ergebnisse vor [50]. Hierbei wurde an den Kationenaustauscher Source 15S gebundenes Lysozym mittels Fluoreszenzlabel markiert und die unbedeckten Bereiche des Proteins über MALDI-TOF-Analyse identifiziert. Dadurch konnte die gebundene Orientierung von Lysozym rekonstruiert werden und eine Überprüfung der erstellten Methoden war im Falle von Lysozym möglich, um die Rolle der Flexibilität von Proteinen bei Bindungsvorgängen aufzuklären.

Die positiven Ladungen von Lysozym sind so angeordnet, dass es schwierig ist, die Orientierung auf einer negativen Oberfläche durch die Betrachtung der Elektrostatik vorherzusagen [21]. Es wurden zunächst fünf verschiedene positive *patches* an der Oberfläche des Proteins bestimmt. Das Protein hat damit das Potenzial, in unterschiedlichen Orientierungen an eine negative Oberfläche zu binden. Die experimentell ermittelte Bindungsorientierung lag im Bereich des *patch* 1.

### 6.1.2 Untersuchungen zur Wechselwirkung von Lysozym mit Kationenaustauschern über Orientierungsbestimmung mittels elektrostatischer Bindungsenergien (starre Methode)

Die Vorhersage der Orientierung des Proteins ist für die Berechnung von Interaktionsenergien, über welche sich beispielsweise ein Bezug zu Retentionszeiten setzen lässt, von großer Bedeutung. Auch bei der Immobilisierung von Proteinen kann diese Information von Belang sein, da eine Bindung auf dem Adsorbiermaterial im Bereich des reaktiven Zentrums dessen Inaktivierung zur Folge haben kann.

Die berechneten Bindungsenergien waren bei beiden Strukturen generell positiv. Dieses Verhalten wurde auch bei geringeren Abständen, abhängig von der Salzkonzentration, in vorherigen, rechnergestützten Studien von elektrostatischen Interaktionen bei nicht neutralen Gesamtladungen der Bindungspartner beobachtet [130, 150, 175]. Die berechnete Richtung des mittleren energiegewichteten Moments stimmte grob mit der experimentell bestimmten Orientierung überein. Die Landschaft der elektrostatischen Bindungsenergien stellte somit eine Näherung der Protein-Oberflächen-Interaktion dar.

Die Ergebnisse der starren Methode zeigten eine Abhängigkeit von der Proteinstruktur und der Distanz zur Oberfläche. Bei großen Distanzen wichen die berechneten Orientierungen stärker von der experimentell bestimmten Orientierung ab. Es zeigte sich, dass die Verwendung des globalen Minimums zur Orientierungsbestimmung am stärksten abhängig von der Proteinstruktur war. Die verlässlichste Methode war die Berechnung der Richtung des mittleren energiegewichteten Moments bei kurzen Distanzen. Hierbei wichen die Orientierungen von Struktur I und II bei einer Distanz von 1 Å um 40° bzw. 20° von der experimentell bestimmten Orientierung ab.

Beide Strukturen waren sich sehr ähnlich (*backbone* RMSD 1.6 Å). Sehr wahrscheinliche Ursache für die unterschiedlichen Abweichungen der Ergebnisse waren lokale strukturelle Unterschiede, die durch unterschiedliche Orientierung des C-Terminus nahe *patch 1* und der Konformation eines *loop* nahe *patch 2* vorlagen.

Auch der Vergleich mit einer bestehenden Publikation, bei der die Vorhersage der Orientierung von Lysozym auf einer negativ geladenen *self-assembled monolayer*-Oberfläche (COO-) mit der PDB-Struktur 7LYS [177] mittels einer starren Methode durchgeführt wurde, zeigt den möglichen Einfluss des C-Terminus auf. Dieser war in gleicher Weise wie bei Struktur I ausgerichtet. Die vorhergesagte Orientierung mit der PDB-Struktur 7LYS hatte eine Abwei-

chung von nur  $9^\circ$  von der vorhergesagten Orientierung von Struktur I. Die Abweichung von der experimentellen Orientierung lag bei  $43^\circ$ .

Die Rekonstruktion der experimentell bestimmten Orientierung zeigte, dass der C-Terminus in gebundenem Zustand in Richtung der Adsorberoberfläche weist und somit einen starken Einfluss auf die Bindung haben muss. Struktur II erwies sich bei der Ausrichtung des C-Terminus als Besonderheit. Verglichen mit 252 zum Zeitpunkt der Untersuchung verfügbaren, anderen PDB-Einträgen von Lysozym ist die Orientierung des C-Terminus bei Struktur II einzigartig. Die besondere Ausrichtung ist auf die Methylierung der Struktur zur Kristallisation zurückzuführen [206]. Die besseren Vorhersagen mit dieser Struktur legen nahe, dass es sich möglicherweise um die eingenommene Struktur bei der Bindung handeln könnte und diese sich deshalb besser für die Vorhersage eignet. Diese Problematik ist von *rigid docking*-Methoden bekannt, bei denen die Struktur der Proteinbindetasche möglichst dem substratgebundenen Zustand (*induced fit*) entspricht, um einen hohen *score* zu erzeugen [76]. Die Analyse der MD-Simulationen zeigte, dass der C-Terminus bereits früh Kontakt bei der Bindung von Lysozym mit der Oberfläche hat und sich somit auch auf die Bindungsorientierung auswirken muss. Er verhält sich allerdings sehr flexibel und es konnte keine bevorzugte Ausrichtung bei der Bindung festgestellt werden. Der wichtige Einfluss des C-Terminus auf die Orientierung bei der Bindung von Lysozym scheint somit nicht durch eine bevorzugte Ausrichtung, sondern durch seine Flexibilität gegeben zu sein.

Die Sensitivität in Bezug zur Ausrichtung des C-Terminus bei der Verwendung starrer Modelle in Verbindung mit Lysozym ist auch eine mögliche Ursache für widersprüchliche Ergebnisse bisheriger Untersuchungen. Die experimentell gemessenen Bindungsaffinitäten von Cytochrom *c* im Vergleich zu Lysozym konnten z. B. nicht reproduziert werden, während die gleiche Methode beim Vergleich der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren FGF-1 und FGF-2 Erfolg hatte [212]. Mit Modellen unterschiedlicher Komplexität konnten die experimentellen Werte von Lysozym erstaunlicherweise nicht von der komplexesten Form über eine Struktur in atomarer Auflösung, sondern mittels des einfachsten Modells als Kugel mit Ladung am besten bestimmt werden [149].

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bestimmung der Orientierung durch eine Methode, welche eine starre Proteinstruktur als Modell verwendet, abhängig von der Proteinstruktur ist. Eine Vorausbestimmung über die Eignung der hierfür verwendeten Struktur ist allerdings nicht möglich.

Die Bestimmung der Orientierung durch eine Methode, welche eine starre Proteinstruktur als Modell verwendet, kann großen Abweichungen von der experimentell bestimmten Orientierung unterliegen. Die Orientierungsbestimmung mittels MD-Simulationen lieferte weitaus

verlässlichere Ergebnisse, da die einbezogene Flexibilität des Proteins bei der Adsorption eine Vorhersage über die Änderungen in der Struktur ermöglicht.

### 6.1.3 Untersuchungen zur Wechselwirkung von Lysozym mit Kationenaustauschern mittels MD-Simulationen (flexible Methode)

Mittels MD-Simulationen wurde untersucht, welche Auswirkungen die Flexibilität des Proteins, wie auch der Ligandenmoleküle, auf die Orientierung bei der Adsorption von Lysozym auf einem Kationenaustauschermaterial hat. Beim Start der MD-Simulationen wurde die Struktur von Lysozym in einem Abstand von 25 Å zur Oberfläche platziert. Bei bisherigen MD-Simulationen zur Adsorption von Proteinen wurde das Protein dagegen üblicherweise nahe der Oberfläche platziert [37, 137, 33, 72].

Ausgehend von den unterschiedlichen Ausgangsorientierungen wurde während der Annäherungsphase an die Kationenaustauscheroberfläche eine Rotation der Proteinstrukturen beobachtet. Am Ende der Simulationen wurden die Orientierungen und die Bereiche, mittels derer Lysozym an der Oberfläche des Kationenaustauschers gebunden hat, bestimmt. Über einen großen Bereich der Proteinoberfläche wurde dabei nicht gebunden. Eine Platzierung nahe der Oberfläche hätte wahrscheinlich mögliche Bindungsorientierungen innerhalb dieses Bereichs identifiziert. Die Orientierungen, in denen die MD-Simulationen mit Struktur I und II binden, decken einen Bereich ab, welcher bei *patch* 1 und dem Zwischenraum zwischen *patch* 1 und *patch* 5 liegt.

Es kann angenommen werden, dass durch das geringe Dipolmoment [193] von Lysozym ein relativ großer Bindungsbereich von möglichen Orientierungen zustande kommt. Es konnte somit gezeigt werden, dass es im Gegensatz zur bisher üblichen Verfahrensweise, das Protein direkt auf der Oberfläche zu platzieren, notwendig sein kann, die MD-Simulation mit einem größeren Abstand des Proteins zur Oberfläche zu beginnen. Es ist wahrscheinlich, dass je geringer das Dipolmoment des Proteins und die Ladungsdichte der Oberfläche ist, desto größer der notwendige Abstand sein muss.

Es zeigte sich, dass die Distanz des Proteins vom Adsorber zu Beginn der MD-Simulationen von 25 Å ausreichend war. Dem Protein war es dadurch möglich, lange genug und frei zu rotieren, um eine spezifische Position bei der Bindung einzunehmen. Ein mehrmaliges, erneutes Anheben der bereits orientierten Struktur mit einer schrittweisen Verringerung der Abstände führte nicht zu einer Konvergenz des Bindebereichs auf eine eingeschränkte Region. Über die Berechnung des 2D RMSD der wiederholten MD-Simulationen konnte gezeigt werden, dass



die Struktur von Lysozym während des Adsorptionsvorgangs stabil blieb. Die Stabilität von Lysozym bei Adsorptionsvorgängen wurde auch experimentell nachgewiesen [62, 143]. Der Mittelwert von jeweils 14 ermittelten Bindungsorientierungen der MD-Simulationen von Struktur I und II hatte eine Abweichung von der experimentellen Orientierung von  $16^\circ$  und  $18^\circ$ . MD-Simulationen beider Strukturen führten somit zu einer Orientierung nahe an der experimentell bestimmten Orientierung und zeigten nicht die sensitive Abhängigkeit von der Startstruktur wie die starre Methode. Obwohl die Mittelwerte nahe der experimentellen Orientierung lagen, hatten gebundene Orientierungen einzelner MD-Simulationen eine Abweichung von bis zu  $84^\circ$ . Die Verwendung einzelner oder weniger MD-Simulationen zur Adsorption von Proteinen können also aufgrund einer schlechten Statistik zu großen Abweichungen von der experimentell bestimmten Orientierung führen. Oftmals wurden MD-Simulationen zur Adsorption von Proteinen mit nur wenigen verschiedenen Startorientierungen verwendet [37, 167]. Auch mehrere, verschiedene festgestellte Bindungsorientierungen zeigen [167], dass es wichtig sein kann, multiple MD-Simulationen mit verschiedenen Startorientierungen durchzuführen, um einen zuverlässigen Wert für die gemittelte Bindungsorientierung zu bestimmen.

Es kann angenommen werden, dass unterschiedliche Bindungsorientierungen auch beim realen Experiment auftreten. Mittels *total internal reflection fluorescence technique* wurden bereits Hinweise auf verschiedene Bindungsorientierungen bei niedrigen Konzentrationen von Lysozym auf einer negativen geladenen Oberfläche festgestellt [143]. Bei der experimentell bestimmten Orientierung handelt es sich auch um einen Mittelwert, da auch die Markierung der ungebundenen Proteinbereiche wiederum über einen Mittelwert bestimmt wurde [50].

Die berechneten Bindungsenergien zeigten tendenziell eine stärkere Bindung im Bereich des Mittelwerts auf. Es liegt also ein Energieminimum der gebundenen Bindungsorientierung im Bereich des *patch 1* vor.

Durch die visuelle Analyse des Bindungsverhaltens im präferierten Bereich wurde der Einfluss des C-Terminus bestimmt. Bereits zu Beginn des Adsorptionsprozesses nimmt der C-Terminus den ersten Kontakt zur Oberfläche auf und sorgt durch seine Flexibilität im *backbone* für einen Kippmechanismus, der dem N-Terminus den Kontakt zur Oberfläche des Kationenaustauschermaterials ermöglicht. Dieser Kontakt des N-Terminus wird unterstützt, indem ihm die Flexibilität des *backbone* in diesem Bereich die Möglichkeit gibt, einen Knick zu formen. Die Flexibilität der Seitenketten und der Liganden versetzt die Liganden in die Lage auseinanderzuweichen. Dies sorgt dafür, dass die Seitenketten zwischen die Liganden eindringen können und sich dadurch in der Oberfläche verankern.

Im Gegensatz zur starren Bestimmungsmethode wurden bei den MD-Simulationen negative

Bindungsenergien unter Verwendung der gleichen Methode zur Bestimmung der Bindungsenergien ermittelt. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise an der adaptierten molekularen Struktur des Proteins an die molekulare Struktur der Oberfläche. Dies verdeutlicht die Bedeutung der flexiblen Anpassung der Strukturen bei der Untersuchung von Wechselwirkungen von Proteinen mit Oberflächen.

### **6.1.4 Vergleich der Orientierungsbestimmung über elektrostatische Bindungsenergien mit MD-Simulationen**

Vergleicht man die Methode der Orientierungsbestimmung über ein starres Protein und elektrostatischen Bindungsenergien mit der flexiblen MD-Simulation, so zeigt sich, dass im Falle der MD-Simulation der Einfluss der Ausgangsstruktur auf die Vorhersage durch die gemittelten Orientierungen gering ist. Bei den MD-Simulationen führten jeweils beide Strukturen zu einer gemittelten Orientierung nahe der experimentellen Orientierung. Bei der starren Vorgehensweise über elektrostatische Bindungsenergien kann es jedoch struktur- und distanzabhängig zu größeren Abweichungen kommen. Eine grobe Vorhersage blieb allerdings auch in diesem Falle möglich.

Die Annahme liegt nahe, die guten Ergebnisse mit der starren Methode mit Struktur II der Struktur des C-Terminus zuzuordnen. Dessen Struktur sollte der bei der Adsorption eingenommenen gleichen und dadurch auch eine höhere Bindungsenergie zur Folge haben. Bei den MD-Simulationen konnte jedoch eine Präferenz für die Struktur des C-Terminus, ähnlich der Struktur II vorliegend, nicht ermittelt werden. Der Übergang beider Strukturen in die jeweilig andere konnte während der MD-Simulationen vor der Bindung des Proteins mehrfach beobachtet werden. In gebundenem Zustand des Proteins waren dann unterschiedliche Strukturen des C-terminus feststellbar.

## 6.2 Untersuchungen zur Wechselwirkung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit Anionenaustauschern

Für die Wechselwirkungen der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit positiv geladenen Oberflächen gab es im Vorfeld experimentelle Messungen der Retentionszeiten und der Gleichgewichtskonstante, welche von Dong-Qiang Lin an unserem Institut durchgeführt wurden. Großes Interesse besteht an der Immobilisierung von Cytochrom P450 an Oberflächen [145, 146], die auch im Bereich der enzymbeschichteten Elektroden Anwendung findet [129]. Hier spielt die Ausrichtung des Enzyms eine wesentliche Rolle für die Funktionsfähigkeit. Bei der Immobilisierung sollte der Substratzugangskanal nicht versperrt werden, zusätzlich sollte bei enzymbeschichteten Elektroden der elektronenakzeptierende Bereich des Proteins mit der Elektrode in Verbindung stehen.

### 6.2.1 Modellierung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne und MD-Simulation des *linker*-Bereichs

Da die Sequenz des *template* bis auf zwei fehlende Seitenketten im Bereich des *F-G-loop* und der fehlenden *linker*-Sequenz der *target*-Struktur entsprach, ist das ermittelte Modell bis auf den *linker*-Bereich von sehr guter Qualität. Dies bestätigte auch der PROSA-Qualitäts-Check. Die anschließende MD-Simulation führte zu einer Faltung und Anlagerung des *linker*-Bereichs an die Proteinstruktur. Für die hohe Qualität des Modells der kompletten Proteinstruktur sprechen der Z-Score, sowie die besseren Energiewerte des C-terminalen *linker*-Bereichs im Vergleich zum Modell und die stabile Struktur des C-terminalen *linker*-Bereichs während den späteren MD-Simulationen zur Bindung auf einer positiv geladenen Oberfläche.

### 6.2.2 Untersuchungen zur Wechselwirkung von CYP mit Anionenaustauschern über Orientierungsbestimmung durch elektrostatische Bindungsenergien (starre Methode)

Über die visuelle Betrachtung des elektrostatischen Potentials an der Oberfläche des Proteins kann bereits eine Vorhersage des bevorzugten Bindungsbereichs der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne auf einem Anionenaustauscher durchgeführt werden. Die Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne besitzt eine große, stark negative, distale Seite und eine kleine, proximale, schwach

positive Seite. Somit kann eine bevorzugte Bindungsorientierung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit der distalen Seite zur Anionenaustauscheroberfläche hin gerichtet angenommen werden. Dies wurde bestätigt durch die Vorhersage der Bindungsorientierung über die Berechnungen von elektrostatischen Bindungsenergien. Auch hier wurde eine klare Präferenz für die Bindung über die distale Seite aufgezeigt. Die Richtung des mittleren energiegewichteten Moments lag im Bereich der visuell ermittelten negativen, distalen Seite und entsprach einer Ausrichtung des Dipolmoments orthogonal zur Oberfläche. Das Dipolmoment ist wichtig für die Funktion des Cytochrom P450. Hierdurch wird die richtige Ausrichtung bei der Bindung an die FMN-Domäne ermöglicht [166].

### **6.2.3 Untersuchungen zur Wechselwirkung von CYP mit Anionenaustauschern über Orientierungsbestimmung durch MD-Simulationen (flexible Methode)**

Nach Beginn der MD-Simulationen rotierte das Protein zunächst bei allen Simulationen in eine Orientierung, die der Ausrichtung des Dipolmoments orthogonal zu Oberfläche des Anionenaustauschers entspricht. Nach der Annäherung in dieser Ausrichtung und dem ersten Kontakt über den *F-G-loop* erfolgte sodann ein Kippen des Proteins. Auch dieser Vorgang wurde bei allen MD-Simulationen beobachtet. Der im Gegensatz zu den MD-Simulationen mit Lysozym sehr gleichartige Ablauf und die gleichartige Bindungsorientierung der MD-Simulationen mit der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne ist sicherlich Resultat des starken Dipolmoments der P450-BM3-Hämdomäne.

Beim Kontakt mit der Oberfläche wurde der *F-G-loop* deformiert, was möglicherweise aufgrund der Verwendung von implizitem Lösungsmittel geschah. Das Protein wurde möglicherweise zu stark beschleunigt, da bei Verwendung von implizitem Lösungsmittel die Verdrängung von Wassermolekülen nicht berücksichtigt wird.

### **6.2.4 Vergleich der Orientierungsbestimmung über elektrostatische Bindungsenergien mit MD-Simulationen für CYP**

Beim Vergleich zwischen der starren Methode und MD-Simulationen zeigt sich, dass die Richtung des energiegewichteten mittleren Moments der starren Methode mit der Orientierung des Proteins während der Annäherungsphase der MD-Simulationen vor dem Kontakt mit der Oberfläche übereinstimmt. Jedoch wird durch die MD-Simulationen gezeigt, dass eine weitere

Veränderung der Orientierung durch ein Kippen an der Oberfläche des Adsorbentmaterials erfolgt. Diese Folgeerscheinung ist in diesem Fall auch anhand der Betrachtung der Struktur des Proteins nachvollziehbar, zeigt jedoch eine Schwäche der starren Methode der Orientierungsbestimmung mittels elektrostatischer Bindungsenergien. Veränderungen der Orientierung des Proteins, die durch den Kontakt mit der Oberfläche zustande kommen, sind über eine starre Methode schlecht vorhersagbar.

Die Bindung an eine positive Oberfläche wird mit beiden Methoden über die distale Seite des Proteins vorhergesagt. Eine positive Beschichtung bei der Immobilisierung auf enzymbeschichteten Elektroden mit Polyethylenimin konnte deshalb wahrscheinlich zwar zu einer guten Bindung, jedoch aber nur zu einer schlechten Elektronenübertragung führen [129]. Andere Cytochrom P450-Proteine haben einen ähnlichen Aufbau und binden auch an positiv geladenen Oberflächen [183]. Auch Aktivität wurde in diesen Fällen gemessen. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass der Substratzugang und -ausgang eingeschränkt wird, da die Bindung über den *F-G-loop* erfolgt und dieser einen großen Einfluss auf den Substratkanal hat [195]. Durch die Bindung über den *F-G-loop* ist dessen Beweglichkeit und somit auch die des Substratkanals stark eingeschränkt. Die Immobilisierung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne an einer negativ geladenen Oberfläche konnte an unserem Institut durchgeführt werden und katalytische Aktivität wurde festgestellt [200]. Eine Orientierung mit der proximalen Seite zur Oberfläche weisend kann daher angenommen werden.

### **6.2.5 Vergleich der Orientierungsbestimmung von CYP und Lysozym über elektrostatische Bindungsenergien mit MD-Simulationen**

Es konnte gezeigt werden, dass mittels Orientierungsbestimmung über elektrostatische Bindungsenergien nur eine grobe Vorhersage der gebundenen Orientierung bei der Ionenaustauschchromatografie für die untersuchten Proteine möglich ist. Wie sich jedoch durch die MD-Simulationen gezeigt hat, wird die Orientierung und die Struktur eines Proteins durch das elektrostatische Potenzial bei der Adsorption beeinflusst. Dies kann zu verschiedenen Veränderungen während des Bindungsvorgangs führen. Bewegungsabläufe sind nach der Bindung, wie das Kippen der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne an der Oberfläche, möglich. Die vorhergesagte, gebundene Orientierung über elektrostatische Bindungsenergien entsprach hier der Orientierung des Proteins während der Annäherungsphase bei den MD-Simulationen. Die durch den Bindungsvorgang induzierte Orientierungsänderung konnte durch die starre Methode nicht vorhergesagt werden. Solche, durch den Adsorptionsvorgang selbst ausgelösten

Veränderungen, wurden bei allen MD-Simulationen sowohl mit Lysozym als auch mit der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne beobachtet und konnten nicht durch die starre Methode über die Berechnung der elektrostatischen Bindungsenergien vorhergesagt werden. Die Verwendung von MD-Simulationen ist somit zur Klärung der genauen Bindungsabläufe und zur exakten Orientierungsvorhersage notwendig. Dennoch war eine grobe Vorhersage der Orientierung auch mittels der starren Bestimmungsmethode möglich.

Beide Proteine zeigten nur geringe Veränderungen der Struktur durch die Bindung. Der überwiegende Teil der Proteinstruktur blieb stabil. Bei Lysozym unterlag hauptsächlich nur der C- und N-Terminus, bei der P450-BM3-Hämdomäne nur der F-G-loop den Veränderungen. Experimentell wurden bereits mit Ribonuclease A und  $\alpha$ -Lactalbumin über Raman-Spektroskopie die Strukturveränderungen bei der Bindung an einen Ionenaustauscher untersucht [156]. Auch hier wurden nur geringe Veränderungen der Proteinstrukturen festgestellt.

Während die gebundenen Orientierungen von Lysozym unterschiedlich waren und einen breiten Orientierungsbereich abdeckten, so war bei der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne nur eine präferierte Orientierung festzustellen. Als wahrscheinlichster Grund für diesen Unterschied sind hier das Dipolmoment, welches bei Lysozym eher schwach ist und bei der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne eher stark ist, anzusehen. Auch das Vorhandensein mehrerer positiver *patches* bei Lysozym, während die Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne in eine leicht positive und eine negative Seite eingeteilt ist, führt wahrscheinlich zu diesen unterschiedlichen Verhaltensweisen. Proteine können sich bezüglich des bei der Bindung verwendeten Orientierungsbereichs also sehr unterschiedlich verhalten.

### **6.3 Untersuchung der Bindungsstärke der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit Anionenaustauschern bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen**

Die berechneten Bindungsenergien zeigten in Abhängigkeit von der Salzkonzentration eine lineare Korrelation zu den experimentell gemessenen Werten. Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, die theoretischen Messwerte der Adsorption aus MD-Simulationen mit experimentellen Messungen in einen direkten Bezug zu setzen. Die berechneten Bindungsenergien der starken Adsorberliganden SuperQ und QAE wiesen Werte im gleichen Bereich auf. Dies korrelierte auch beim Vergleich mit experimentellen Messungen der Gleichgewichtskonstante. Leichte Abweichungen lagen möglicherweise an der leicht unterschiedlichen Ligandenstruktur oder der Beschaffenheit der Materialoberflächen, wie zum Beispiel ein etwas abweichender

Ligandenabstand oder der Aufbau der Adsorbermatrix. Ein Einfluss ist auch durch die abweichende Partikelgröße der Materialien möglich.

Die Steigung der schwachen Adsorberliganden bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen war zunächst im Vergleich zu den starken Ionenaustauschern flacher. Nach der Berücksichtigung der Protonierbarkeit durch die Anpassung der Ladungen entsprechend des vorliegenden pH 7 wurde dieselbe Korrelation beim Vergleich der starken und schwachen Adsorber erreicht.

Die hohen, abstoßenden, elektrostatischen Bindungsenergien aus den Berechnungen mit der starren Methode traten, wie auch bei Lysozym, bei den flexiblen MD-Simulationen nicht auf.

## 6.4 Parametrisierung von Ionenaustauscherliganden

Bei der Parametrisierung der Liganden wurde festgestellt, dass die Unterschiede in Ladung und elektrostatischem Potenzial ausschließlich im variablen Bereich lagen. Die Auswirkungen auf den Bereich, der den Übergang zur Matrix darstellt, war im Vergleich der unterschiedlichen Ligandengruppen gering. Der Einfluss auf die Ergebnisse ist daher auch als gering anzunehmen.

## 6.5 Modellierung der Adsorberoberfläche

Die Oberfläche der Adsorber wurde als planare Oberfläche modelliert. Diese kann als ein Mittel der Oberfläche betrachtet werden, wenn der mittlere Porendurchmesser des Materials im Vergleich zum Proteindurchmesser groß ist. Die Verwendung einer planaren Oberfläche bei der Modellierung von Adsorptionsvorgängen wurde in vielen Fällen erfolgreich angewandt [9, 28, 123, 126, 140, 141, 142, 177, 180]. Auch der Abstand der Liganden entspricht dem gemittelten Aufbau der auf den Daten, die von D.Q. Lin im Rahmen des „Programms des Projektbezogenen Personenaustauschs (PPP)“ ermittelt wurden. Aufgrund des flachen Modells der Adsorberoberfläche konnte hier die experimentell beobachtete Bindungsorientierung von Lysozym wiedergegeben werden [50].

## 6.6 Untersuchungen zur Wechselwirkung von Antikörpern

### 6.6.1 Simulation von vollständigen Antikörpern und Auswirkungen der Glykosylierung

Die verwendeten Modelle der Antikörper Mab01 und Mab02 wurden auf der Grundlage eines weiteren Modells [128] erstellt, da die Kristallstrukturen vollständiger Antikörper (PDB-Einträge: 1HZH [159], 1IGY [78] und 1IGT [77]) von der allgemein in Lösung angenommenen Y-Form eines Antikörpers aufgrund der asymmetrischen Form der Fab- und Fc-Bereiche abweichen. In der Struktur 1IGY ist zudem eine Deformation des Fc-Bereichs durch ein Abwinkeln zwischen den  $C_H2$ - und  $C_H3$ -Domänen vorhanden. Der PROSA-Qualitäts-Check zeigte, dass die erstellten Modelle von guter Qualität sind.

Zu einer weiteren Überprüfung der Qualität der erstellten Antikörper-Modelle wurde eine MD-Simulation des Antikörpers Mab01 mit Glykosylierung über 20 ns durchgeführt. Die Fab-Bereiche und der Fc-Bereich blieben während der gesamten Simulationsdauer stabil. Dies zeigt, dass eine Modellierung aufgrund des Modells von Padlan [128] als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen kann. Beim Vergleich des PROSA-Qualitäts-Checks des Modells mit der Struktur nach der MD-Simulation zeigte sich, dass die modellierten, antigenerkennenden Bereiche weiter verbessert wurden. Dies wird wahrscheinlich durch die Differenz der *template*-Sequenz von der *target*-Sequenz, welche sich in diesem Bereich stark unterscheiden, verursacht. Im Verlauf der MD-Simulation konnten sich die antigenbindenden Bereiche neu ausrichten. Strukturen in diesem Bereich sind bei Antikörpern generell sehr variabel, da sie die Spezifität bezüglich des Antigens bestimmen [25, 205].

Um die strukturellen Veränderungen eines unglykosylierten Antikörpers zu untersuchen, wurde ausgehend von dem Modell Mab01 eine zusätzliche MD-Simulation ohne Glykosylierung über 20 ns durchgeführt. Nach 11 ns Simulationszeit wurde eine Veränderung im Fc-Bereich beobachtet, welche durch eine abweichende Positionierung einer  $C_H2$ -Domäne zustande kommt. Es kommt zu einem Auseinanderweichen der  $C_H2$ -Domänen der schweren Ketten. Oligosaccharide der konservierten Asparagine im Fc-Bereich von Antikörpern werden normalerweise zwischen den beiden  $C_H2$ -Domänen eingefasst. Interaktionen zwischen den Oligosacchariden und den Aminosäuren sind entscheidend für die strukturelle Integrität der  $C_H2$ -Domänen [45, 53, 97, 147, 160, 179]. Es wurde gezeigt, dass die Entfernung der Oligosaccharide eine Konformationsänderung im Bereich der  $C_H2$ -Domänen hervorruft [53, 97, 107, 147]. Diese Beobachtungen wurden mittels der durchgeführten MD-Simulationen



bestätigt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Veränderung hauptsächlich durch das Auseinanderweichen einer  $C_H2$ -Domänen am proximalen Ende der *hinge*-Region zustande kommt. Starke Veränderungen speziell in diesem Bereich wurden beim unglykosylierten Antikörper auch experimentell bestimmt [97, 107]. Es wurde allerdings bisher angenommen, dass die stabilisierende Wirkung der Glykosylierung durch das Unterbrechen der hydrophoben Wechselwirkungen der  $C_H2$ -Domänen untereinander geschieht und dass sich diese durch ein Entfernen der Glykosylierung aufeinander zu bewegen und die hydrophoben Bereiche miteinander interagieren [118]. Es konnte nun gezeigt werden, dass die Veränderung auch über das Auseinanderweichen der  $C_H2$ -Domänen verursacht werden kann. Der Übergangsbereich zwischen der  $C_H2$ - und  $C_H3$ -Domäne dient dabei als „Scharnier“. Innerhalb der abweichenden  $C_H2$ -Domäne wurde ein *loop* nahe des Übergangsbereichs zwischen der  $C_H2$ - und  $C_H3$ -Domäne im Vergleich zur Ausgangsstruktur etwas verschoben. Ein weiterer Bereich im oberen Teil der  $C_H2$ -Domäne, bestehend aus einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, unterlag stärkeren Abweichungen. Dieser steht normalerweise in Kontakt mit der Glykosylierung und wird durch ihr Fehlen destabilisiert. Die gesamte übrige  $\beta$ -Faltblattstruktur der  $C_H2$ -Domänen blieb während der gesamten Simulationszeit stabil. Die durch die MD-Simulation gezeigte geringe Veränderung des Zwischenbereichs der  $C_H2$ - $C_H3$  Domänen von jeweils einer schweren Kette wird experimentell durch die unveränderte Oxidationsrate der Methionine beim Vergleich zwischen glykosyliertem und unglykosyliertem Antikörper unterstützt [108]. Eine größere strukturelle Veränderung in diesem Bereich würde die Methionine stärker exponieren und die Oxidationsrate würde ansteigen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Antikörper ein hohes Maß an Flexibilität der Fab- und Fc-Bereiche zueinander besitzen [205]. Auch in der MD-Simulation sind die Fab-Bereiche in Bezug zum Fc-Bereich äußerst beweglich, sodass sich ein asymmetrisches Bild der Gesamtstruktur nach der Simulation ergab. Entgegen der Annahme zu Beginn, dass die typische Gestalt eines Antikörpers in Lösung in einer Y-Form vorliegt, hat sich gezeigt, dass durch die Beweglichkeit ein großer Konformationsbereich eingenommen werden kann. Auch der Verlust der Kontakte der Fab-Bereiche, die während der MD-Simulation mit Glykosylierung beobachtet wurde, ist bei Kristallstrukturen vorhanden. Verschiedene Konformationen sind auch hier durch die Beweglichkeit der Fab-Bereiche zueinander möglich. Eine Veränderung des Fc-Bereichs durch Abwinkeln wie bei der Kristallstruktur 1IGY [78] wurde allerdings nicht beobachtet, dies wurde möglicherweise durch Kristallkontakte verursacht.

## 6.6.2 Untersuchung zur Wechselwirkung von IgG1-Antikörpern mit Kationenaustauschern

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Vorhersage der Bindungsorientierung von Antikörpern auf Kationenaustauschern. Die Ionenaustauschchromatografie ist eine Methode um die Heterogenität von Antikörpern zu untersuchen. Üblicherweise eluieren monoklonale Antikörper bei der Analyse durch Ionenaustauschchromatografie in multiplen *peaks*. Es wurden mehrere Faktoren für verschiedene Retentionszeiten gefunden, wie das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit eines C-terminalen Lysins [18, 84, 91], die Zyklisierung des N-terminalen Glutamin zu Pyroglutamat [18, 157], die Desamidierung [79, 110], die Isomerisierung [79], die Amidierung [158], die Oxidation von Methioninseitenketten [35], die Anwesenheit von Sialinsäure [110, 158] und die Abhängigkeit von unterschiedlichen Glykosylierungsmustern [61].

Bei der Berechnung der elektrostatischen Bindungsenergien wurden für die identifizierten Faktoren korrespondierende Bereiche mit starken Bindungsenergien festgestellt.

Beispielsweise wird der starke Einfluss der C-terminalen Lysine auf die Retentionszeiten bei der Kationenaustauschchromatografie [18, 84] auch durch die starken Bindungsenergien in diesem Bereich wiedergegeben. Die Richtung des mittleren energiegewichteten Moments aller Bindungsenergien zeigte eine präferierte Bindung für den Bereich der C-terminalen Lysine auf. Eine weitere bevorzugte Orientierung des Antikörpers war flach aufliegend. Die festgestellten Einflüsse durch Desamidierung [132] und Änderungen in der Glykosylierung [61] können in dieser Orientierung des Antikörpers zum Tragen kommen und zeigen einen möglichen Einfluss dieser Regionen auf. Eine etwas weniger bevorzugte Orientierung wurde über die antigenerkennenden Bereiche festgestellt. Durch Änderungen in diesem Bereich konnte auch experimentell bereits ein Einfluss bei der Kationenaustauschchromatografie bestimmt werden [87].

In der vorliegenden Arbeit konnte damit gezeigt werden, dass Antikörper Bindungsstellen mit stärkeren Bindungsenergien besitzen und dass Änderungen an diesen Bindungsstellen zu einer Auswirkung auf das Bindungsverhalten bei der Kationenaustauschchromatografie und damit auch der Retentionszeiten führen. Diese Regionen waren mittels der Berechnungen des elektrostatischen Potentials und der Bindungsenergien bestimmbar.

Wie bei der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne und Lysozym gezeigt wurde, ist die genaue Berechnung einer bevorzugten Bindungsorientierung mit der verwendeten starren Methode nicht möglich. Bei Antikörpern kommt die starke Beweglichkeit der Fab-Bereiche in Bezug zum Fc-Bereich hinzu, welche auch in den MD-Simulationen mit Antikörpern festgestellt wurde. Auch die antigenerkennenden Bereiche können eine hohe Beweglichkeit besitzen [90].

Der Einfluss dieser flexiblen Bereiche wird bei dieser Methode nicht berücksichtigt. Eine starke Veränderung der Struktur der Fab- und Fc-Bereiche zueinander während der Adsorption kann als sehr wahrscheinlich angenommen werden, da sich diese auch in Kristallstrukturen sowie den durchgeführten MD-Simulationen gezeigt hat. MD-Simulationen mit Antikörpern über einer Oberfläche konnten nicht durchgeführt werden, da durch die Dimensionen der Antikörper und die zu berechnenden, langreichweitigen Wechselwirkungen die zur Verfügung stehende Rechenkapazität nicht ausreichte, um in der verfügbaren Zeit zu Ergebnissen zu gelangen.

## 6.7 Vorhersage von Retentionszeiten in der hydrophoben Interaktionschromatografie mittels Berechnung des hydrophoben Interaktionsfelds

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Berechnung des Verhältnisses von hydrophobem Interaktionsvolumen und SAS eine lineare Korrelation zu den Retentionszeiten der verwendeten Proteine besteht. Dies wurde zunächst mit bereits bekannten dimensionslosen Retentionszeiten [154] durchgeführt und im Anschluss mit experimentell bestimmten Retentionszeiten unter Einbeziehung von Antikörpern bestätigt. Ein Nachteil von bereits bekannten Daten, wie auch bei den meisten bisherigen Untersuchungen ist, dass sie mit kleinen, eher kugelförmigen Proteinen durchgeführt wurden [32, 105, 154], welche ein Molekulargewicht von weniger als 80 kDa besitzen. Bei einer Untersuchung wurden Proteine höheren Molekulargewichts miteinbezogen [30], wobei eine Lipoxidase,  $\gamma$ -Globulin und eine Katalase verwendet wurden. Ein Deskriptor für die Globularität wurde eingeführt [32], jedoch wiederum nur auf kleine Proteine angewendet.

Antikörper unterscheiden sich stark in Gestalt und Größe von der Form der üblicherweise untersuchten Proteine. Mit ca. 140 kDa haben Antikörper ein relativ hohes Molekulargewicht und die Abweichung von einer Kugelform ist durch die gegebene Y-förmige Struktur erheblich. Das Verhältnis vom Volumen zur Proteinoberfläche wird umso bedeutungsvoller, je mehr die Proteinstruktur von der Kugelform abweicht. Mit der Benutzung des hydrophoben Interaktionsvolumens konnte auch dem Volumen der Proteine Rechnung getragen werden. Die Möglichkeit einer Einflussnahme der Größe des Proteins wurde bereits vermutet [12, 30] und zusammen mit der hydrophoben Oberfläche als eine wichtige Eigenschaft von Deskriptoren bei der HIC [32] identifiziert. Durch die Verwendung von Antikörpern konnte gezeigt werden,

dass das hier angewendete Verfahren auch mit großen Proteinen funktioniert, die außerdem stark von der üblichen kugelförmigen Struktur abweichen.

Im Vergleich zu anderen üblichen Methoden, welche zur Vorhersage die Hydrophobizität der Proteinoberfläche miteinbeziehen, wurden keine Hydrophobizitätsskalen verwendet. Es wurde bereits festgestellt, dass Methoden, die Hydrophobizitätsskalen verwenden, abhängig von der angewandten Proteinstruktur und Hydrophobizitätsskala unterschiedliche Ergebnisse liefern [105]. Mittels des verwendeten Programms Grid wurden stattdessen die Interaktionen mit einer hydrophoben *probe* [38] berechnet.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass es auch ohne komplexe Bestimmung von Deskriptoren und ohne *non-linear support vector machines* über die Erstellung von *quantitative structure property relationship*-Modellen [30, 99] möglich ist, eine schnelle und einfach durchzuführende Methode zur Bestimmung der Retentionszeiten mehrerer Proteine im Verhältnis zueinander vorzunehmen. Der Vorteil der hier angewendeten Methode ist, dass diese ohne vorherige Bestimmung von Daten verwendbar ist.

Es hat sich herausgestellt, dass die verwendeten Proteine zusammen mit den verwendeten Säulenmaterialien und den Liganden Butyl, Octyl und Phenyl leicht unterschiedliche Retentionen ergeben. Die stärkere Retention eines Proteins mit einem bestimmten Liganden ist nicht unbedingt auch mit einem anderen Liganden gegeben. Dies stimmt mit bisher gemachten Beobachtungen überein [99].

## 6.8 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne an eine positive Oberfläche auf der für die Elektronenübertragung ungünstigen, distalen Seite des Proteins erfolgt. Bei der Immobilisierung auf enzymbeschichteten Elektroden wäre eine Verbesserung der Orientierung durch die Modifikation über Mutationen in positive Aminosäuren im distalen Bereich und negative Aminosäuren im proximalen Bereich denkbar. Auch eine Immobilisierung auf negativ beschichteten Elektroden könnte vorgenommen werden. Eine Bindung an eine negativ geladene Oberfläche von Silikaten konnte bereits durchgeführt werden [200].

Bei der Aufreinigung von Antikörpern mittels Kationenaustauschchromatografie verspricht das einbringen von C-terminalen Lysinen in den schweren Ketten eine stärkere Retention. Diese haben den größten Einfluss bei der Bindung. Die antigenerkennenden Bereiche werden hierbei nicht beeinflusst und auch der Bereich der Glykosylierung, welcher für Rezeptorwechselwirkungen wichtig sein kann, würde keiner, möglicherweise in der späteren Anwendung

störenden, Modifikation unterliegen. Allerdings ist der Grund für die Heterogenität monoklonaler Antikörper im Bereich der C-terminalen Lysine noch nicht geklärt. Die Anwesenheit einer Carboxypeptidase wird als Ursache vermutet [48].

Bei der Anwendung der vorgestellten Methoden auf weitere Proteine ist die starre Methode nur im Fall einer erwünschten groben Vorhersage der einflussreichen Regionen bei der Bindung anzuraten. Für die detaillierte Bestimmung des Vorgangs und der Orientierung bei der Bindung sind allerdings multiple MD-Simulationen mit einer ausreichenden Distanz von Protein und Adsorber zu Beginn der Simulationen notwendig.



# 7 Material und Methoden

## 7.1 Theoretische Arbeiten

### 7.1.1 Verwendete Software

SOFTWARE	VERWENDUNG	REFERENZ
AMBER 8	Molekulardynamische Simulationen	[29]
ArgusLab 4.0.1	Visualisierung/Erstellung von Proteinstrukturen	[186]
BLAST	Suche nach homologen Sequenzen	[13]
ClustalX	Multisequenz- <i>alignment</i>	[185]
Delphi	Elektrostatisches Potenzial	[144]
DSSP	Wasserzugängliche Oberfläche	[92]
Fortran	Programmierung	<a href="http://www.g95.org">http://www.g95.org</a>
Swisspdbviewer	Visualisierung von Proteinstrukturen	[70]
Gaussian 98	<i>Ab initio</i> -Parametrisierungen	[60]
Grid	Hydrophobes Interaktionspotenzial	<a href="http://www.moldiscovery.com">http://www.moldiscovery.com</a>
MCCE	$pK_a$ -Werte von Aminosäuren	[63]
Tcl	Programmierung	<a href="http://www.tcl.tk">http://www.tcl.tk</a>
Modeller 8	Homologie-Modellierung	[155]
Perl	Programmierung	<a href="http://www.perl.com">http://www.perl.com</a>
ProFIT	Überlagerung von Proteinstrukturen	[6]
Python	Programmierung	<a href="http://www.python.org">http://www.python.org</a>
PROSA 2003	Qualitätskontrolle von Homologiemodellen	[168]
Pymol	Visualisierung von Proteinstrukturen	[46]
VMD	Visualisierung von Proteinstrukturen	[85]
VolSurf	hydrophobes Volumen	[40]
NCBI	Sequenz-/Literaturrecherche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
PDB Protein Data Bank	Proteinstruktur Datenbank	[19]
Swiss Prot	Proteinsequenz-Datenbank	<a href="http://www.expasy.ch/sprot">http://www.expasy.ch/sprot</a>

Tabelle 7.1: Übersicht der verwendeten Software und Datenbanken.

## 7.1.2 Eingesetzte Hardware

Sämtliche Simulationen und Berechnungen wurden auf institutseigenen *PC-cluster* durchgeführt. Es handelt sich um einen mit Myrinet *interconnect* ausgestatteten Linux-*cluster* mit 128 *nodes* und 256 Prozessoren, sowie einen weiteren mit InfiniBand *interconnect* ausgestatteten Linux-*cluster* der momentan über 24 *nodes* und 240 Prozessoren verfügt.

## 7.1.3 Suche nach homologen Sequenzen (BLAST)

BLAST (*basic local alignment search tool*) ist ein heuristischer Suchalgorithmus, der 1990 am NCBI entwickelt wurde [13]. Heuristische Verfahren sind eine Annäherung an die Berechnung von Sequenz-*alignments* mit dem Smith & Waterman- [172] oder Needleman & Wunsch-Algorithmus [123]. Sie ermöglichen es, innerhalb kurzer Zeit ganze Datenbanken nach ähnlichen Sequenzen zu durchsuchen.

## 7.1.4 Homologiemodellierung

Die Homologiemodellierung ist eine Methode um die Tertiärstruktur eines Proteins, ausgehend von der Aminosäuresequenz, zu modellieren. Die Struktur des Proteins wird vorhergesagt, indem seine Sequenz (*target*) mit der Sequenz eines homologen Proteins bekannter Struktur (*template*) verglichen wird [54, 114]. Der erste Schritt der Homologiemodellierung ist die Erstellung eines verlässlichen Sequenz-*alignment*, sodass äquivalente Aminosäuren beider Proteine übereinstimmen. Die Qualität des *alignment* ist ein entscheidender Faktor für die Qualität des zu erstellenden Homologiemodells. Je niedriger die Identität zwischen den Sequenzen des *template* und des *target* ist, umso schwieriger ist es, ein verlässliches *alignment* zu erstellen und umso schwieriger wird es folglich, ein qualitativ gutes Homologiemodell zu erhalten. Aufgrund des *alignment* wird die Struktur des *target* nach Vorgabe der *template*-Struktur festgelegt. Insertionen oder Deletionen von Aminosäuren, welche hauptsächlich in den variablen *loop*-Regionen der Proteine vorkommen, werden anschließend eingefügt und es erfolgt eine Energieminimierung der erstellten Struktur. Die in dieser Arbeit verwendeten Homologiemodelle wurden mit dem Programm Modeller 8v2 [155] unter Verwendung der Standardparameter, erstellt. Eine Qualitätskontrolle der erstellten Homologiemodelle wurde mittels des Programms PROSA 2003 durchgeführt [168].



#### 7.1.4.1 Erzeugung des P450-BM3-Häm-domäne Homologiemodells mit *linker*

Zunächst wurden alle vorhandenen P450-BM3 Monooxygenase PDB-Einträge auf eine möglichst hohe Abdeckung der gesuchten Sequenz untersucht. Der Eintrag 1JPZ mit einer Auflösung von 1.65 Å [74] enthielt hierbei die größte Sequenzähnlichkeit bei gleichzeitig maximal enthaltenen Strukturinformationen. Fehlenden Aminosäuren am C-terminalen Bereich und fehlende Seitenketten der Aminosäuren 1 bis 4 und 229 enthielt die Kette A, während die Seitenketten der Aminosäuren 228 und 229 bei Kette B fehlten. Aufgrund der geringsten Abweichungen wurde die Struktur 1JPZ Kette B zur weiteren Modellierung ausgewählt. Der nach der Modellierung, durch das Fehlen in der *template*-Struktur, noch abstehende C-terminale Bereich wurde anschließend mittels einer molekulardynamischen Simulation behandelt.

#### 7.1.4.2 Erzeugung der Antikörper Homologiemodelle

Durch einen Abgleich mit der Swiss-Prot-Datenbank [19] wurde festgestellt, dass es sich bei der N-terminalen Sequenz des Antikörpers Mab01 um eine Signalsequenz handelt. Auf Anfrage teilte die Firma Boehringer-Ingelheim mit, dass der Bereich nicht exprimiert wird und somit bei der Modellierung entfernt werden kann. Eine nähere Beschreibung des Glykosylierungsmusters stand nicht zur Verfügung. Allerdings wurde das Vorhandensein bestätigt sowie auch experimentell nachgewiesen. Nach Erhalt der Sequenzen der Antikörper Mab01 und Mab02 wurde die Signalsequenz beim Antikörper Mab01 abgeschnitten und das Glykosylierungsmuster der *template*-Struktur von Padlan [128] übernommen. Die Glykosylierung wurde als „block“-*residue* bei der Modellierung miteinbezogen.

### 7.1.5 Berechnung des elektrostatischen Potentials

Zur Berechnung des elektrostatischen Potentials von Proteinen sind verschiedene Programme erhältlich. Die üblicherweise verwendete Methode führt über eine numerische Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung mithilfe der Finite-Differenzen-Methode (FDBP). Hierfür wird der Raum in ein kubisches Gitter (*grid*) zerlegt, dessen Gitterpunkten jeweils konstante Werte des elektrostatischen Potentials und der Ladungsdichte zugeordnet werden. Die Differenzgleichungen ergeben sich aus den Differenzen dieser Werte mit den Werten der benachbarten Gitterpunkte unter Berücksichtigung der Gitterkonstanten [42, 112]. Das daraus berechnete Potential des Reaktionsfelds, also der Teil des elektrostatischen Potentials, der durch die im Lösungsmittel induzierte Ladungsverteilung verursacht wird, ist stark von der Wahl des Gitters abhängig. Eine schrittweise Fokussierung des Gitters [67] und ein kontinuierlicher Grenzübergang des Wertes der dielektrischen Permeabilität vom Inneren des Moleküls

## 7 Material und Methoden

zum Lösungsmittel verringern diesen Effekt [42, 112]. In der vorliegenden Arbeit findet die im Algorithmus DelPhi v.4 [83, 67] implementierte FDPB-Methode Anwendung. Die elektrostatische freie Energie wird über die *energy partitioning method* berechnet [144], bei der die Bindungspartner jeweils einzeln und kombiniert, mit und ohne Salz, berechnet werden.

$$\Delta G_{binding}(EP) = \Delta G^{coul} + \Delta\Delta G^{rxn} + \Delta\Delta G^{ions}$$

Wobei sich die einzelnen Terme wie folgt zusammensetzen:

$$\Delta G^{coul} = \Delta G_{AB}^{coul} + \Delta G_A^{coul} + \Delta G_B^{coul}$$

Die Coulombenergie wird vom Programm über das Coulombsche Gesetz berechnet. Sie ist als die Energie definiert, die benötigt wird, um Ladungen von unendlicher Distanz in ihre Ruheposition innerhalb des für das Molekül spezifizierten Dielektrikums zu transferieren.

$$\Delta\Delta G^{rxn} = \Delta G_{AB}^{rxn} + \Delta G_A^{rxn} + \Delta G_B^{rxn}$$

Die Energie des Reaktionsfelds (üblicherweise Solvatationsenergie genannt) wird über das Produkt des Potentials aufgrund induzierter Oberflächen Ladungen und aller unbeweglichen Ladungen des gelösten Moleküls ermittelt. Die induzierten Ladungen an der Oberfläche werden an jedem Punkt der Grenze zwischen beiden Dielektrizitäten berechnet, üblicherweise an der Oberfläche des Moleküls.

$$\Delta\Delta G^{ion} = \Delta G_{AB}^{ion} + \Delta G_A^{ions} + \Delta G_B^{ions}$$

Der Anteil der Ionen zur elektrostatischen Energie des Systems besteht aus zwei Komponenten: der Interaktionsenergie zwischen festen Ladungen und überschüssigen Ionen und dem *screening* von paarweisen Interaktionsenergien aufgrund von beweglichen Ionen.

Die verwendeten Ladungen der Atome wurden vom Amber-Kraftfeld übernommen, zusätzlich wurden für Glykosylierungen die Ladungen der Glycam\_04g-Parameter [208] als auch die Ladungen der selbst parametrisierten Moleküle einbezogen. Die Atomradien wurden den *parse*-Dateien entnommen [169].

### 7.1.6 Bestimmung der $pK_a$ -Werte

Zur Berechnung der  $pK_a$ -Werte der protonierbaren Aminosäuren des Modells der Struktur 1JPZ bei pH 7 und der Titrationskurve wurde das Programm MCCE 2.2 verwendet [11, 63]. Es werden die Bewegungen der Seitenketten des Proteins mittels eines Monte Carlo-*sampling* berücksichtigt, während der dielektrische Effekt des Wasser und des Proteins über Kontinuums-Elektrostatik miteinbezogen wird. Das Programm führt den Prozess in vier Stufen aus:

- Formatierung der PDB-Datei. Hierfür mussten die Atomnamen des Häm in der modellierten Struktur angepasst werden.
- Erzeugung von Rotameren. Die Standardparameter der Vorlage run.prm.full wurden verwendet.
- Berechnung des *energy lookup table*. Hierbei wird über das Poisson-Boltzmann-*solver*-Programm Delphi v.4 [83, 67] die Energie des Reaktionsfelds und die elektrostatischen paarweisen Interaktionen berechnet.
- Simulation einer pH-Titration. Ein Monte Carlo-*sampling* wird durchgeführt. Dafür werden *annealing*-, reduzierende und Equilibrierungsschritte durchgeführt. Danach werden die Statistiken über die Belegung der Konformere bei einer Equilibrierung erstellt.

### 7.1.7 Überlagerung der PDB-Strukturen von Lysozym

Die Überlagerungen der Strukturen von Lysozym wurde mittels des McLachlan-Algorithmus [115], welcher im Programm ProFit implementiert ist, durchgeführt [6]. Es wurden 252 verschiedene Strukturen aus der ExPDB-Datenbank [165] mit der der Struktur 132L verglichen. Zusätzlich wurde die Orientierung des C-Terminus über den Torsionswinkel der  $C_\alpha$ -Atome der endständigen Aminosäuren Gly126, Cys127, Arg128 und Leu129 über ein automatisiertes Skript bei 224 korrekt nummerierten Einträgen verglichen. Bei den übrigen Einträgen wurden die Strukturen, bei welchen das C-terminale Leucin vorhanden ist sowie die Struktur 1XEJ visuell verglichen.

### 7.1.8 Bestimmung der bevorzugten Orientierung von Lysozym über einer negativ geladenen Fläche

Für die Orientierungsbestimmung von Lysozym wurden zunächst zwei Strukturen aus der PDB-Datenbank [19] ausgewählt. Das erste Konformer der NMR-Struktur 1E8L [163] (im

weiteren Verlauf als Struktur I bezeichnet) und die Kristallstruktur 132L [206] mit einer Auflösung von 1.80 Å (im weiteren Verlauf als Struktur II bezeichnet). Alle enthaltenen Wasser beider Strukturen und Methylgruppen der Struktur II wurden entfernt.

Eine negativ geladene Fläche wurde mittels 121 geladenen Kugeln (mit jeweils einem Radius von 1.7 Å, Ladung -1) erzeugt. Durch den Abstand der Kugeln von 7 Å entstand eine 11x11 Kugeln große, planare Fläche, deren Seitenlänge von 77 Å den maximalen Durchmesser von Lysozym (ca. 50 Å) um ca. 27 Å überragte. Das Protein wurde in verschiedenen Ausrichtungen und Distanzen über der Fläche platziert (Abbildung 7.1). Dafür wurde zunächst um die horizontale Achse, parallel zur planaren Fläche der Ligandenebene, der Winkel  $\Psi$  um jeweils 15° rotiert. Im Anschluss wurde um die vertikale Achse, orthogonal zur Ligandenebene, um 15° rotiert und danach wiederum die Prozedur der Rotation um die horizontale Achse wiederholt. Der gesamte Vorgang wurde durchgeführt, bis die Rotation um die vertikale Achse einen Winkel von 345° erreicht hat. Für jede Ausrichtung des Proteins über der Fläche wurde eine PDB-Datei erzeugt, was einem Satz von 312 Orientierungen des Proteins über der Oberfläche entspricht. Das Rotationszentrum wurde hierbei vom Massenmittelpunkt gebildet und die Distanz  $d$  der Oberfläche zum nächsten Atom des Proteins auf einen einheitlichen Wert, welcher für einen Satz vorher festgelegt wurde, gesetzt.

Um die Auswirkungen bei variierender Distanz zu untersuchen, wurde für die Entfernungen von 1, 5, 10, 15 und 20 Å von Protein zur Oberfläche jeweils ein Satz erstellt. Dieses wurde sowohl für Struktur I, als auch für die Struktur II durchgeführt, wobei für die Vergleichbarkeit die Ausgangsstruktur II zu Beginn mit den Koordinaten der Ausgangsstruktur I überlagert wurde. Die Prozedur wurde mithilfe eines selbst erstellten Python *scripts* und der Software Pymol [46] durchgeführt.

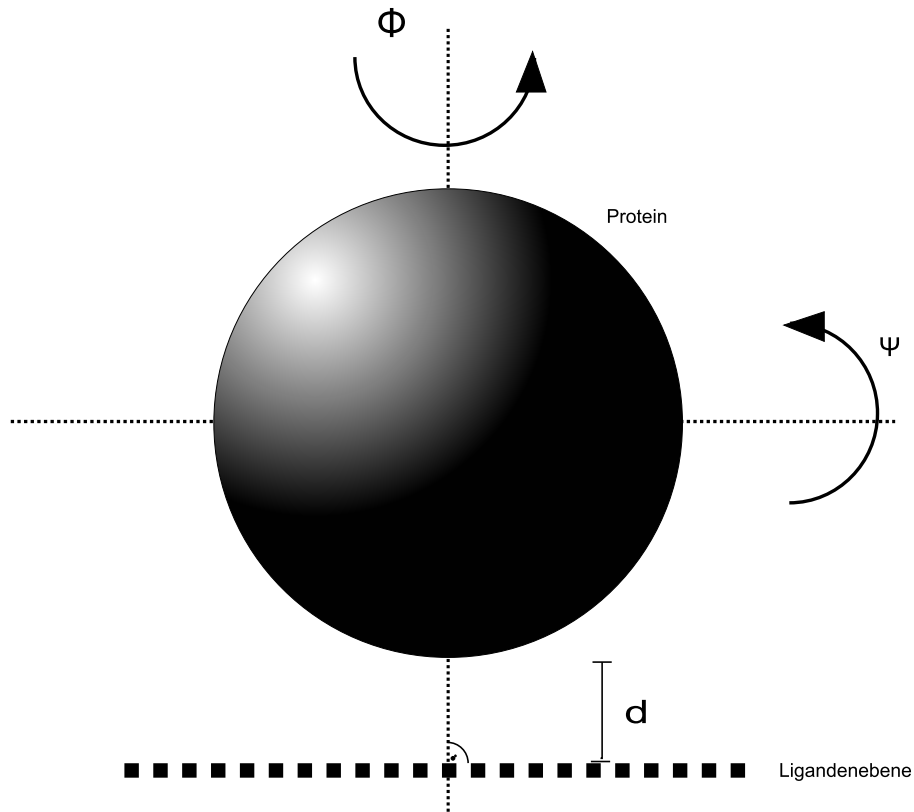


Abbildung 7.1: Erzeugung der analysierten Orientierungen. Das Protein wurde zunächst schrittweise um die Achse  $\Psi$  parallel zur Ligandenebene gedreht. Danach wurde eine Schrittweite um die Achse  $\Phi$  gedreht und der Prozess wiederholt, bis die Oberfläche komplett gescannt war. Für jeden Schritt wurde die Distanz  $d$  des Proteins auf einen einheitlichen Wert gesetzt.

Für jede Orientierung des Proteins zur Oberfläche wurde die elektrostatische Bindungsenergie mittels der *energy partitioning method* berechnet [144]. Hierfür wurden jeweils einmal das Protein und die Oberfläche separat sowie die Kombination beider in den 312 verschiedenen Ausrichtungen des Proteins über der Oberfläche bei einer Salzkonzentration von 0.0 M und 0.1 M mittels des Programmes DelPhi [144] berechnet. Die Dielektrizitätskonstante des Proteins wurde auf 6 gesetzt, da die Reorganisationen des Proteins bei der Bindung in diesem Modellansatz nicht explizit berücksichtigt wurden [66]. Das Gitter hatte eine Seitenlänge von 175 Punkten und damit einem Abstand der Gridpunkte von 0.48 Å. Es hat sich gezeigt, dass die Iterationszahl von 14000 Schritten für die Konvergenz der linearen Berechnung ausreicht.

te und die Änderung der potenziellen Energie nur noch geringfügig war ( $max\_change\_pot < 0.0001$  kT/e).

### 7.1.9 Bestimmung der bevorzugten Orientierung der Cytochrom P450-BM3-Häm-domäne über einer positiv geladenen Fläche

Für die Orientierungsbestimmung der bevorzugten Bindung der Cytochrom P450-BM3-Häm-domäne wurde die simulierte Struktur des erstellten Modells mit *linker* verwendet, da diese Sequenz mit dem experimentell verwendeten Protein übereinstimmt. Wie bei der Orientierungsbestimmung für Lysozym wurde auch für die Cytochrom P450-BM3-Häm-domäne die gleiche Methode durchgeführt. Allerdings wurde eine Anionenaustauscheroberfläche von 31x31 Sphären (jeweils Radius 1.7 Å, Ladung +1) erzeugt, die den maximalen Durchmesser des Proteins (ca. 70 Å) um ca. 147 Å überragt. Es wurde ein Satz von 312 Strukturen mit einer Distanz von 1 Å zur Ligandenoberfläche erzeugt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte entsprechend der Bestimmung der bevorzugten Orientierung von Lysozym mit veränderten Parametern für die elektrostatischen Berechnungen. Die Seitenlänge des *grids* betrug 325 Punkte bei einem Abstand der Gridpunkte von 0.67 Å. Die Iterationszahl von 21000 Schritten reichte zur Konvergenz der linearen Berechnung aus ( $max\_change\_pot < 0.0001$  kT/e).

### 7.1.10 Bestimmung der bevorzugten Orientierung von Antikörpern über einer negativ geladenen Fläche

Für die Orientierungsbestimmung der bevorzugten Bindung der Antikörper wurden die erstellten Modelle Mab01 und Mab02 mit Glykosylierungen verwendet. Die negativ geladene Fläche wurden von 31x31 Sphären (jeweils Radius 1.7 Å, Ladung -1) dargestellt, welche den maximalen Durchmesser der Antikörper (ca. 162 Å) um ca. 56 Å überragen. Es wurde ein Satz mit einer Distanz von 1 Å zur Ligandenoberfläche für jedes Modell erzeugt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte entsprechend der Bestimmung der bevorzugten Orientierung von Lysozym mit den Parametern zur Bestimmung der Orientierung der Cytochrom P450-BM3-Häm-domäne über einer positiv geladenen Fläche.

### 7.1.11 Molekulardynamische Simulationen

Molekulardynamische Simulationen (MD-Simulationen) sind eine Form der Computersimulation, bei der Atome und Moleküle während einer bestimmten Zeit und unter bestimmten physikalischen Bedingungen miteinander interagieren. Der Hauptanwendungsbereich liegt

heutzutage innerhalb der Materialwissenschaften und bei biologischen Molekülen. Ein Eindruck über die Bewegung der Atome wird vermittelt und es können Erkenntnisse über die komplexen und dynamischen Vorgänge über Prozesse bei biologischen Systemen gewonnen werden. Detaillierte Aussagen über die Struktur, Dynamik und Thermodynamik biologischer Moleküle und deren Wechselwirkungen mit anderen Molekülen können getroffen werden. Bei MD-Simulationen werden die Moleküle vereinfacht gesehen als ein Netzwerk von untereinander, über Federn verbundenen Kugeln betrachtet. Die Federn sind hierbei mit einer Kraftkonstante versehen und die Kugeln, welche die Atome repräsentieren, tragen eine Punktladung. Der Radius der Kugeln entspricht dabei dem Van-der-Waals-Radius des entsprechenden Atoms. Somit lassen sich gebundene und nicht gebundene Wechselwirkungen zwischen den Kugeln beschreiben, was im Allgemeinen unter dem Begriff „Kraftfeld“ zusammengefasst wird. Die aufgenommenen Positionen und Geschwindigkeiten der einzelnen Atome über einen bestimmten Simulationszeitraum bezeichnet man als Trajektorie. Sie wird durch numerische Integration der Newton-Bewegungsgleichung erhalten.

#### **7.1.11.1 Kraftfelder**

Unterschiedliche Kraftfelder stehen für MD-Simulationen verschiedener Systeme zur Verfügung. Sie berücksichtigen alle die Energie der bindenden und nicht bindenden Wechselwirkungen zwischen den Atomen. Es werden hierbei die bindenden Wechselwirkungen aus den Bindungslängen zwischen zwei Atomen, dem Bindungswinkel zwischen drei Atomen und dem Torsionswinkel zwischen zwei Ebenen, den vier Atome bilden, zusammengefasst. Die nichtbindenden Wechselwirkungen setzen sich aus der Van-der-Waals-Wechselwirkung, welche durch das Lennard-Jones-Potenzial beschrieben wird und den elektrostatischen Kräften, denen das Coulomb-Potenzial zugrunde liegt, zusammen. Die potenzielle Energie des Systems ergibt sich aus der Summe der Einzelgleichungen des jeweiligen Kraftfelds.

## 7 Material und Methoden

$$\begin{aligned}
 E_b &= \frac{1}{2}K_b(b - b_0)^2 && \text{Bindungslänge} \\
 E_\theta &= \frac{1}{2}K_\theta(\theta - \theta_{eq})^2 && \text{Bindungswinkel} \\
 E_\phi &= \sum_{\substack{\text{dihedrals} \\ \text{atoms}}} K_\phi^i(1 + \cos[n_i\phi - \gamma_i]) && \text{Torsionswinkel} \\
 E_{VDW} &= \sum_{i < j}^{\text{atoms}} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} && \text{Van-der-Waals} \\
 E_{el} &= \sum_{i < j}^{\text{atoms}} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} && \text{Coulomb}
 \end{aligned}$$

Tabelle 7.2: Bindende und nichtbindende Wechselwirkungen, die auf ein Molekül wirken.

Bindungslänge  $r$  zwischen den Atomen A, B; Bindungswinkel  $\theta$  zwischen den Atomen A, B, C, D; Torsionswinkel  $\phi$  zwischen den Atomen A, B, C und B, C, D; Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen den Atomen  $i, j$ ; Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den Atomen  $i, j$ ;  $n$  = Anzahl der auftretenden Minima,  $\gamma$  = Phasenverschiebung;  $K, A$  und  $B$  = Konstanten;  $q$  = Ladung eines Atoms,  $\epsilon$  = Dielektrizitätskonstante.

$$E_{pot} = \sum E_b + E_\theta + E_\phi + E_{VDW} + E_{el}$$

Gängige Kraftfelder als Grundlage molekulardynamischer Simulationen sind GROMOS [192], Amber [38, 198], CHARMM [26] und Tripos [36]. Sie unterscheiden sich in Zahl und Parametrisierung der Atomtypen und Kraftfeldgleichungen.

Molekulardynamische Simulationen und Energieminimierungen im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich unter Verwendung der Standardeinstellungen mit dem Kraftfeld parm99 des AMBER-Programmpakets [38] durchgeführt, welches sich für Proteine und Nukleinsäuren gut eignet. Zusätzlich wurden externe Amber-Parameter der Häm-Gruppe [65] für die Simulationen der Cytochrom P450-BM3-Häm-Gruppe, sowie für die Zucker [208] im Glykosylierungsmuster der MD-Simulationen mit Antikörpern verwendet. Die Parameter für unterschiedliche Liganden der hydrophoben Interaktionschromatografie und der Ionenaustauschchromatografie im Verlauf dieser Arbeit wurden selbst bestimmt.

Die nicht periodischen Simulationen wurden in impliziter, wässriger Umgebung durchgeführt. Diese wurden repräsentiert durch das *generalized Born*-Oberflächenmodell [81, 82]. Es wurden hierbei zwei zusätzliche Terme zur *vacuum*-Potenzialfunktion hinzugefügt.

$$+ \sum_{ij}^{\text{atoms}} \frac{q_i q_j}{f^{gb}(R_{ij})} + \sigma A$$



Der erste Term betrachtet den polaren Teil der Solvatationsenergie durch die Funktion  $f^{gb}$ , um eine Annäherung an das Potenzial des Reaktionsfelds bereitzustellen. Der zweite Term repräsentiert den unpolaren Anteil der Solvatationsenergie, welcher als proportional zur Oberfläche des Moleküls A angenommen wird.

### 7.1.11.2 Integration der Newton-Bewegungsgleichung

Um eine Trajektorie zu erhalten, wird die Lösung der Newton-Bewegungsgleichung benötigt, die alle Partikel erfüllen müssen.

$$F = ma$$

Die Gleichung für ein Partikel ist über die potenzielle Energie an alle anderen Gleichungen gekoppelt.

$$m \frac{d^2 r_i}{dt^2} = - \frac{dE_{pot}}{dr_i}$$

Mithilfe der Atommassen und der aus den Kraftfeldgleichungen bekannten, potenziellen Energie ist es nun möglich, die Position und Geschwindigkeit für jedes Atom über eine Reihe diskreter Zeitintervalle zu bestimmen. Die Zeitintervalle müssen dabei so eng gewählt werden, dass auch die Bewegungen mit der höchsten Frequenz abgebildet werden. Diese stellen in biologischen Systemen die Streckschwingungen der an Kohlenstoff oder Sauerstoff gebundenen Wasserstoffe dar.

### 7.1.11.3 Berechnung von MM-GBSA-Bindungsenergien

Die MM-GBSA-Methode kombiniert die molekularmechanischen Energien mit einem Kontinuum-Solvent-Ansatz. Die Energien der Bindungspartner werden jeweils frei und kombiniert berechnet und die Differenz ermittelt.

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_{Kombination} + \Delta G_{Ligand} + \Delta G_{Rezeptor}$$

Die molekularmechanischen Energien ( $\Delta G_{gas}$ ) repräsentieren die Summe der internen Energien (Bindung, Winkel und Torsion), der Van-der-Waals- und der elektrostatischen Interaktionen.

$$\Delta G_{gas} = \Delta G_{ele} + \Delta G_{vdw} + \Delta G_{int}$$

Zur Berechnung des elektrostatischen Anteils der freien Solvatationsenergie ( $\Delta G_{GB}$ ) wird die *generalized Born*-Methode (GB) verwendet. Zu diesem wird der hydrophobe Anteil der freien Solvatationsenergie addiert.

$$\Delta G_{GBsol} = \Delta G_{GBsur} + \Delta G_{GB}$$

Hieraus lässt sich nun die Gesamtenergie berechnen.

$$\Delta G_{GBtot} = \Delta G_{GBsol} + \Delta G_{gas}$$

## 7.1.12 Parametrisierung der Liganden

### 7.1.12.1 Erstellung der Strukturen und Geometrieoptimierung

Die Struktur der Liganden wurde mit Arguslab [186] aufgebaut und zunächst einer einfachen semi-empirischen Geometrieoptimierung unter Verwendung der PM3-Methode unterzogen. Danach folgte eine Geometrieoptimierung mittels *ab initio*-Verfahren unter Gaussian 98 [60] nach dem Berny-Algorithmus, der auf einem früheren Programm von Schlegel [162] beruht und redundante interne Koordinaten zur Minimierung benutzt [131]. Die Berechnungen wurden mittels der Hartree-Fock-Methode und dem Polarisationsbasissatz 6-31G(d) [51] durchgeführt.

### 7.1.12.2 Ladungsberechnung

Das elektrostatische Potenzial (ESP) wurde im Anschluss ebenfalls mit *ab initio*-Verfahren unter dem Basissatz 6-31G(d) in Gaussian 98 berechnet. Aus dem erhaltenen, quantenmechanisch berechneten Potenzial der Moleküloberfläche wurde mittels des dem AMBER-Paket [29] beigefügten Programms RESP (*restrained electrostatic potential*) die atomzentrierten Punktladungen berechnet [17, 39]. Hierbei wird jedem Atom eine Ladung zugeordnet, sodass das quantenmechanisch berechnete Potenzial des Moleküls wiedergegeben wird.

Parameter für Bindungslängen und -winkel des Liganden SuperQ, welche nicht im verwendeten Kraftfeld vorkommen, wurden aus ähnlichen, bereits im Kraftfeld vorkommenden Parametern abgeschätzt.

BINDUNG	$k_l$ [KCAL/MOLÅ]	$l_0$ [Å]
S - O2	525.0	1.480
WINKEL	$k_l$ [KCAL/MOLÅ]	$l_0$ [Å]
O2 - S - O2	140.0	119.90
CT - S - O2	45.0	102.60

Tabelle 7.3: Parameter für Bindungslängen und -winkel des Liganden SuperQ

## 7 Material und Methoden

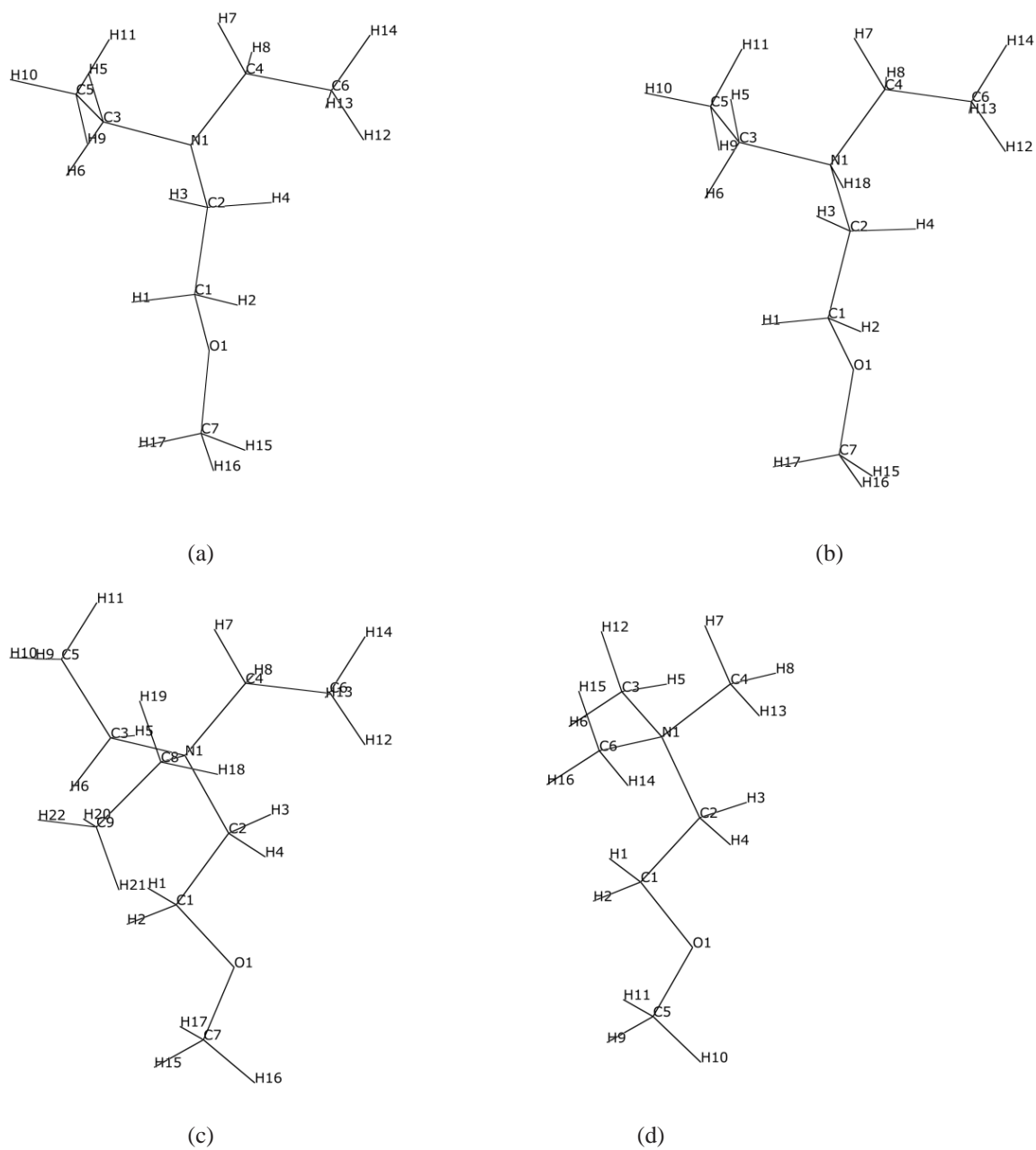


Abbildung 7.2: Strukturen der Anionenaustauscherliganden, für welche das quantenmechanische Potenzial berechnet wurde. (a) DEAE, (b) DEAEH, (c) QAE, (d) SuperQ.

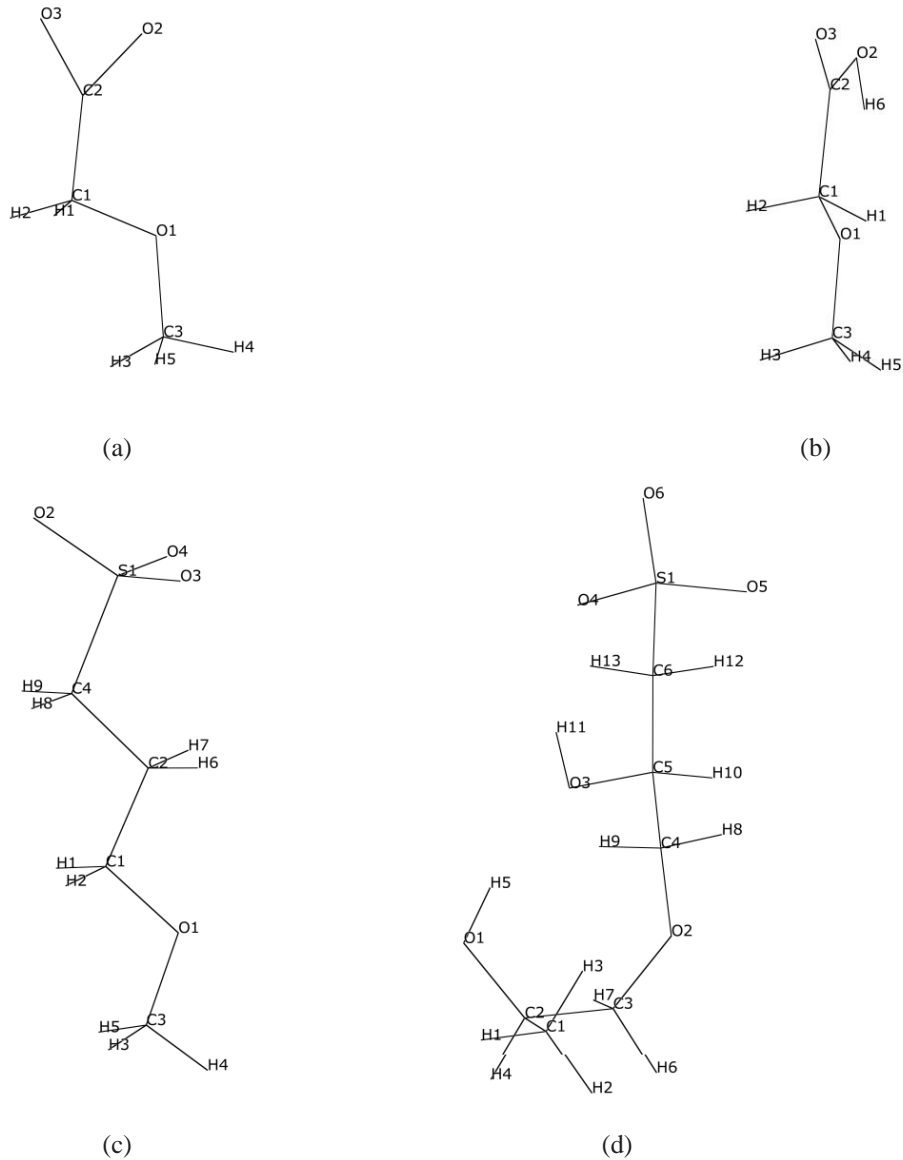


Abbildung 7.3: Strukturen der Kationenaustauscherliganden, für welche das quantenmechanische Potenzial berechnet wurde. (a) CM-650, (b) CM-650H, (c) SP-650, (d) Source 15S.

### **7.1.13 MD-Simulationen**

#### **7.1.13.1 MD-Simulationen von Lysozym mit Kationenaustauscher Source 15S**

Wie bei der Bestimmung der bevorzugten Orientierung von Lysozym wurden auch für die MD-Simulationen zunächst zwei Strukturen aus der PDB-Datenbank ausgewählt. Die Kristallstruktur 132L [153] mit einer Auflösung von 1.80 Å und das erste Konformer der NMR-Struktur 1E8L [163]. Für die MD-Simulationen mit der Struktur 132L wurden die methylierten Lysine durch unmethylierte ersetzt. Eine planare Fläche, welche die Oberfläche des Kationenaustauschers repräsentiert, wurde aus 11x11 parametrisierten und minimierten Liganden (siehe 7.1.12) des Materials SuperQ erzeugt. Der Abstand der Liganden wurde auf 7 Å festgelegt und das Protein in einem Abstand von 25 Å über der Fläche platziert. Der Abstand wurde von D.Q. Lin als durchschnittlicher Abstand von Ionenaustauscherliganden im Rahmen des „Programms des Projektbezogenen Personenaustauschs (PPP)“ bestimmt. Es wurden 14 verschiedene Ausgangsorientierungen des Proteins erzeugt, wobei die gleiche Vorgehensweise wie unter 7.1.8 verwendet wurde. Allerdings wurde der Winkel, um den hierfür schrittweise gedreht wurde, auf 45° erhöht.

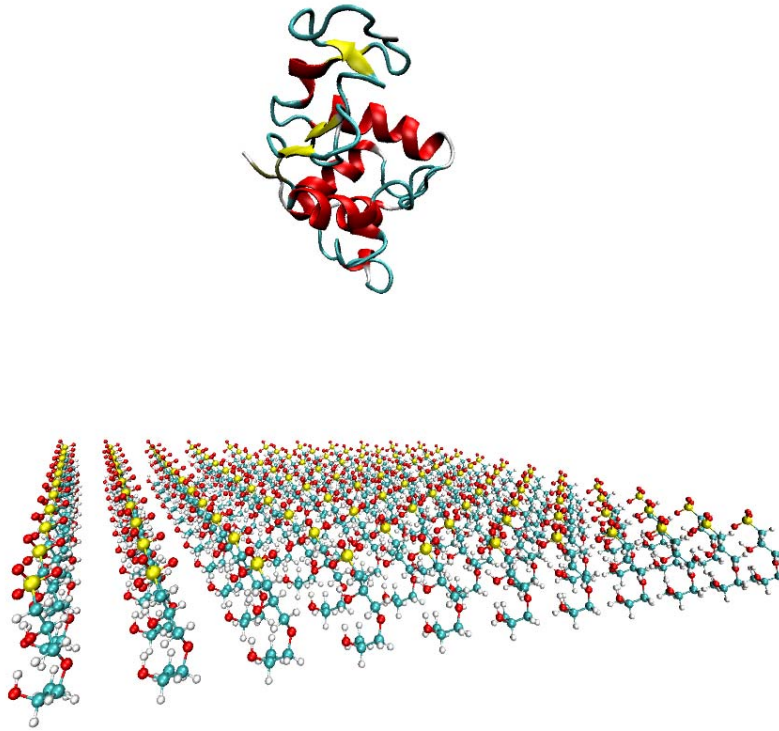


Abbildung 7.4: Ausgangsorientierung für die MD-Simulation (a) der Struktur 1E8L (*cartoon*-Darstellung:  $\alpha$ -Helices in Rot,  $\beta$ -Faltblattstrukturen in Gelb) über eine Fläche aus 11x11 Source 15S Liganden (Kalottenmodelle).

Die Simulationen wurden in implizitem Wasser unter Anwendung des *generalized Born*-Lösungsmittel-Modells [81, 82] durchgeführt und erfolgten daher in einem nicht periodischen System. Nach der Minimierung wurden die Atome des *backbone* des Proteins mit einer *restraint*-Kraft von 5 kcal/Mol und die Atome C2 und C3 der Liganden mit 10 kcal/Mol über einen Zeitraum von 10 ps festgehalten. Währenddessen erfolgte die Aufheizphase von 0 K auf 300 K. Der *cutoff* für langreichweitige Wechselwirkungen betrug hierbei 12 Å. Es wurde „SHAKE“ [152] zum Festhalten aller Bindungen, die Wasserstoffe beinhalten, und Zeitschritte von 2 fs verwendet. Danach erfolgte die Simulationsphase von 2 ps mit einer konstanten Temperatur von 300 K und einem *cutoff* von 100 Å. Das Protein wurde während dieser Phase nicht mehr festgehalten, ausschließlich die Atome C2 und C3 der Liganden wurden weiterhin mit *restraint*-Kräften behandelt.

Um zu überprüfen, ob die unterschiedlich gebundenen Orientierungen durch eine schrittweise

Verkürzung des Abstands vom Protein zu Oberfläche hin zu einer spezifischen Orientierung konvergieren, wurden für die Struktur 132L wurden zusätzliche MD-Simulationen durchgeführt. Die gebundene Struktur wurde in der Orientierung des letzten *frames* am Ende der MD-Simulationen erneut angehoben und ausgehend von dieser Position erneut simuliert. Der Abstand wurde dabei für jede neue Simulation schrittweise auf 20, 15, 10 und 5 Å verkürzt.

### 7.1.13.2 MD-Simulationen der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit *linker*

Da für den C-terminalen *linker*-Bereich keine *template*-Struktur zur Verfügung stand, wurde die modellierte Struktur der Kristallstruktur 1JPZ [74] einer MD-Simulation im impliziten Lösungsmittel unter Anwendung des *generalized Born*-Modells unterzogen. Die Minimierung zu Beginn wurde mit Standard Parametern durchgeführt, wobei nach 500 Schritten von *steepest descent*- auf *conjugate gradient*-Methode umgeschaltet wurde. Daran angeschlossen erfolgte eine Aufheizphase von 20 ps mit *backbone-restraint*-Kraft von 0.1 kJ/mol. Bei der anschließenden Simulation von 1 ns wurde der *cutoff* von 12 Å auf einen Wert von 100 Å gesetzt.

### 7.1.13.3 MD-Simulationen der Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne mit Anionenaustauschern DEAE, QAE und SuperQ

Die repräsentative Oberfläche der Anionenaustauscher wurde entsprechend der MD-Simulationen von Lysozym (siehe 7.1.13.1), jedoch mit einer Matrix von 21x21 Liganden, erzeugt. Der Abstand des Proteins zur Oberfläche zu Beginn der MD-Simulationen wurde auf 35 Å gesetzt und ein *cutoff* von 150 Å verwendet. Während der Simulation wurden jeweils die Atome O1, C7 (Liganden QAE, DEAE) und O1, C5 (Ligand SuperQ) mit *restraint*-Kräften behandelt.

## 7.1.14 Bestimmung der Orientierung des Proteins während des Bindungsvorgangs bei MD-Simulationen

Um die Orientierung des Proteins während der MD-Simulationen zu bestimmen und um diese auch mit den Ergebnissen der starren Vorgehensweise vergleichen zu können, wurden zunächst zwei *backbone*-Atome bestimmt. Das erste Atom bildet in der Ausgangsposition der starren Vorgehensweise einen möglichst kleinen Winkel  $\Psi$  mit dem Massenzentrum des Proteins und dem Normalenvektor der Oberfläche (Abbildung 7.5). Das zweite gewählte Atom sollte mit dem ersten Atom, dem Massenzentrum und dem Normalenvektor der Ebene einen möglichst kleinen Torsionswinkel  $\Phi$  ergeben und eine Distanz  $> 15$  Å vom ersten Atom aufweisen, da bei kleinen Distanzen die Bewegungen des flexiblen Proteins durch die sich ergebenden größeren Winkel einen größeren Einfluss haben würden. Die gewählten Atome wurden



zusätzlich auf Stabilität während der Simulationen überprüft ( $\text{RMSD} < 2$ ), um auch hier größere Ungenauigkeiten zu vermeiden. Die gewählten Atome waren der *backbone*-Sauerstoff der Aminosäure Ala90 und das  $C\alpha$ -Atom der Aminosäure Gly22 für die Untersuchungen mit Lysozym und die  $C\alpha$ -Atome der Aminosäuren Leu150 und Pro25 für die Cytochrom P450-BM3-Hämdomäne.

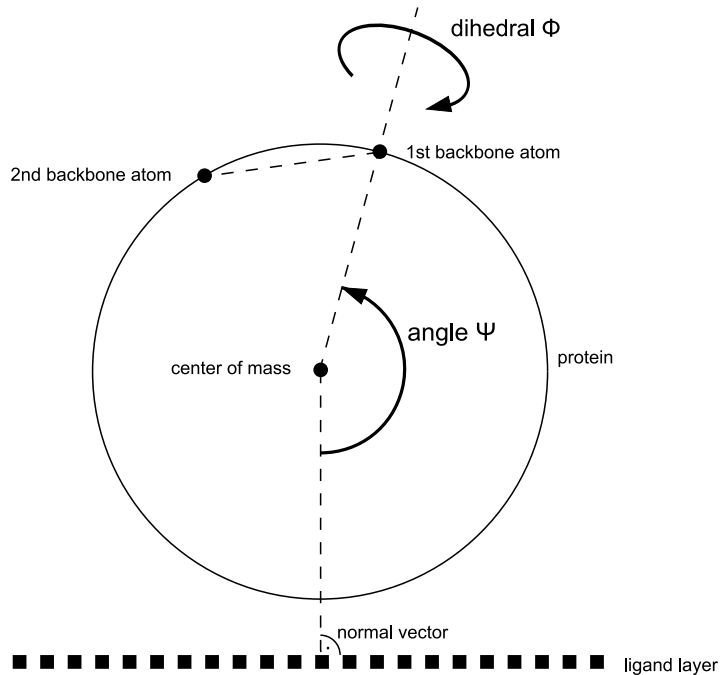


Abbildung 7.5: Schematische Darstellung der gewählten *backbone*-Atome und des darüber berechneten Winkels  $\Psi$  und Torsionswinkels  $\Phi$  in Bezug zur Adsorberoberfläche.

Mittels der gemessenen Winkel  $\Psi$  und  $\Phi$  war es möglich, die Orientierung des Proteins in Bezug zur Oberfläche während der MD-Simulationen zu bestimmen und diese direkt mit den Werten der starren Bestimmungsmethode zu vergleichen. Hierfür wurden die Winkel in der flächentreuen Mollweide-Projektion dargestellt [173]. Die Ausgangsorientierungen vor der schrittweisen Drehung des Proteins der starren Methode entsprach dabei dem Punkt  $(\Phi, \Psi) = (90^\circ, 0^\circ)$ .

Die Darstellung der Mollweide-Projektion wurde wie folgt berechnet:

$$x = \frac{2\sqrt{2}(\Phi - \Phi_0) \cos \theta}{\pi}$$

$$y = \sqrt{2} \sin \theta$$

wobei  $\theta$  gegeben ist über:

$$2\theta + \sin(2\theta) = \pi \sin \Psi$$

Da die Projektion ausschließlich zur visuellen Analyse diente, wurde  $\theta$  vereinfacht über [1]:

$$\theta = \frac{1}{2}\theta'$$

### 7.1.15 Bestimmung der Orientierung beim globalen Minimum, der Richtung des mittleren energiegewichteten Moments und der experimentellen Ausrichtung von Lysozym

Zur Bestimmung des globalen Minimums wurde die Orientierung bei niedrigster Bindungsenergie verwendet. Das mittlere energiegewichtete Moment  $\vec{O}$  wurde über das Produkt der Summe aus den  $i = 312$  Richtungsvektoren  $\vec{r}_i$  und der jeweiligen Bindungsenergie  $\Delta G_{binding}(EP)_i$  berechnet.

$$\vec{O} = \sum_{i=1}^{312} \vec{r}_i \Delta G_{binding}(EP)_i$$

In ähnlicher Weise wurde auch bei der Ermittlung der experimentellen Orientierung auf dem Kationenaustauscher Source 15S verfahren [50]. Der Richtungsvektor der  $C\alpha$ -Atome der gelabelten Lysine Lys1, Lys13, Lys33, Lys96, Lys97 und Lys116 vom Massenmittelpunkt des Proteins aus wurde mit der Labeleffizienz der gelabelten Fraktionen multipliziert und die entgegengesetzte Richtung des resultierenden Moments als gebundene Orientierung festgelegt. Doppelt gelabelte Fraktionen wurden dabei nicht berücksichtigt.

### 7.1.16 Berechnung des hydrophoben Interaktionsvolumens und der SAS

Zunächst wurde für die Berechnung des molekularen Interaktionsfelds das Programm GRID verwendet. Das Interaktionspotenzial eines Objektes (*probe*) mit einem Molekül (*target*) wurde auf den Punkten eines Gitters berechnet.

Es wurden Strukturen aus einer bestehenden Publikation [154] als *targets* verwendet. Aller-

dings wurden nur Strukturen verwendet, die ausschließlich proteinogene Einträge enthielten. Das molekulare Interaktionsfeld wurde jeweils mittels der *DRY-probe* bestimmt, um die hydrophoben Eigenschaften der Proteine zu ermitteln. Anschließend wurde dieses über die Ermittlung des hydrophoben Volumens bei einer Interaktionsenergie von  $-0.2$  kcal/mol mittels des Programms VOLSURF quantifiziert. Die Gesamtoberfläche wurde über das Programm DSSP ermittelt [92]. Der Quotient des hydrophoben Volumens und der ermittelten Gesamtoberfläche wurde anschließend mit den experimentellen Werten der Publikation verglichen. Zusätzlich wurde das hydrophobe Volumen der erstellten Antikörpermodelle, sowie den Proteinen Lysozym [197] und Chymotrypsinogen A [196] berechnet und mit selbst experimentell ermittelten Retentionszeiten verglichen.

## 7.2 Experimentelle Arbeiten

### 7.2.1 Verwendete Materialien und Geräte

Die chromatografischen Experimente wurden mittels eines Äkta-Purifier Systems durchgeführt (GE Healthcare). Es wurden die Säulen HiTrap Phenyl FF (LS), Butyl FF und Octyl FF mit einem Volumen von jeweils 1 ml verwendet. Die Flussrate wurde auf 1 ml/min eingestellt. Der Ladungspuffer bestand aus 10 mM Natriumacetatpuffer, 25 mM Natriumphosphatpuffer 0.5 M NaCl. Das Harz wurde vor dem Lauf jeweils mit dem 10-fachen Säulenvolumen des Ladungspuffers equilibriert. Es wurden die Proteine Chymotrypsinogen A und Lysozym (beide bezogen von Sigma-Aldrich, Taufkirchen), sowie die humanisierten monoklonalen Antikörper Mab01 und Mab02 (Reinheitsgrad  $> 99\%$ , zur Verfügung gestellt von Boehringer Ingelheim, Biberach) verwendet. Die Konzentrationen der Proteine wurde auf 2 g/l eingestellt. Zur Auswertung wurde die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.



## 8 Anhang

Bei farblicher Kennzeichnung der Simulationen wurde die gleiche Farbkennung bei allen Abbildungen verwendet, so entspricht beispielsweise die rote MD-Simulation unter Abbildung 8.2 der roten MD-Simulation unter Abbildung 8.11. Ferner entspricht sich auch die Farbkennung der Ausgangsorientierungen für Proteine der Simulationen mit 132L und 1E8L. Bei Bezeichnungen von Graphen mit Buchstaben korrespondieren diese mit folgenden Farben:

BUCHSTABE	FARBE
a	schwarz
b	rot
c	grün
d	blau
e	blaugrün
f	rosa
g	gelb
h	orange
i	hellgrün
j	dunkelgrün
k	hellblau
l	violett
m	violett hell
n	grau

Tabelle 8.1: Farbzuordnung der MD-Simulationen.

## 8.1 Abstand von Lysozym zur Ionenaustauscheroberfläche während der MD-Simulationen

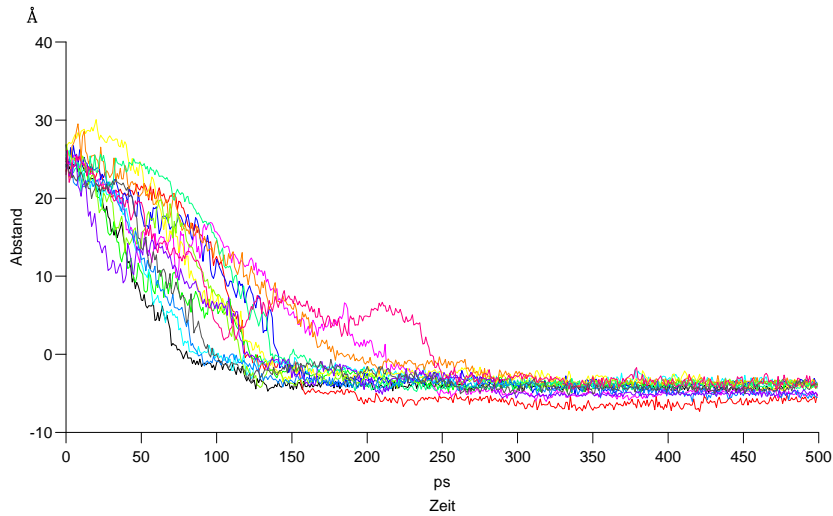


Abbildung 8.1: MD-Simulationen von Struktur I bei einer Startdistanz von 25 Å.

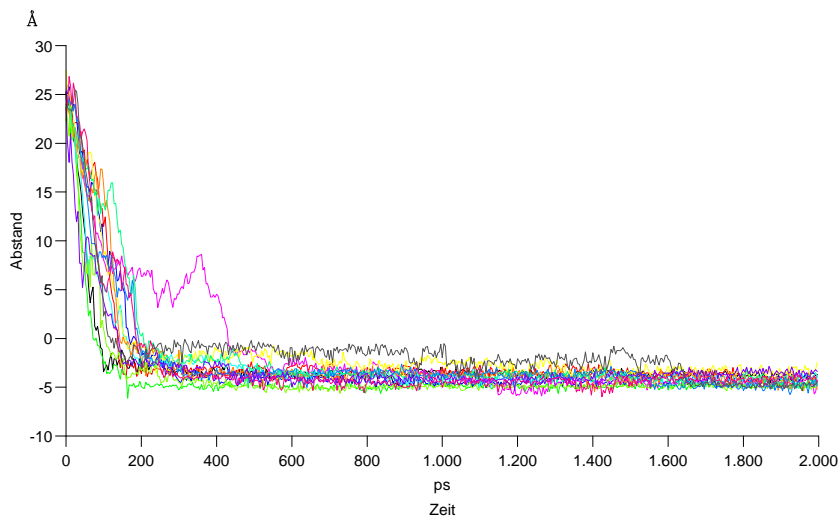


Abbildung 8.2: MD-Simulationen von Struktur II bei einer Startdistanz von 25 Å.

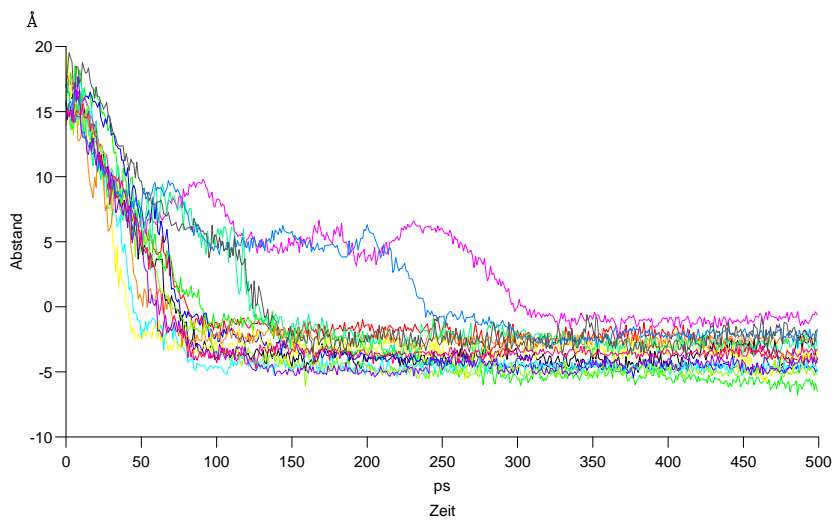


Abbildung 8.3: MD-Simulationen von Struktur II bei einer Startdistanz von 20 Å.

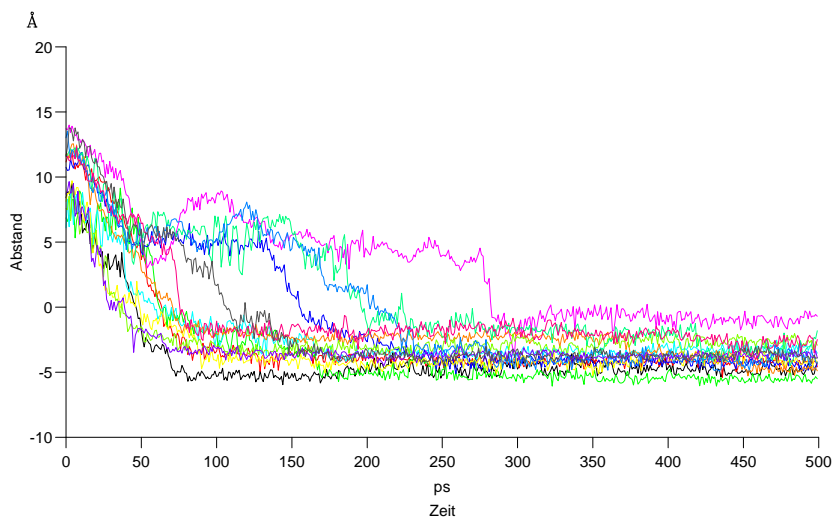


Abbildung 8.4: MD-Simulationen von Struktur II bei einer Startdistanz von 15 Å.

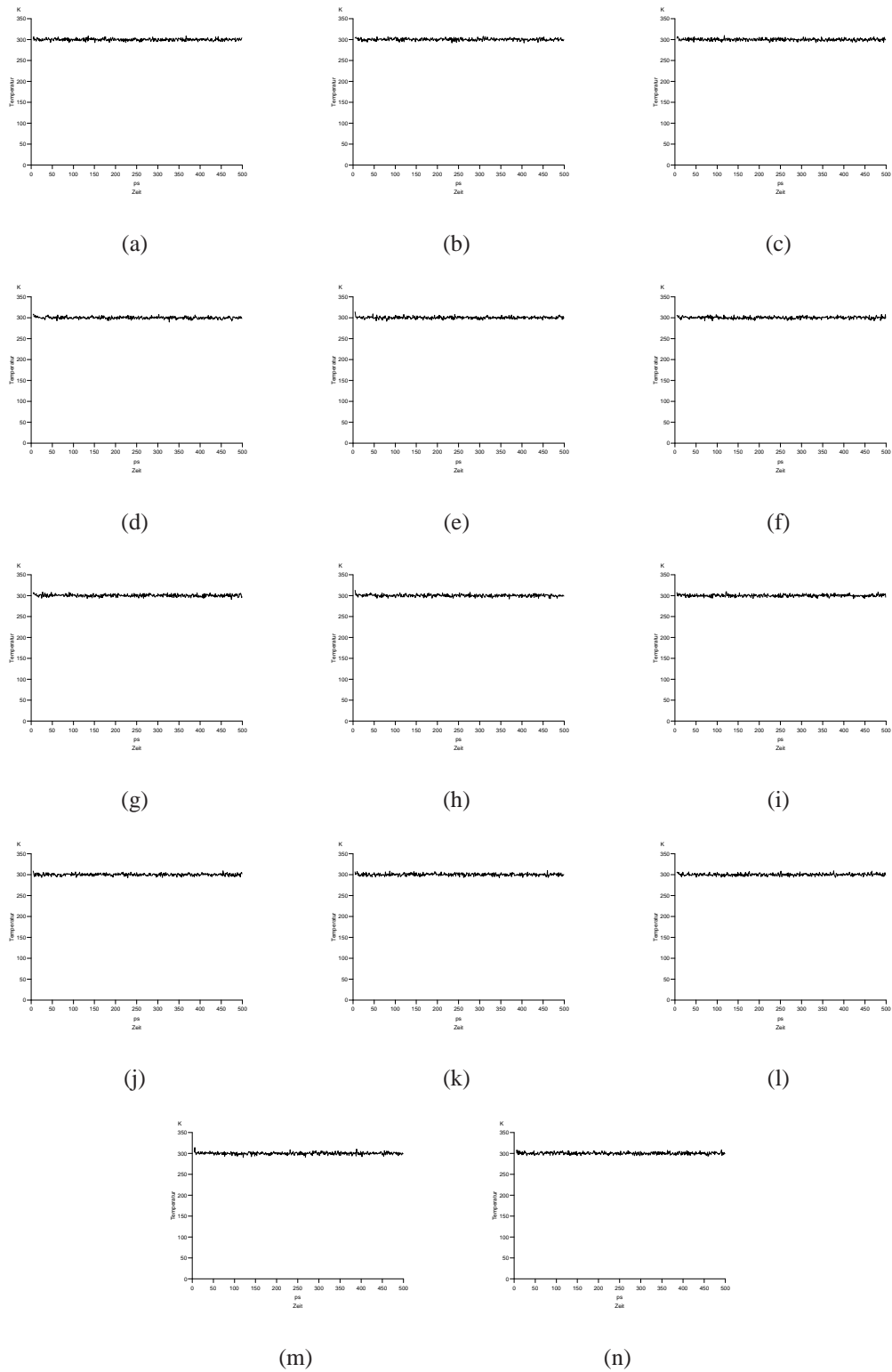


Abbildung 8.5: Temperatur der MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur I.



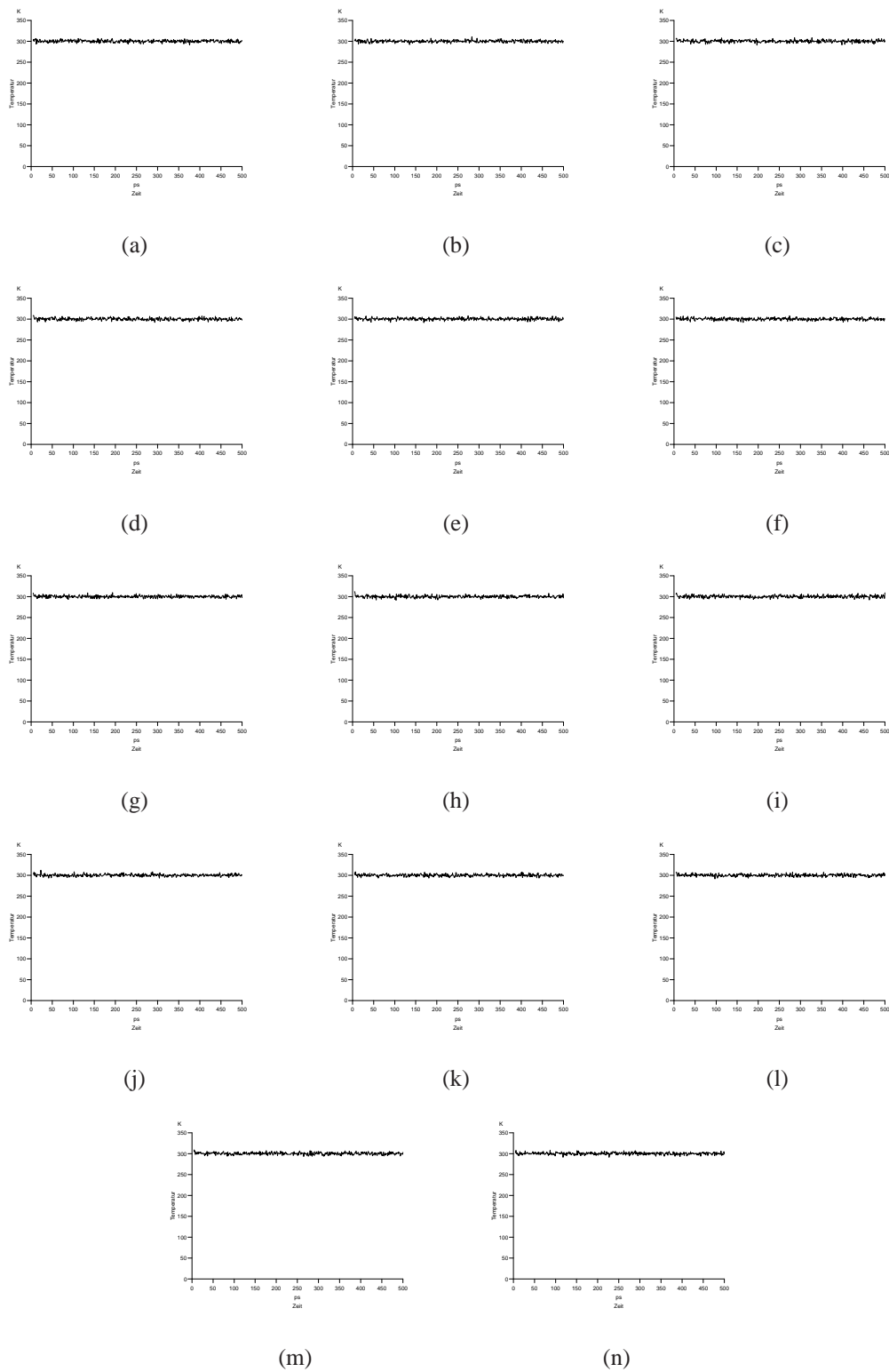


Abbildung 8.6: Temperatur der MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur II.

## 8 Anhang

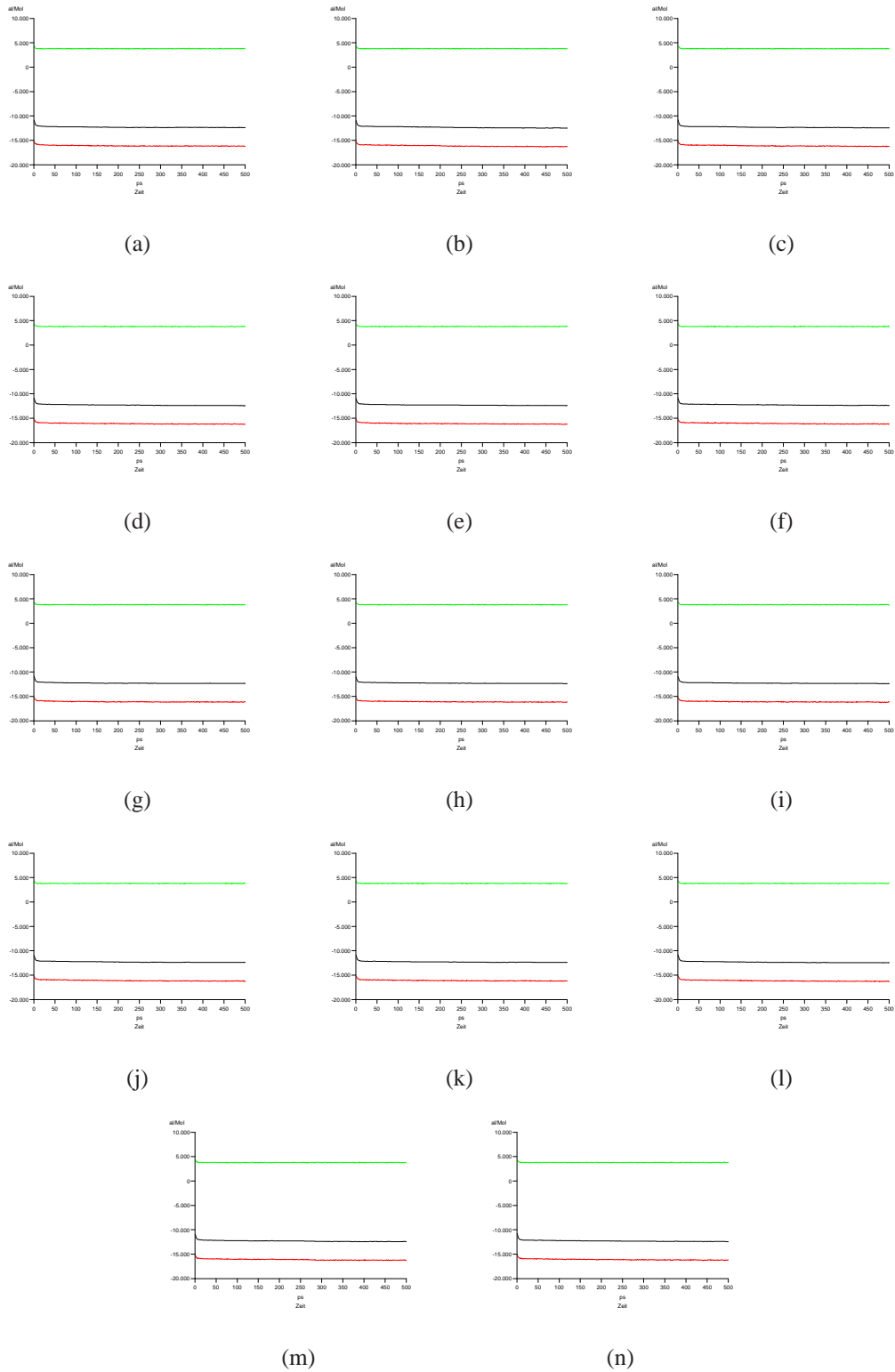


Abbildung 8.7: Energien der MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur I. Gesamtenergie (schwarz), potentielle Energie (rot) und kinetische Energie (grün).

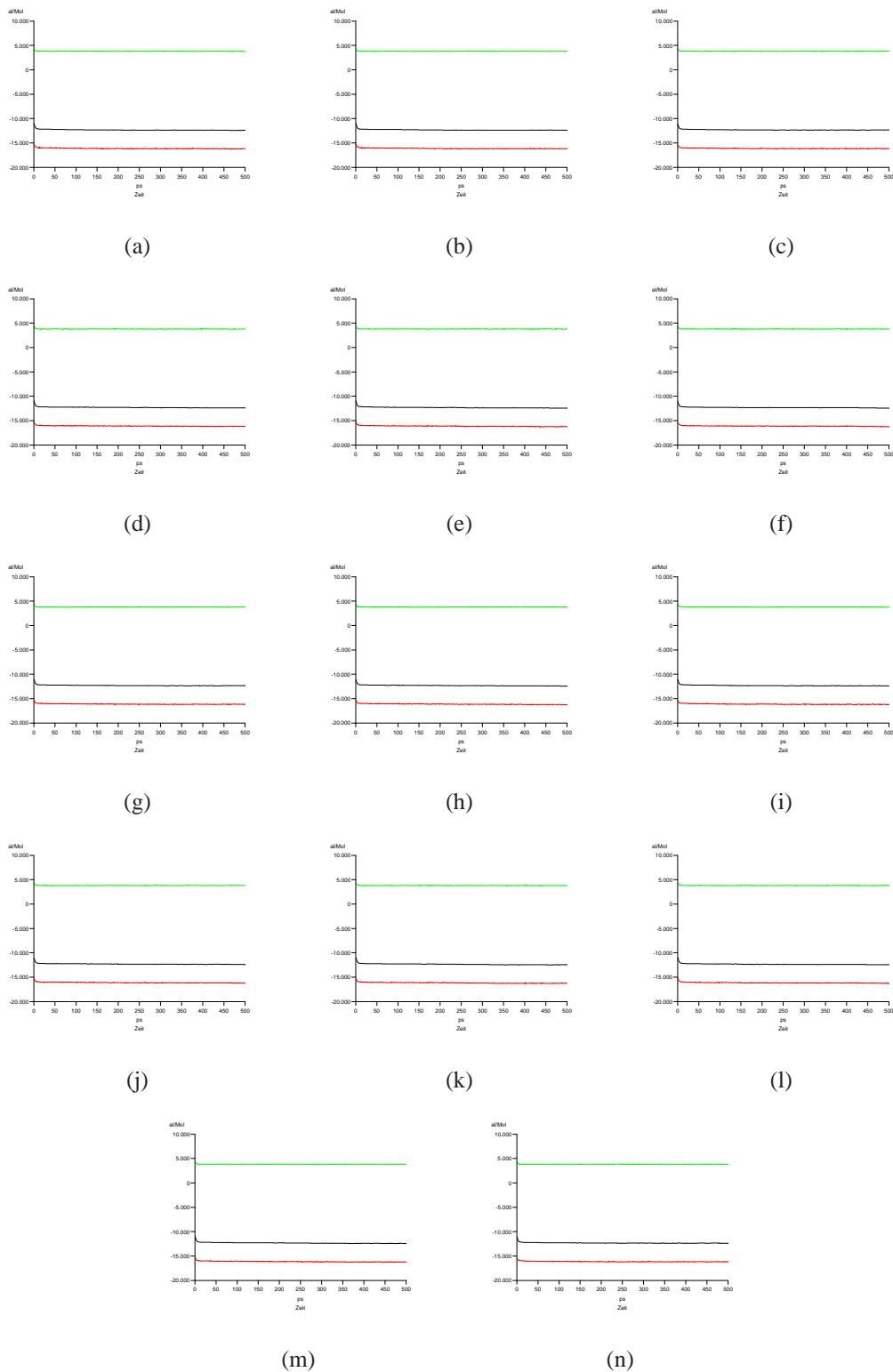


Abbildung 8.8: Energien der MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur II. Gesamtenergie (schwarz), potentielle Energie (rot) und kinetische Energie (grün).

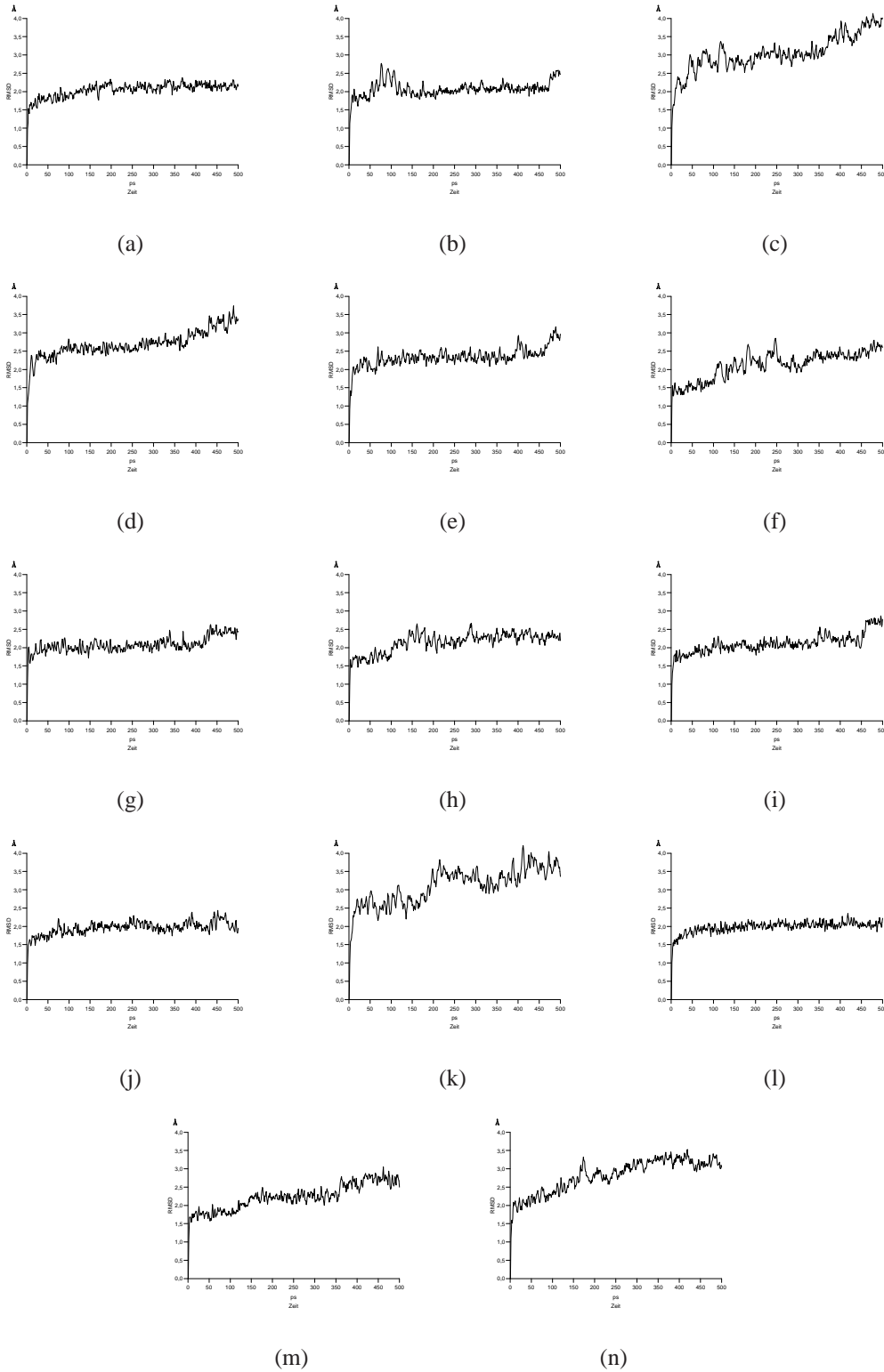


Abbildung 8.9: RMSD-Werte im Vergleich zur Startstruktur der MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur I.

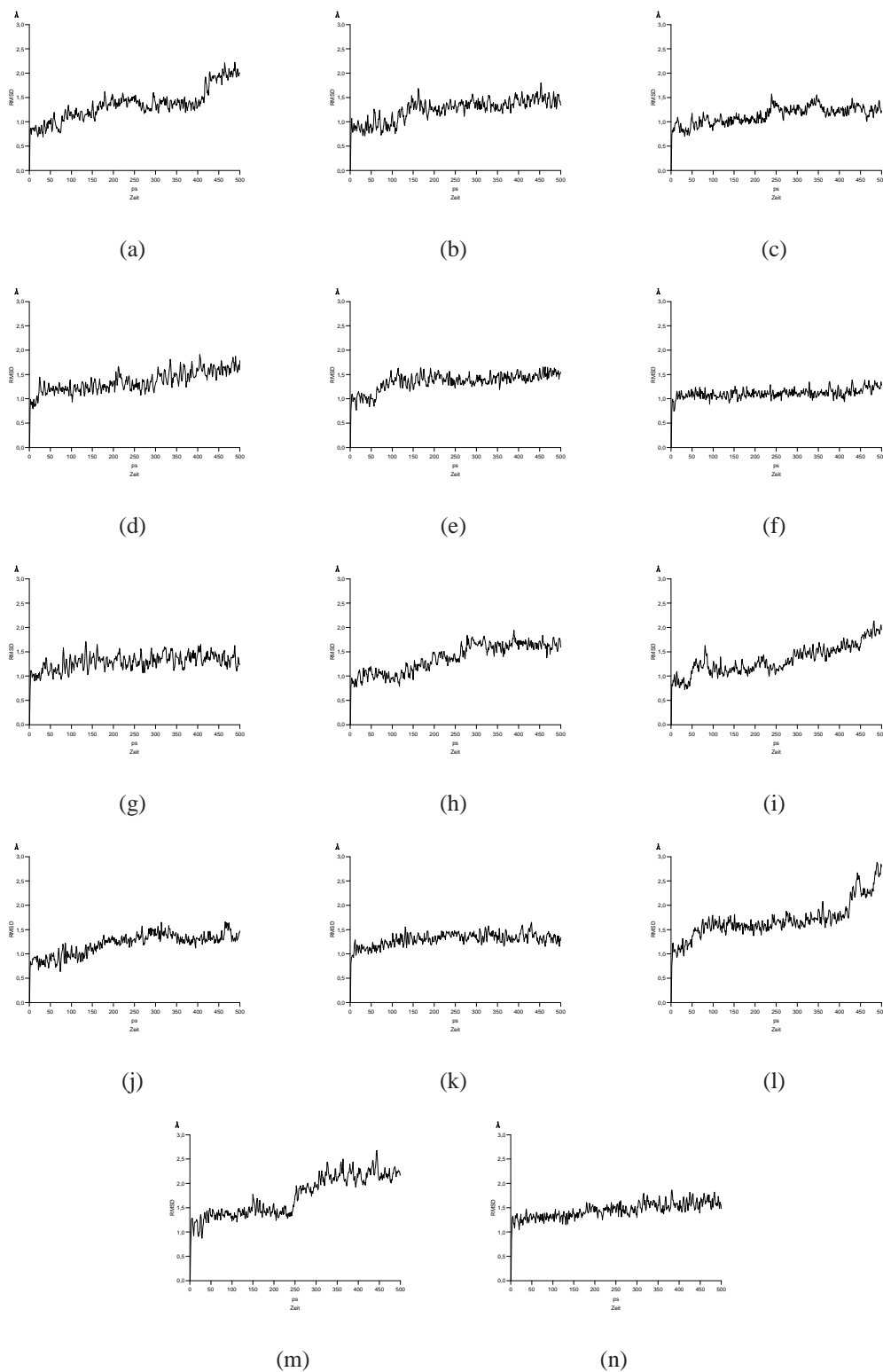


Abbildung 8.10: RMSD-Werte im Vergleich zur Startstruktur der MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur II.

## 8.2 Orientierungsänderung bei wiederholten Simulationen von Lysozym mit Struktur II

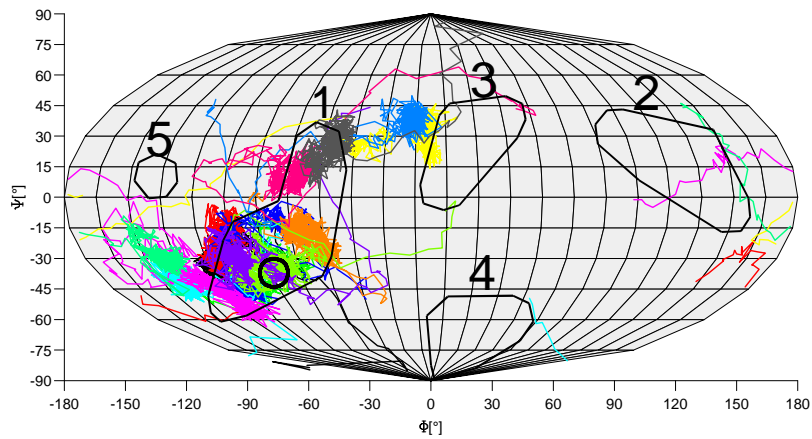


Abbildung 8.11: Orientierungen von Struktur II bei einer Startdistanz von 20 Å.

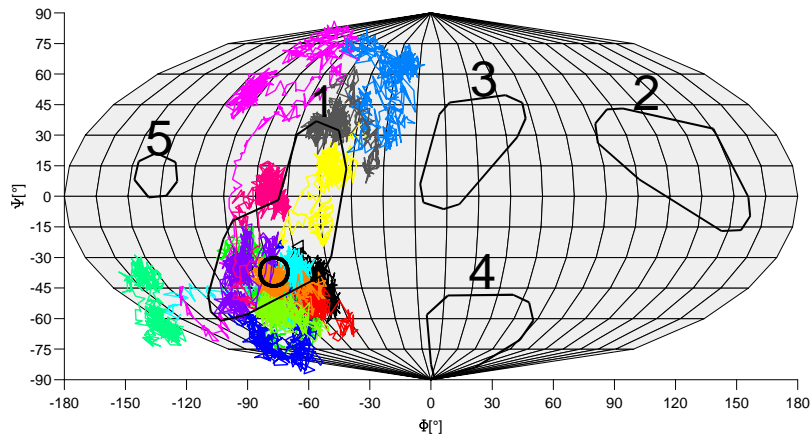


Abbildung 8.12: Orientierungen von Struktur II bei einer Startdistanz von 15 Å.

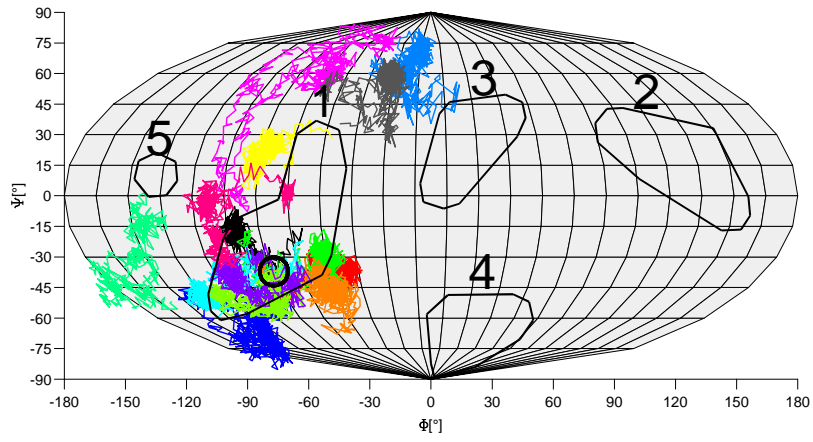


Abbildung 8.13: Orientierungen von Struktur II bei einer Startdistanz von 10 Å.

## 8 Anhang

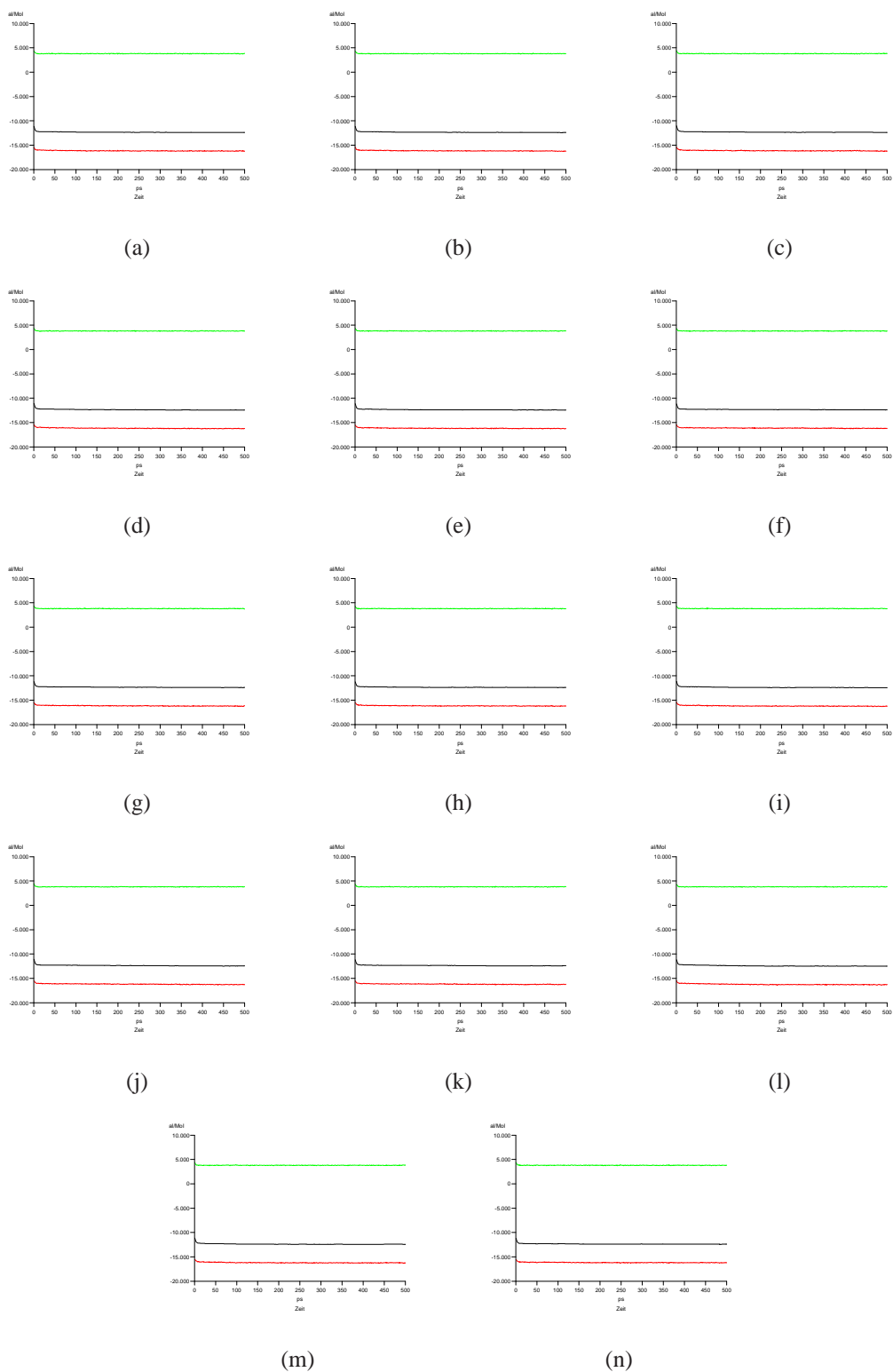


Abbildung 8.14: Energien bei wiederholten MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur II bei 20 Å Abstand zum Adsorber. Gesamtenergie (schwarz), potentielle Energie (rot) und kinetische Energie (grün).



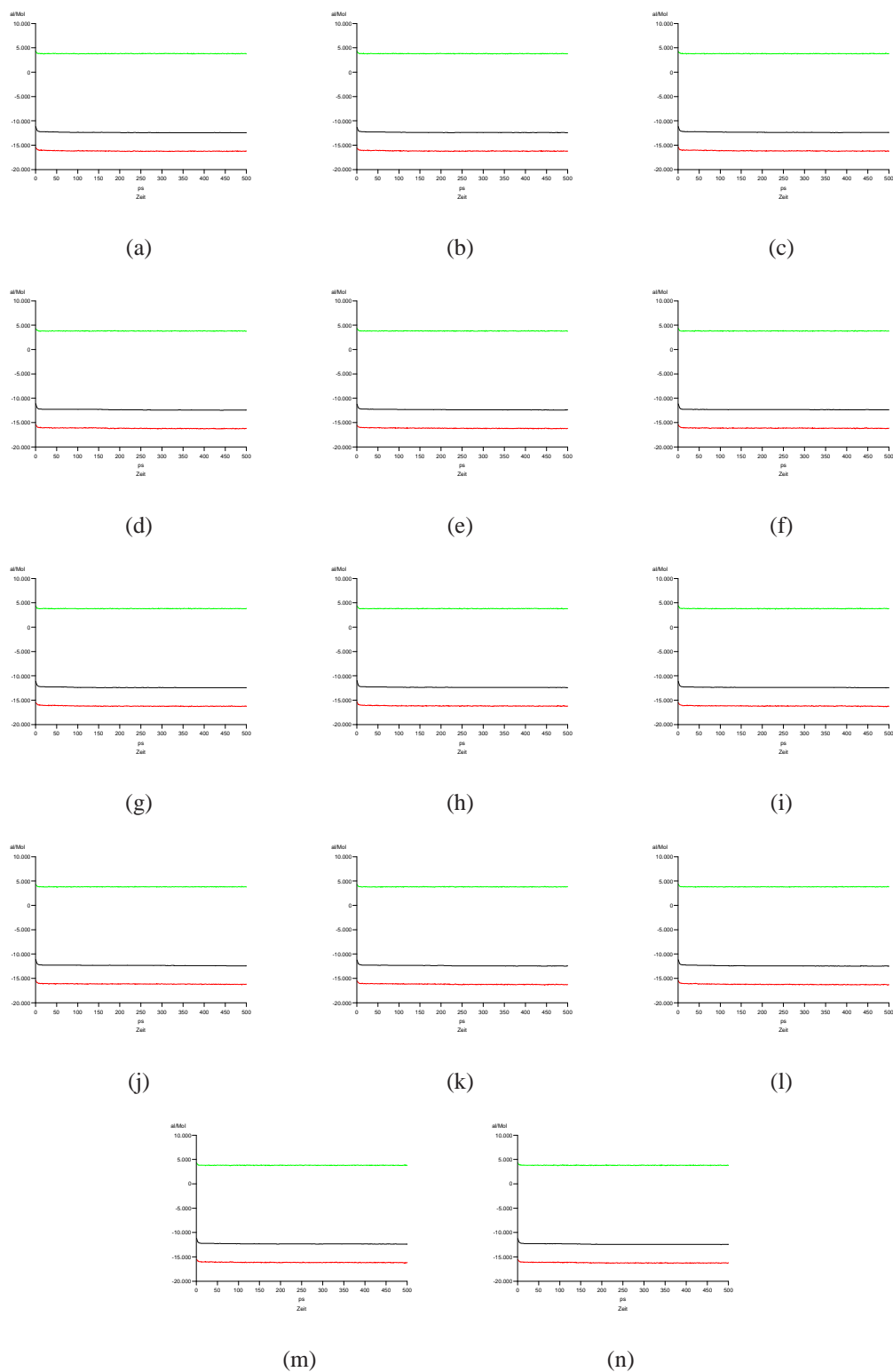


Abbildung 8.15: Energien bei wiederholten MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur II bei 15 Å Abstand zum Adsorber. Gesamtenergie (schwarz), potentielle Energie (rot) und kinetische Energie (grün).

## 8 Anhang

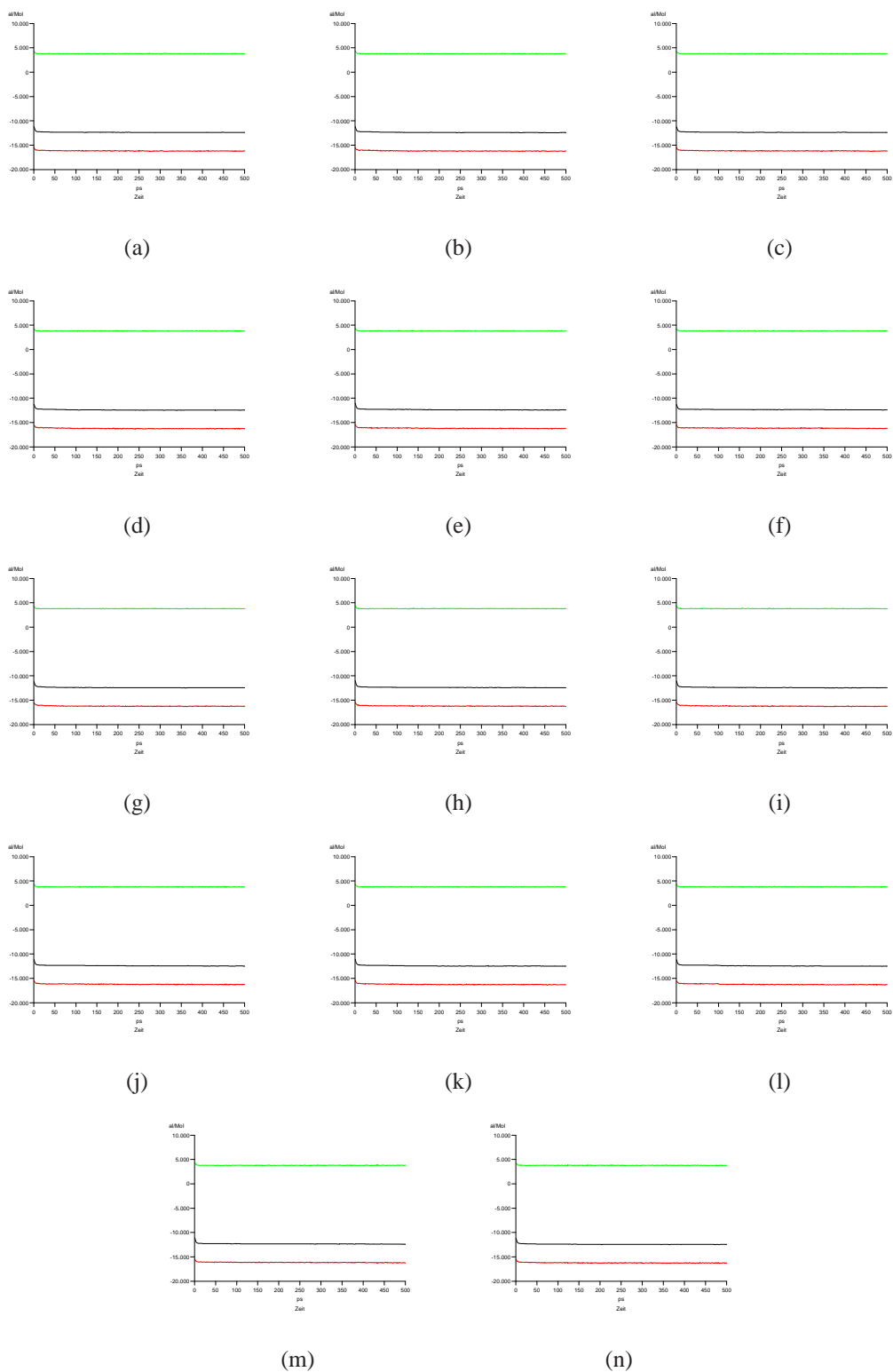


Abbildung 8.16: Energien bei wiederholten MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur II bei 10 Å Abstand zum Adsorber. Gesamtenergie (schwarz), potentielle Energie (rot) und kinetische Energie (grün).

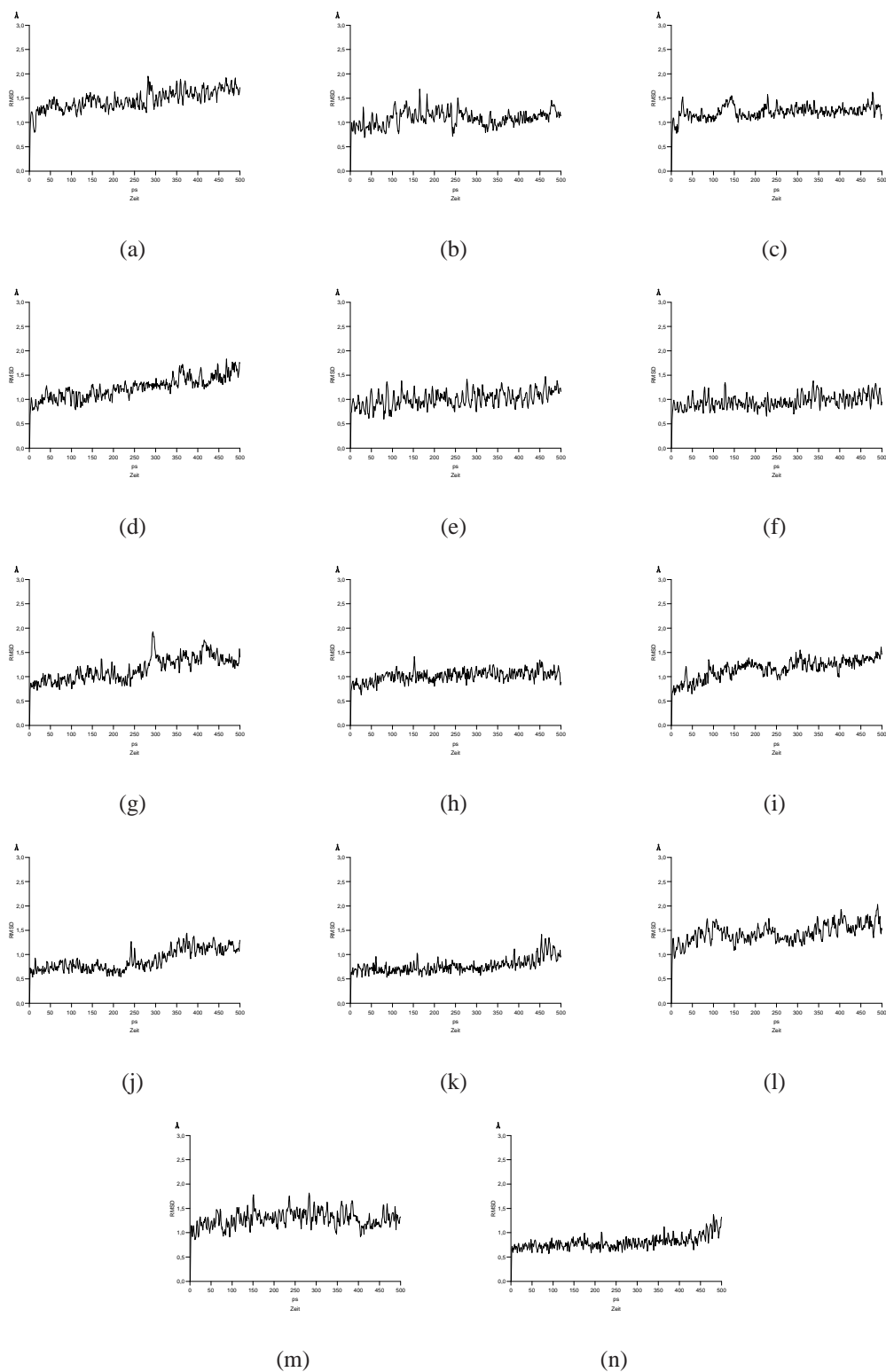


Abbildung 8.17: RMSD-Werte im Vergleich zur Startstruktur bei wiederholten MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur II bei 20 Å Abstand zum Adsorber zu Beginn der Simulationen.

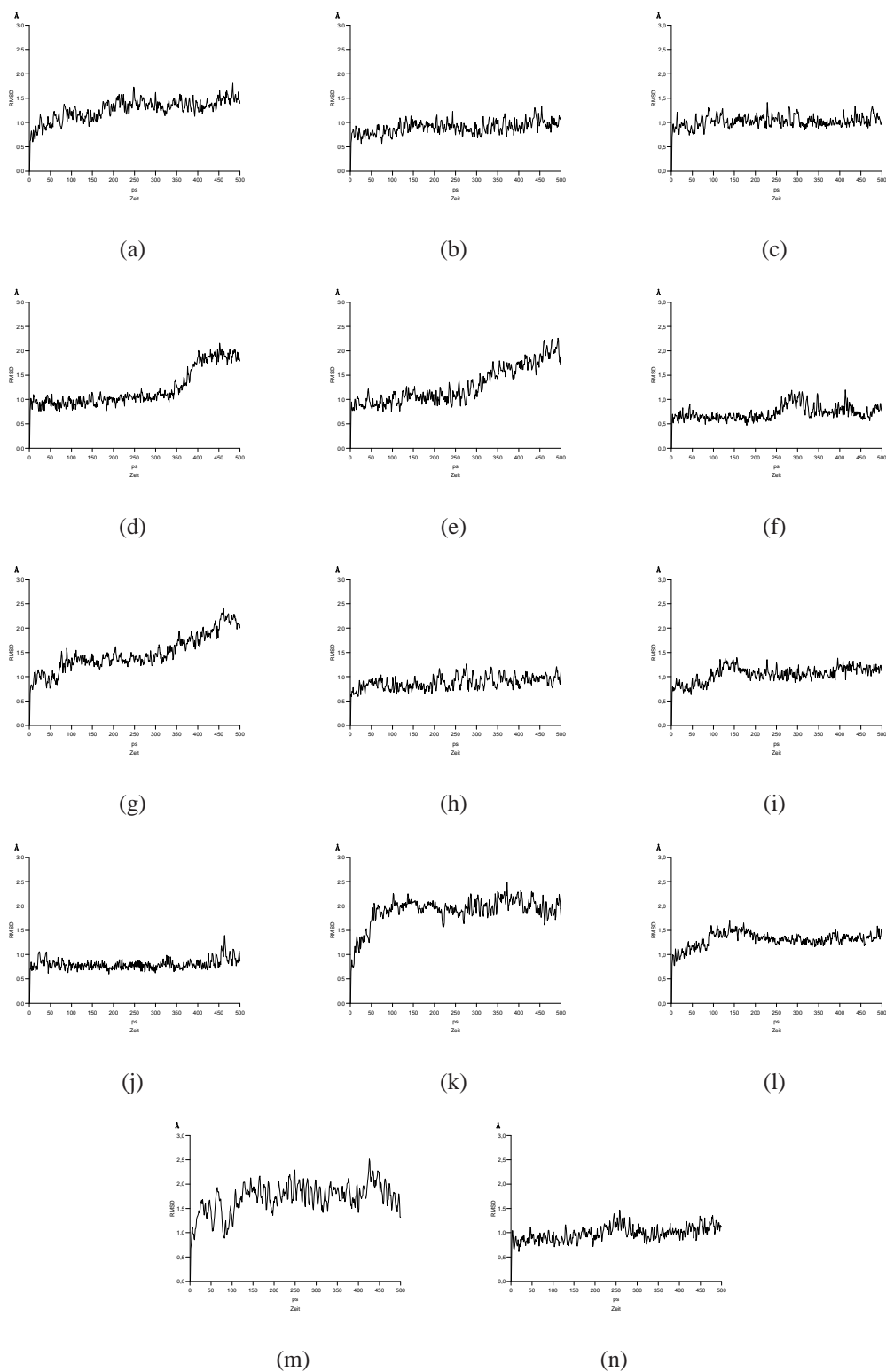


Abbildung 8.18: RMSD-Werte im Vergleich zur Startstruktur bei wiederholten MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur II bei 15 Å Abstand zum Adsorber zu Beginn der Simulationen.

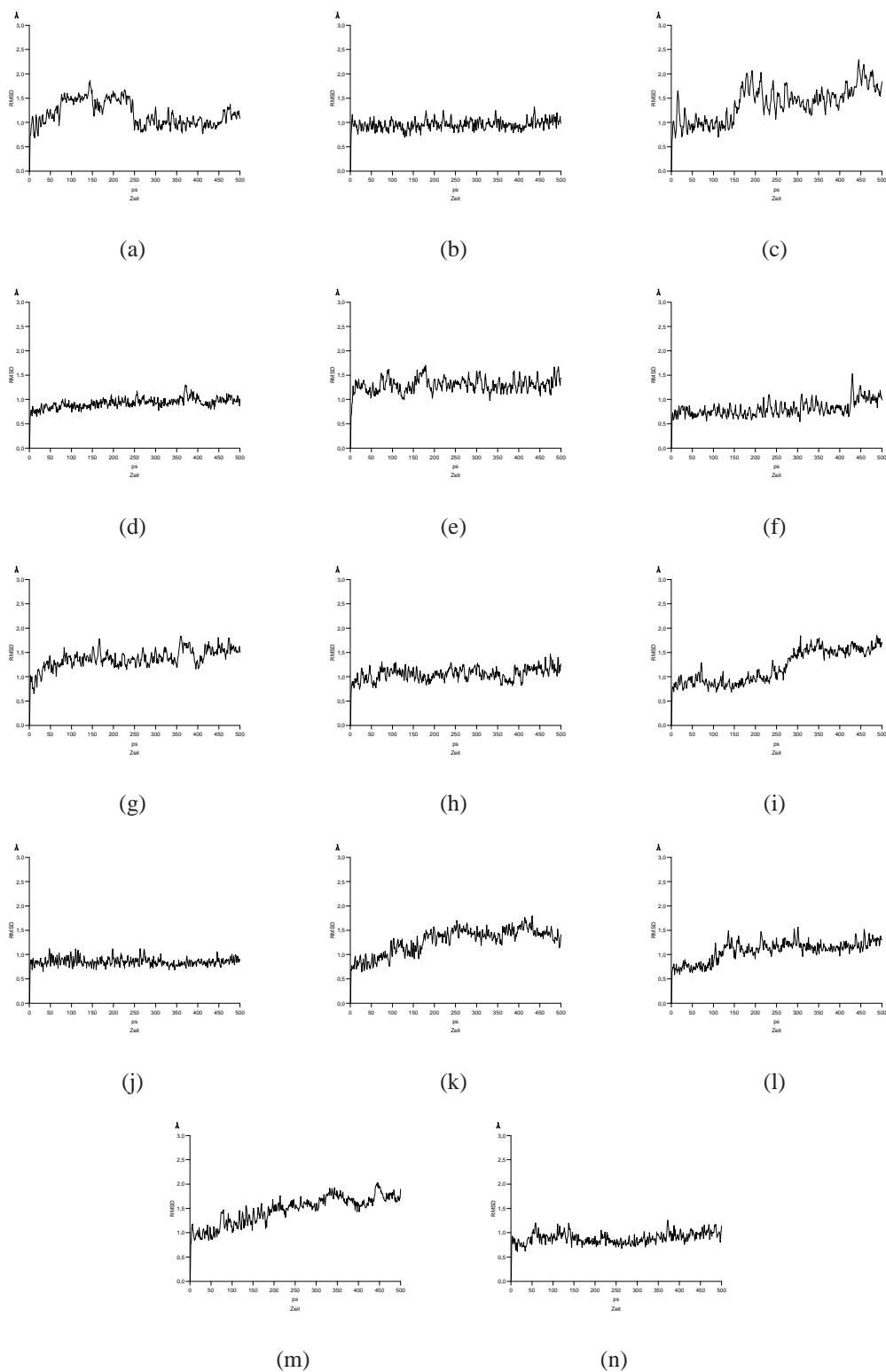
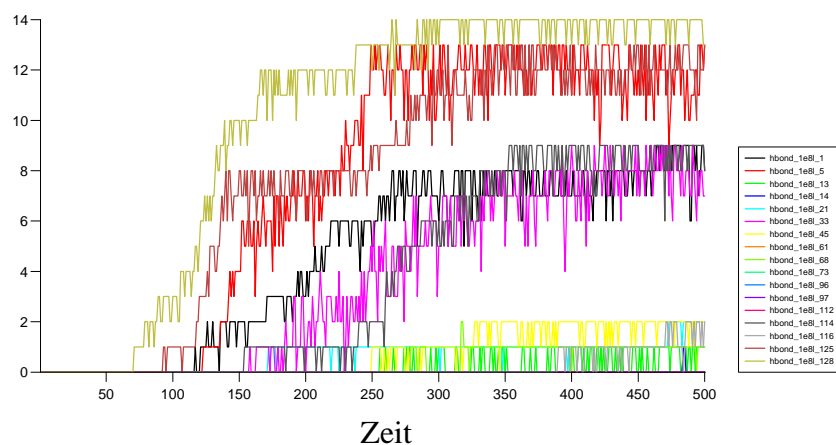


Abbildung 8.19: RMSD-Werte im Vergleich zur Startstruktur bei wiederholten MD-Simulationen von Lysozym mit Struktur II bei 10 Å Abstand zum Adsorber zu Beginn der Simulationen.

### 8.3 Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den positiv geladenen Aminosäuren von Lysozym und der Adsorberoberfläche

Struktur I



Struktur II

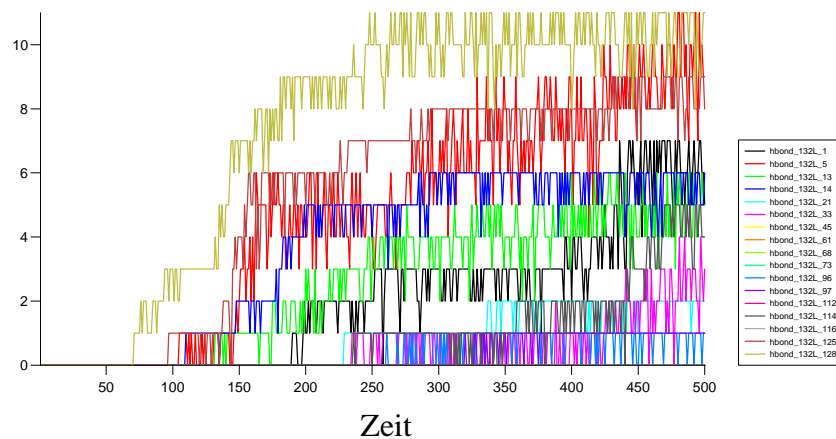
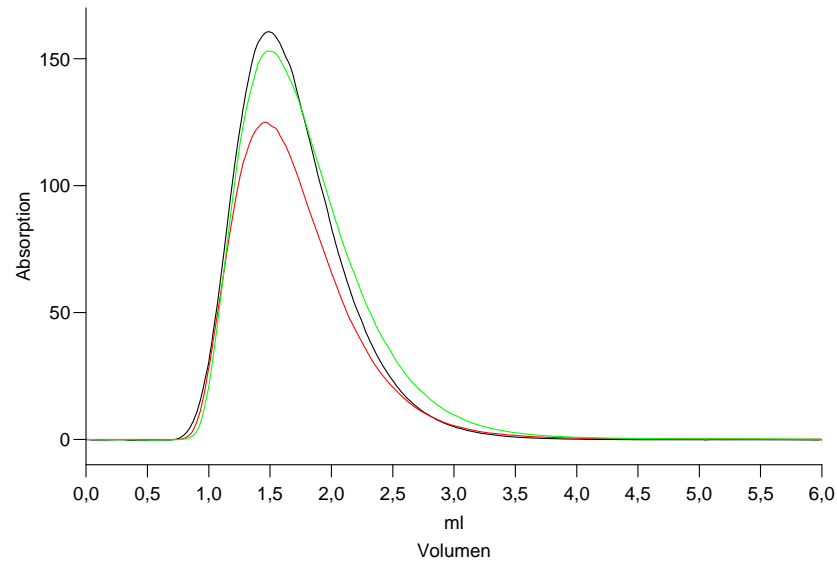


Abbildung 8.20: Über 14 MD-Simulationen mit unterschiedlicher Startorientierung aufsummierte Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen pro Aminosäure.

## 8.4 Retentionen der HIC-Experimente

Chymotrypsinogen A  
mAU



Lysozym  
mAU

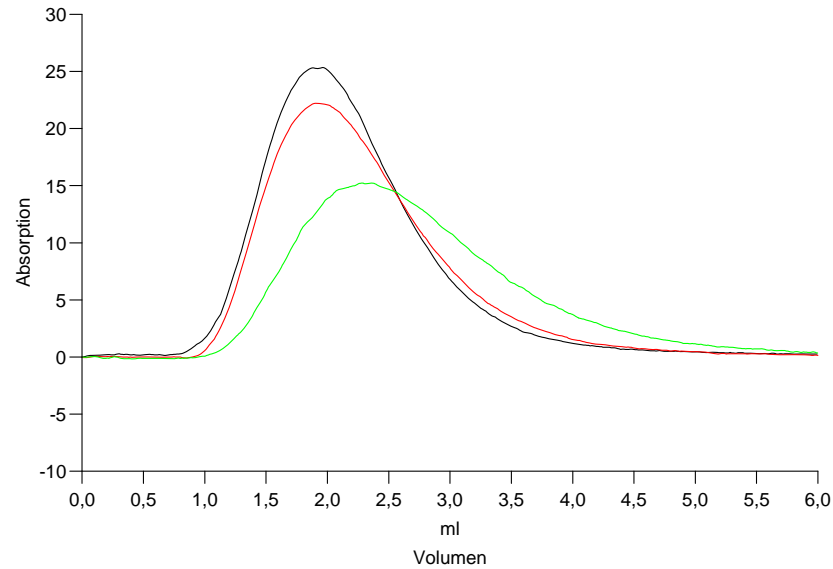
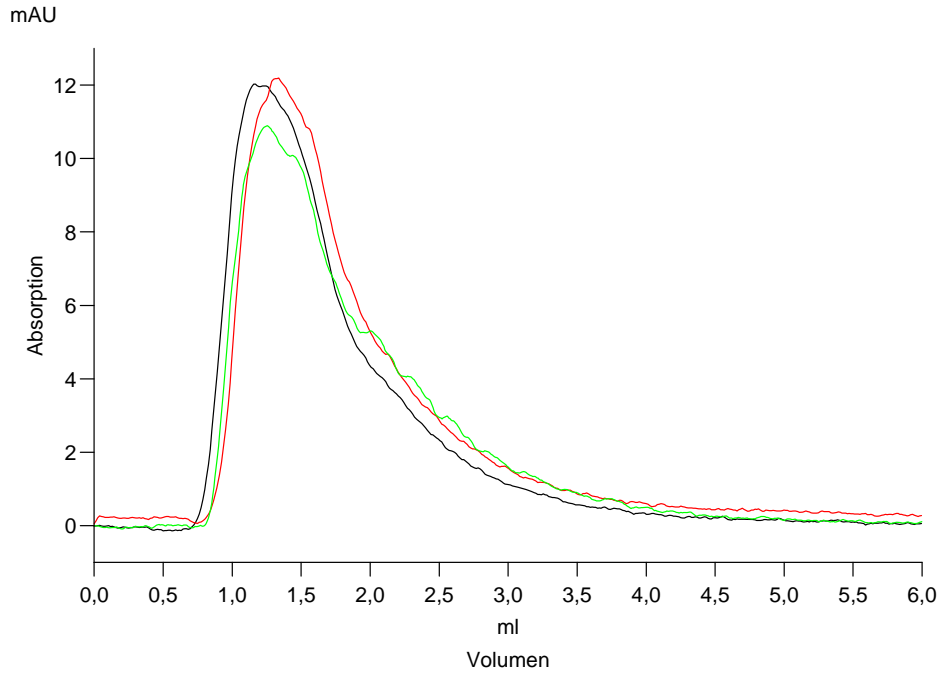


Abbildung 8.21: Retentionsdaten für Chymotrypsinogen A und Lysozym auf verschiedenen Säulen. Schwarz: Butylliganden, Rot: Octylliganden und Grün: Phenylliganden.

Mab01



Mab02

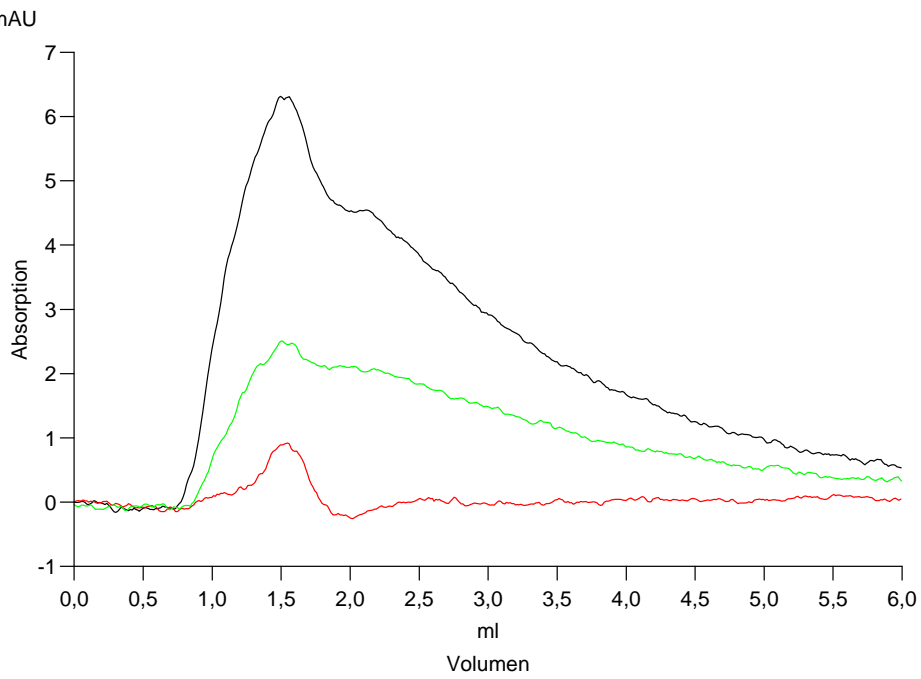


Abbildung 8.22: Retentionsdaten für Mab01 und Mab02 auf verschiedenen Säulen. Schwarz: Butylliganden, Rot: Octylliganden und Grün: Phenylliganden.



## 8.5 Abstand der P450-BM3-Hämdomäne zur Ionenaustauscheroberfläche während der MD-Simulationen

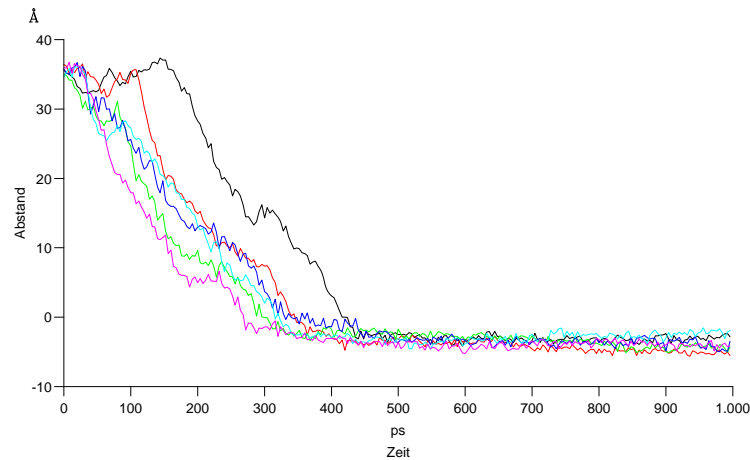


Abbildung 8.23: Abstand der P450-BM3-Hämdomäne bei MD-Simulationen über der Oberfläche von QAE.

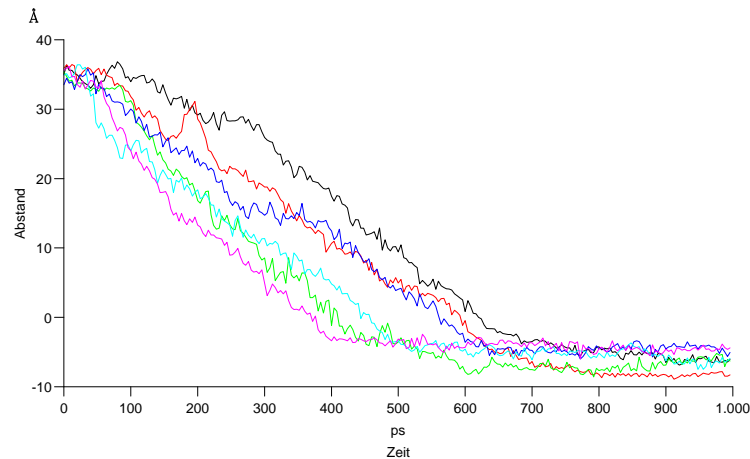


Abbildung 8.24: Abstand der P450-BM3-Hämdomäne bei MD-Simulationen über der Oberfläche von SuperQ.

## 8.6 Orientierung des C-Terminus von Lysozym bei verschiedenen PDB-Einträgen

STRUKTUR	TORSION	STRUKTUR	TORSION	STRUKTUR	TORSION	STRUKTUR	TORSION
132l	31.2	1lj3B	-171.4	1vatA	-126.9	2hu1A	-141.2
193l	-133.7	1lj4A	-148.7	1vauA	-132.3	2i25L	-134.5
194l	-132.3	1lj4B	-172.5	1vdqA	-129.0	2i25M	-126.9
1aki	-129.9	1ljeA	-147.1	1vdsA	-130.9	2i26L	-133.5
1azf	-129.5	1ljeB	-172.3	1vdtA	-127.2	2i26M	-134.9
1b0dA	-129.5	1ljfA	-145.4	1vedA	-126.9	2i26Q	-142.5
1b2kA	-175.3	1ljfB	-172.6	1vfbC	-103.7	2i6zA	-135.2
1b2kB	-146.6	1ljgA	-148.4	1w6zA	-126.5	2lym	-115.7
1bgi	-126.4	1ljgB	-172.4	1wtmA	-128.7	2lyo	-143.1
1bhZ	-129.5	1ljhA	-145.7	1wtnA	-123.9	2lyz	-136.4
1bvKc	-116.2	1ljhB	-172.0	1xei	-101.1	2lzt	-107.1
1bvKf	-116.6	1ljiA	-148.7	1xej	75.6/vis	2yvbA	-133.2
1bvxA	-127.4	1ljiB	-171.5	1xek	-102.5	3hfmY	-132.0
1bwhA	-130.4	1ljjA	-149.7	1xgqC	-123.6	3lym	-114.5
1bwiA	-131.8	1ljjB	-171.7	1xgrC	-134.7	3lyo	-146.4
1bwjA	-127.9	1ljkA	-148.6	1xgtC	-131.4	3lytA	-77.6
1c08C	-130.1	1ljkB	-169.6	1xguC	-124.4	3lytB	-179.2
1c10A	-121.7	1lkrB	-158.9	1yikA	-126.3	3lyz	-137.4
1dpwA	-127.1	1lks	-95.2	1yilA	-124.6	3lzt	-122.7
1dqjC	-132.7	1lma	-147.0	1ykxX	-126.3	4lym	-130.2
1e8l	-104.1	1lpi	-124.1	1ykyX	-125.1	4lyo	-154.3
1f0wA	-127.3	1lsa	-85.9	1yKzX	-128.4	4lytA	-126.8
1f10A	-130.9	1lsb	-86.7	1yl0X	-130.0	4lytB	-144.5
1fdlY	-130.0	1lsc	-98.0	1yl1X	-130.6	4lyz	-137.8
1g7hC	-127.7	1lSd	-131.5	1yqvY	-133.5	4lzt	-125.1
1g7iC	-122.0	1lse	-129.6	1z55A	-129.9	5lymA	-138.5
1g7jC	-124.8	1lsf	-74.2	1zvyB	-141.5	5lymB	-161.4
1gwdA	-125.2	1lyo	-156.8	2a6uA	-116.0	5lyt	-100.0
1h87A	-129.7	1lysA	-143.3	2aubA	-141.2	5lyz	-137.8

Tabelle 8.2: Vergleich der Orientierung des C-Terminus von Lysozym Strukturen über Torsionswinkel (vis: visuelle Überprüfung, noct: fehlende AS am C-Terminus).

STRUKTUR	TORSION	STRUKTUR	TORSION	STRUKTUR	TORSION	STRUKTUR	TORSION
1hel	-125.7	1lysB	-106.6	2b5zA	-124.5	6lyt	-125.9
1hew	-130.0	1lyz	-139.0	2blxA	-136.0	6lyz	-137.5
1hf4A	-145.2	1lz8A	-125.8	2blyA	-136.1	7lyz	-123.8
1hf4B	-173.3	1lz9A	-122.4	2bpuA	-120.2	8lyz	-136.3
1hsw	-125.7	1lza	-126.3	2c8oA	-126.4	1g7lC	vis
1hsx	-133.8	1lzb	-127.7	2c8pA	-123.6	1g7mC	vis
1ic4Y	-134.6	1lzc	-130.0	2cdaA	-126.2	1ndmC	vis
1ic5Y	-131.5	1lznA	-125.0	2cgiA	-129.4	1p2cC	vis
1ic7Y	-136.1	1lzt	-117.3	2d4iA	-145.8	1p2cF	vis
1ieeA	-141.2	1mlcE	-144.5	2d4jA	-145.8	1ri8B	vis
1io5A	-129.7	1mlcF	-136.6	2d4kA	-151.5	1v7tB	vis
1j1oY	-128.4	1n4fA	-136.2	2d6bA	-134.8	1vdpA	vis
1j1pY	-128.2	1ps5A	-128.3	2d91A	-108.1	1vdpB	vis
1j1xY	-126.5	1qtKA	-123.0	2dqC	-122.8	1xfpL	vis
1ja2A	-107.4	1rcmA	-95.7	2dqdY	-124.3	1xgpC	vis
1ja4A	-111.4	1rcmB	-122.9	2dqE	-123.6	1zmyL	vis
1ja6A	-122.5	1rfp	-127.5	2dqfC	-116.7	1zmyM	vis
1ja7A	-125.1	1rjCB	-130.7	2dqfF	-139.9	1zv5L	vis
1jisA	-129.2	1sf4A	-104.6	2dqgY	-131.1	1zvhL	vis
1jitA	-125.2	1sf6A	-95.1	2dqhY	-127.8	2d4iB	vis
1jiyA	-128.3	1sf7A	-117.3	2dqiY	-123.6	2d4kN	vis
1jj0A	-128.9	1sfBA	-129.9	2dqjY	-127.4	1lkrA	vis
1jj1A	-126.7	1sfgA	-116.7	2epeA	-130.4	1dpxA	noct
1jj3A	-131.1	1sq2L	-133.4	2f2nA	-120.8	1gpqC	noct
1jj3B	-164.5	1t3pA	-120.4	2f30A	-125.7	1gpqD	noct
1jpo	-124.2	1t6vL	-132.2	2f4aA	-133.9	1hc0A	noct
1jtoL	-120.4	1t6vM	-131.7	2f4gA	-140.3	1melL	noct
1jtoM	-146.6	1ua6Y	-131.7	2fbbA	-131.6	1melM	noct
1jttL	-122.7	1uc0A	-132.9	2g4qA	-136.6	1qioA	noct
1kipC	-113.2	1ucoA	-143.6	2h9jA	-130.5	1uuzC	noct
1kiqC	-121.3	1ucoB	-171.6	2h9kA	-127.1	1vdpA	noct
1kirC	-90.2	1uig	-126.0	2hs7A	-122.9	2a7dA	noct
1lcnA	-140.8	1uih	-128.3	2hs9A	-126.6	2a7fA	noct

Tabelle 8.2: Vergleich der Orientierung des C-Terminus von Lysozym Strukturen über Torsionswinkel (vis: visuelle Überprüfung, noct: fehlende AS am C-Terminus).

## 8 Anhang

STRUKTUR	TORSION	STRUKTUR	TORSION	STRUKTUR	TORSION	STRUKTUR	TORSION
1lcnB	-164.3	1uuzD	-145.8	2hsoA	-115.1	2g4pA	noct
1lj3A	-148.2	1v7tA	-150.5	2htxA	-143.8		

Tabelle 8.2: Vergleich der Orientierung des C-Terminus von Lysozym Strukturen über Torsionswinkel (vis: visuelle Überprüfung, noct: fehlende AS am C-Terminus).

# Literaturverzeichnis

- [1] <http://mathworld.wolfram.com/mollweideprojection.html>.
- [2] *Product specification sheet: Amersham Sepharose Fast Flow ion exchangers, Version 18-1177-22 AA, 2003-10.*
- [3] *Product specification sheet: Toyopearl DEAE 650. Version: 2001-10-01*  
<http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/Products/ProcessMedia/ByMode/IEC/ToyopearlDEAE650.htm>.
- [4] *Product specification sheet: Toyopearl QAE 550, Version: 2001-10-01*  
<http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/Products/ProcessMedia/ByMode/IEC/ToyopearlQAE550.htm>.
- [5] *Product specification sheet: Toyopearl SuperQ 650, Version: 2001-10-01*  
<http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/Products/ProcessMedia/ByMode/IEC/ToyopearlSuperQ650.htm>.
- [6] *ProFit* <http://www.bioinf.org.uk/software/>. Martin, A.C.R.
- [7] Abul K. Abbas and Andrew H. Lichtman. *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders, 5th ed., 2005.
- [8] N. B. Afeyan, S. P. Fulton, and F. E. Regnier. Perfusion chromatography packing materials for proteins and peptides. *Journal of Chromatography*, 544(1-2):267–279, 1991.
- [9] Madhuri Agashe, Vivek Raut, Steven J Stuart, and Robert A Latour. Molecular simulation to characterize the adsorption behavior of a fibrinogen gamma-chain fragment. *Langmuir*, 21(3):1103–1117, Feb 2005.
- [10] Gordon Alderton, J. C. Lewis, and H. L. Fevold. The relationship of lysozyme, biotin and avidin. *Science*, 101(2615):151–152, Feb 1945.

- [11] E. G. Alexov and M. R. Gunner. Incorporating protein conformational flexibility into the calculation of ph-dependent protein properties. *Biophys J*, 72(5):2075–2093, May 1997.
- [12] K Almalah, J McGuire, and R Sproull. A macroscopic model for the single-component protein adsorption-isotherm. *Journal Of Colloid And Interface Science*, 170(1):261–268, Mar 1 1995.
- [13] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3):403–410, Oct 1990.
- [14] T. Arai and W. Norde. The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 1. adsorption from single protein solutions. *Colloids and Surfaces*, 51:1–15, Nov 23 1990.
- [15] T. Arakawa and S. N. Timasheff. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, 23(25):5912–5923, Dec 1984.
- [16] A. Bansal, R. R. Biederman, Y. H. Ma, and W. M. Clark. Protein adsorption and fouling of ceramic membranes as measured by scanning electron microscopy with digital x-ray mapping. *Chemical Engineering Communications*, 108:365–379, 1991.
- [17] Christopher I. Bayly, Piotr Cieplak, Wendy Cornell, and Peter A. Kollman. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the resp model. *Journal of Physical Chemistry*, 97(40):10269–10280, 1993.
- [18] Alain Beck, Marie-Claire Bussat, Nathalie Zorn, Virginie Robillard, Christine Klinguer-Hamour, Stéphane Chenu, Liliane Goetsch, Nathalie Corvaia, Alain Van Dorsselaer, and Jean-François Haeuw. Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-igf-1 receptor antibodies produced in cho and ns0 cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 819(2):203–218, May 2005.
- [19] Helen Berman, Kim Henrick, and Haruki Nakamura. Announcing the worldwide protein data bank. *Nat Struct Biol*, 10(12):980, Dec 2003.
- [20] C. C. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma. Structure of hen egg-white lysozyme. a three-dimensional fourier synthesis at 2 angstrom resolution. *Nature*, 206(986):757–761, May 1965.

- [21] E Blomberg, PM Claesson, and JC Froberg. Surfaces coated with protein layers: a surface force and esca study. *Biomaterials*, 19(4-5):371–386, MAR 1998.
- [22] E Blomberg, PM Claesson, JC Froberg, and RD Tilton. Interaction between adsorbed layers of lysozyme studied with the surface force technique. *Langmuir*, 10(7):2325–2334, Jul 1994.
- [23] E Blomberg, PM Claesson, and RD Tilton. Short-range interaction between adsorbed layers of human serum-albumin. *Journal of colloid and interface science*, 166(2):427–436, Sep 1994.
- [24] P. N. Boyd, A. C. Lines, and A. K. Patel. The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of campath-1h. *Mol Immunol*, 32(17-18):1311–1318, Dec 1995.
- [25] B. C. Braden and R. J. Poljak. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB J*, 9(1):9–16, Jan 1995.
- [26] Bernard R. Brooks, Robert E. Bruccoleri, Barry D. Olafson, David J. States, S. Swaminathan, and Martin Karplus. Charmm: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 4(2):187–217, 1983.
- [27] N. L. Burns and K. Holmberg. Surface charge characterization and protein adsorption at biomaterials surfaces. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 100:271–275, 1996.
- [28] F. Carlsson, E. Hyltner, T. Arnebrant, M. Malmsten, and P. Linse. Lysozyme adsorption to charged surfaces. a monte carlo study. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(28):9871–9881, 2004.
- [29] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, K.M. Merz, B. Wang, D.A. Pearlman, M. Crowley, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, P. Beroza, C. Schafmeister, J.W. Caldwell, W.S. Ross, and P.A. Kollman. Amber 8, 2004. University of California, San Francisco.
- [30] Jie Chen, Qiong Luo, Curt M Breneman, and Steven M Cramer. Classification of protein adsorption and recovery at low salt conditions in hydrophobic interaction chromatographic systems. *J Chromatogr A*, 1139(2):236–246, Jan 2007.

- [31] Jie Chen, Ting Yang, and Steven M Cramer. Prediction of protein retention times in gradient hydrophobic interaction chromatographic systems. *J Chromatogr A*, 1177(2):207–214, Jan 2008.
- [32] Jie Chen, Ting Yang, Qiong Luo, Curt M. Breneman, and Steven M. Cramer. Investigation of protein retention in hydrophobic interaction chromatographic (hic) systems using the preferential interaction theory and quantitative structure property relationship models. *Reactive & Functional Polymers*, 67(12):1561–1569, Dec 2007.
- [33] Xin Chen, Tao Wu, Qi Wang, and Jia-Wei Shen. Shield effect of silicate on adsorption of proteins onto silicon-doped hydroxyapatite (100) surface. *Biomaterials*, 29(15):2423–2432, May 2008.
- [34] R. M. Chicz and F. E. Regnier. Single amino acid contributions to protein retention in cation-exchange chromatography: resolution of genetically engineered subtilisin variants. *Anal Chem*, 61(18):2059–2066, Sep 1989.
- [35] Chris Chumsae, Georgeen Gaza-Bulseco, Joanne Sun, and Hongcheng Liu. Comparison of methionine oxidation in thermal stability and chemically stressed samples of a fully human monoclonal antibody. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 850(1-2):285–294, May 2007.
- [36] Matthew Clark, Richard D. Cramer III, and Nicole Van Opdenbosch. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. *Journal of Computational Chemistry*, 10(8):982–1012, 1989.
- [37] Alastair N. Cormack, Jess Raymond Lewis, and Alan H. Goldstein. Computer simulation of protein adsorption to a material surface in aqueous solution: Biomaterials modeling of a ternary system. *J. Phys. Chem. B*, 108(52):20408–20418, 2004.
- [38] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, and P.A. Kollman. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules j. am. chem. soc. 1995, 117, 5179-5197. *Journal of the American Chemical Society*, 118(9):2309–2309, 1996.
- [39] Wendy D. Cornell, Piotr Cieplak, Christopher I. Bayly, and Peter A. Kollmann. Application of resp charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation. *Journal of the American Chemical Society*, 115(21):9620–9631, 1993.



- [40] G. Cruciani, P. Crivori, P.-A. Carrupt, and B. Testa. Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the volsurf approach. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 503:17–30, 2000.
- [41] R. C. Davies, A. Neuberger, and B. M. Wilson. The dependence of lysozyme activity on ph and ionic strength. *Biochim Biophys Acta*, 178(2):294–305, Apr 1969.
- [42] M.E. Davis and J.A. McCammon. Electrostatics in biomolecular structure and dynamics. *Chem. Rev.*, 90:508–521, 1990.
- [43] N Debaillou, P Dejardin, A Schmitt, and JL Brash. Fibrinogen dimensions at an interface - variations with bulk concentration, temperature, and ph. *Journal of colloid and interface science*, 100(1):167–174, 1984.
- [44] R.T DeHoff, Eh Agelint, and K.R Craig. Experimental determination of topological properties of three-dimensional microstructures. *Journal of Microscopy-Oxford*, 95:69, 1972.
- [45] J. Deisenhofer. Crystallographic refinement and atomic models of a human fc fragment and its complex with fragment b of protein a from staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry*, 20(9):2361–2370, Apr 1981.
- [46] W. L. DeLano. *The PyMOL Molecular Graphics System*. DeLano Scientific: Palo Alto, CA, USA, 2002.
- [47] A. C. Dias-Cabral, A. S. Ferreira, J. Phillips, J. A. Queiroz, and N. G. Pinto. The effects of ligand chain length, salt concentration and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto polypropyleneglycol-sepharose. *Biomed Chromatogr*, 19(8):606–616, Oct 2005.
- [48] Lawrence W Dick, Difei Qiu, David Mahon, Michael Adamo, and Kuang-Chuan Cheng. C-terminal lysine variants in fully human monoclonal antibodies: investigation of test methods and possible causes. *Biotechnol Bioeng*, 100(6):1132–1143, Aug 2008.
- [49] M. M. Diogo, J. A. Queiroz, G. A. Monteiro, S. A. Martins, G. N. Ferreira, and D. M. Prazeres. Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol Bioeng*, 68(5):576–583, Jun 2000.

- [50] Florian Dimer and Jurgen Hubbuch. A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins. *Journal of Chromatography A*, 1149(2):312–320, 2007.
- [51] R. Ditchfield, W. J. Hehre, and J. A. Pople. Self-consistent molecular-orbital methods. ix. an extended gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. *Journal of Chemical Physics*, 54(2):724–728, 1971.
- [52] F.A.L. Dullien. *Porous Media, Fluid Transport and Pore Structure*. Academic Press Inc., New York, 1992.
- [53] R. A. Dwek, A. C. Lellouch, and M. R. Wormald. Glycobiology: 'the function of sugar in the igg molecule'. *J Anat*, 187 ( Pt 2):279–292, Oct 1995.
- [54] Narayanan Eswar, Ben Webb, Marc A Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, David Eramian, Min-Yi Shen, Ursula Pieper, and Andrej Sali. Comparative protein structure modeling using modeller. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 5:Unit 5.6, Oct 2006.
- [55] J. L. Fausnaugh, L. A. Kennedy, and F. E. Regnier. Comparison of hydrophobic-interaction and reversed-phase chromatography of proteins. *J Chromatogr*, 317:141–155, Dec 1984.
- [56] J. L. Fausnaugh and F. E. Regnier. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Chromatogr*, 359:131–146, May 1986.
- [57] Alexander Fleming. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 93(653):306–317, May 1922.
- [58] Jace L Fogle, John P O'Connell, and Erik J Fernandez. Loading, stationary phase, and salt effects during hydrophobic interaction chromatography: alpha-lactalbumin is stabilized at high loadings. *J Chromatogr A*, 1121(2):209–218, Jul 2006.
- [59] J. T. Fredrich, K. H. Greaves, and J. W. Martin. Pore geometry and transport-properties of fontainebleau sandstone. *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences & Geomechanics Abstracts*, 30(7):691–697, 1993.
- [60] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi,

- V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, P. Salvador, J. J. Dannenberg, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople. Gaussian 98 (revision a.11.3), 2001.
- [61] Georgeen Gaza-Bulsecu, Ashley Bulsecu, Chris Chumsae, and Hongcheng Liu. Characterization of the glycosylation state of a recombinant monoclonal antibody using weak cation exchange chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 862(1-2):155–160, Feb 2008.
- [62] K. Gekko and Y. Hasegawa. Compressibility-structure relationship of globular proteins. *Biochemistry*, 25(21):6563–6571, Oct 1986.
- [63] R. E. Georgescu, E. G. Alexov, and M. R. Gunner. Combining conformational flexibility and continuum electrostatics for calculating pk(a)s in proteins. *Biophys J*, 83(4):1831–1748, 2002.
- [64] R. Ghirlando, J. Lund, M. Goodall, and R. Jefferis. Glycosylation of human igg-fc: influences on structure revealed by differential scanning micro-calorimetry. *Immunol Lett*, 68(1):47–52, May 1999.
- [65] DA Giammona. *An examination of conformational flexibility in porphyrin and bulky-ligand binding in myoglobin*. PhD thesis, University of California, Davis, 1984.
- [66] M. K. Gilson and B. H. Honig. The dielectric constant of a folded protein. *Biopolymers*, 25(11):2097–2119, Nov 1986.
- [67] M.K. Gilson, K.A. Sharp, and B. Honig. Calculating the electrostatic potential of molecules in solution: method and error assessment. *J. Comp. Chem.*, 9:327–335, 1987.
- [68] Anton Glieder, Edgardo T Farinas, and Frances H Arnold. Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat Biotechnol*, 20(11):1135–1139, Nov 2002.

- [69] K Graumann and AA Ebenbichler. Development and scale up of preparative HIC for the purification of a recombinant therapeutic protein. *Chemical Engineering & Technology*, 28(11):1398–1407, NOV 2005.
- [70] N. Guex and M. C. Peitsch. Swiss-model and the swiss-pdbviewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15):2714–2723, 1997.
- [71] L. Hagel. *Aqueous Size-Exclusion Chromatography: Pore size distributions*. Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [72] Tomoaki Hagiwara, Takaharu Sakiyama, and Hisahiko Watanabe. Molecular simulation of bovine beta-lactoglobulin adsorbed onto a positively charged solid surface. *Langmuir*, 25(1):226–234, Jan 2009.
- [73] D. Haidacher, A. Vailaya, and C. Horváth. Temperature effects in hydrophobic interaction chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(6):2290–2295, Mar 1996.
- [74] D. C. Haines, D. R. Tomchick, M. Machius, and J. A. Peterson. Pivotal role of water in the mechanism of p450bm-3. *Biochemistry*, 40(45):13456–13465, Nov 2001.
- [75] Avraham Halperin and Deborah E. Leckband. From ship hulls to contact lenses: repression of protein adsorption and the puzzle of peo. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IV - Physics*, 1:1171–1178, 2000.
- [76] Inbal Halperin, Buyong Ma, Haim Wolfson, and Ruth Nussinov. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, 47(4):409–443, Jun 2002.
- [77] L. J. Harris, S. B. Larson, K. W. Hasel, and A. McPherson. Refined structure of an intact igg2a monoclonal antibody. *Biochemistry*, 36(7):1581–1597, Feb 1997.
- [78] L. J. Harris, E. Skaletsky, and A. McPherson. Crystallographic structure of an intact igg1 monoclonal antibody. *J Mol Biol*, 275(5):861–872, Feb 1998.
- [79] R. J. Harris, B. Kabakoff, F. D. Macchi, F. J. Shen, M. Kwong, J. D. Andya, S. J. Shire, N. Bjork, K. Totpal, and A. B. Chen. Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 752(2):233–245, Mar 2001.

- [80] C. A. Hasemann, R. G. Kurumbail, S. S. Boddupalli, J. A. Peterson, and J. Deisenhofer. Structure and function of cytochromes p450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure*, 3(1):41–62, Jan 1995.
- [81] G.D. Hawkins, C.J. Cramer, and D.G. Truhlar. Parametrized models of aqueous free energies of solvation based on pairwise descreening of solute atomic charges from a dielectric medium. *Journal of Physical Chemistry*, 100(51):19824–19839, 1996.
- [82] Gregory D. Hawkins, Christopher J. Cramer, and Donald G. Truhlar. Pairwise solute descreening of solute charges from a dielectric medium. *Chemical Physics Letters*, 246(1-2):122–129, November 1995.
- [83] B. Honig and A. Nicholls. Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science*, 268(5214):1144–1149, May 1995.
- [84] Lihua Huang, Jirong Lu, Victor J Wroblewski, John M Beals, and Ralph M Riggin. In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by lc/ms/ms. *Anal Chem*, 77(5):1432–1439, Mar 2005.
- [85] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten. Vmd: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*, 14(1):33–38, 1996.
- [86] A. K. Hunter and G. Carta. Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion-exchangers i. morphology and equilibrium adsorption. *Journal of Chromatography A*, 897(1-2):65–80, 2000.
- [87] Takashi Ishihara, Toshihiko Kadoya, Hideaki Yoshida, Taro Tamada, and Shuichi Yamamoto. Rational methods for predicting human monoclonal antibodies retention in protein a affinity chromatography and cation exchange chromatography. structure-based chromatography design for monoclonal antibodies. *J Chromatogr A*, 1093(1-2):126–138, Nov 2005.
- [88] Charles A. jr. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, and Mark. Shlomchik. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2002.
- [89] Christoph Janiak. Proteinentfernung von kontaktlinsen: Damit der durchblick erhalten bleibt. *Chemie in unserer Zeit*, 35:348–354, 2001.
- [90] Ralph Jimenez, Georgina Salazar, Kim K Baldrige, and Floyd E Romesberg. Flexibility and molecular recognition in the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(1):92–97, Jan 2003.

- [91] Keith A Johnson, Kari Paisley-Flango, Bruce S Tangarone, Thomas J Porter, and Jason C Rouse. Cation exchange-hplc and mass spectrometry reveal c-terminal amidation of an igg1 heavy chain. *Anal Biochem*, 360(1):75–83, Jan 2007.
- [92] W Kabsch and Sander C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12):2477–2637, 1983.
- [93] A Kamyshny, O Toledano, and S Magdassi. Adsorption of hydrophobized igg and gelatin onto phosphatidyl choline-coated silica. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 13(4):187–194, May 15 1999.
- [94] Kazuhiko Kandori, Naoto Horigami, Hisako Kobayashi, Akemi Yasukawa, and Tatsuo Ishikawa. Adsorption of lysozyme onto various synthetic hydroxyapatites. *Journal of Colloid and Interface Science*, 191(2):498–502, 1997.
- [95] Kazuhiko Kandori, Kaori Miyagawa, and Tatsuo Ishikawa. Adsorption of immunoglobulin g onto various synthetic calcium hydroxyapatite particles. *J Colloid Interface Sci*, 273(2):406–413, May 2004.
- [96] W. Kopaciewicz, M. A. Rounds, J. Fausnaugh, and F. E. Regnier. Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. *J Chromatogr A*, 266:3–21, 1983.
- [97] S. Krapp, Y. Mimura, R. Jefferis, R. Huber, and P. Sonderrmann. Structural analysis of human igg-fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol*, 325(5):979–989, Jan 2003.
- [98] C. E. Krohn. Sandstone fractal and euclidean pore volume distributions. *Journal of Geophysical Research-Solid Earth and Planets*, 93(B4):3286–3296, 1988.
- [99] Asif Ladiwala, Fang Xia, Qiong Luo, Curt M Breneman, and Steven M Cramer. Investigation of protein retention and selectivity in hlc systems using quantitative structure retention relationship models. *Biotechnol Bioeng*, 93(5):836–850, Apr 2006.
- [100] S. B. Lamb, D. C. Lamb, S. L. Kelly, and D. C. Stuckey. Cytochrome p450 immobilisation as a route to bioremediation/biocatalysis. *FEBS Lett*, 431(3):343–346, Jul 1998.
- [101] B Lee and FM Richards. Interpretation Of Protein Structures - Estimation Of Static Accessibility. *Journal Of Molecular Biology*, 55(3):379–&, 1971.

- [102] T. Lee. Over-the-counter biosensors: Past, present, and future. *Sensors*, 8:5535–5559, 2008.
- [103] V. Lesins and E. Ruckenstein. Patch controlled attractive electrostatic interactions between similarly charged proteins and adsorbents. *Colloid & Polymer Science*, 266:1187–1190, 1988.
- [104] J. W. Th Lichtenbelt, W. J. M. Heuvelsland, M. E. Oldenzeel, and R. L. J. Zsom. Adsorption and immunoreactivity of proteins on polystyrene and on silica. competition with surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1(2):75–82, 1993.
- [105] M. Elena Lienqueo, Andrea Mahn, and Juan A Asenjo. Mathematical correlations for predicting protein retention times in hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A*, 978(1-2):71–79, Nov 2002.
- [106] F. Y. Lin, W. Y. Chen, and M. T. Hearn. Microcalorimetric studies on the interaction mechanism between proteins and hydrophobic solid surfaces in hydrophobic interaction chromatography: effects of salts, hydrophobicity of the sorbent, and structure of the protein. *Anal Chem*, 73(16):3875–3883, Aug 2001.
- [107] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, and J. Sun. Effect of posttranslational modifications on the thermal stability of a recombinant monoclonal antibody. *Immunology Letters*, 106:144–153, 2006.
- [108] Hongcheng Liu, Georgeen Gaza-Bulseco, Tao Xiang, and Chris Chumsae. Structural effect of deglycosylation and methionine oxidation on a recombinant monoclonal antibody. *Mol Immunol*, 45(3):701–708, Feb 2008.
- [109] Kai-Chee Loh and Daniel I. C. Wang. Characterization of pore size distribution of packing materials used in perfusion chromatography using a network model. *Journal of Chromatography A*, 718:239–255, 1995.
- [110] Yelena Lyubarskaya, Damian Houde, James Woodard, David Murphy, and Rohin Mhatre. Analysis of recombinant monoclonal antibody isoforms by electrospray ionization mass spectrometry as a strategy for streamlining characterization of recombinant monoclonal antibody charge heterogeneity. *Anal Biochem*, 348(1):24–39, Jan 2006.
- [111] Christine Machold, Karin Deinhofer, Rainer Hahn, and Alois Jungbauer. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. i. comparison of selectivity. *J Chromatogr A*, 972(1):3–19, Sep 2002.

- [112] J.D. Madura, M.E. Davis, M.K. Gilson, R.C. Wade, B.A. Luty, and J.A. McCammon. *Biological applications of electrostatic calculations and Brownian Dynamics simulations. Reviews in Computational Chemistry.*, volume 5. K.B. Lipkowitz and D.B. Boyd, VHC Publishers, Inc., New York., 1994.
- [113] A. Mahn, M. E. Lienqueo, and J. A. Asenjo. Effect of surface hydrophobicity distribution on retention of ribonucleases in hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A*, 1043(1):47–55, Jul 2004.
- [114] M. A. Martí-Renom, A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, and A. Sali. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29:291–325, 2000.
- [115] A. D. McLachlan. Rapid comparison of protein structures. *Acta Crystallographica Section A*, 38(6):871–873, Nov 1982.
- [116] W. Melander and C. Horváth. Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. *Arch Biochem Biophys*, 183(1):200–215, Sep 1977.
- [117] Y. Mimura, S. Church, R. Ghirlando, P. R. Ashton, S. Dong, M. Goodall, J. Lund, and R. Jefferis. The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human igg1-fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Mol Immunol*, 37(12-13):697–706, 2000.
- [118] Yusuke Mimura, Peter Sondermann, Rodolfo Ghirlando, John Lund, Stephen P. Young, Margaret Goodall, and Roy Jefferis. Role of oligosaccharide residues of igg1-fc in fcgamma riib binding. *J. Biol. Chem.*, 276(49):45539–45547, 2001.
- [119] K. G. Moorhouse, W. Nashabeh, J. Deveney, N. S. Bjork, M. G. Mulkerrin, and T. Ryskamp. Validation of an hplc method for the analysis of the charge heterogeneity of the recombinant monoclonal antibody idec-c2b8 after papain digestion. *J Pharm Biomed Anal*, 16(4):593–603, Dec 1997.
- [120] E Muller. Properties and characterization of high capacity resins for biochromatography. *Chemical Engineering & Technology*, 28(11):1295–1305, Nov 2005.
- [121] L. O. Narhi and A. J. Fulco. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome p-450 monooxygenase induced by barbiturates in bacillus megaterium. *J Biol Chem*, 261(16):7160–7169, Jun 1986.



- [122] D. C. Nash and H. A. Chase. Comparison of diffusion and diffusion-convection matrices for use in ion-exchange separations of proteins. *Journal of Chromatography A*, 807(2):185–207, 1998.
- [123] S. B. Needleman and C. D. Wunsch. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol*, 48(3):443–453, Mar 1970.
- [124] V. Noinville, C. Vidal-Madjar, and B. Sebille. Modeling of protein adsorption on polymer surfaces. computation of adsorption potential. *J. Phys. Chem*, 99:1516–1522, 1995.
- [125] Willem Norde and Alphonso C. I. Anusiem. Adsorption, desorption and re-adsorption of proteins on solid surfaces. *Colloids and Surfaces*, 66:73–80, 1992.
- [126] MR Oberholzer, NJ Wagner, and AM Lenhoff. Grand canonical brownian dynamics simulation of colloidal adsorption. *Journal of Chemical Physics*, 107(21):9157–9167, Dec 1 1997.
- [127] M. Okubo, Y. Yamamoto, M. Uno, S. Kamei, and T. Matsumoto. Immunoactivity of polymer microspheres with their hydrophilic/hydrophobic heterogeneous surface sensitized with an antibody. *Colloid & Polymer Science*, 265(12):1061–1066, 1987. 10.1007/BF01417463.
- [128] E. A. Padlan. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*, 31(3):169–217, Feb 1994.
- [129] Aurélie Pardo-Jacques, Régine Basseguy, and Alain Bergel. Electroactive cytochrome p450bm3 cast polyion films on graphite electrodes. *Electrochimica Acta*, 52(3):979–987, 2006.
- [130] V. A. Parsegian and D. Gingell. On the electrostatic interaction across a salt solution between two bodies bearing unequal charges. *Biophys J*, 12(9):1192–1204, Sep 1972.
- [131] Chunyang Peng, Philippe Y. Ayala, H. Bernhard Schlegel, and Michael J. Frisch. Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *Journal of Computational Chemistry*, 17(1):49–56, 1996.
- [132] M. Perkins, R. Theiler, S. Lunte, and M. Jeschke. Determination of the origin of charge heterogeneity in a murine monoclonal antibody. *Pharm Res*, 17(9):1110–1117, Sep 2000.

- [133] TW Perkins, DS Mak, TW Root, and EN Lightfoot. Protein retention in hydrophobic interaction chromatography: Modeling variation with buffer ionic strength and column hydrophobicity. *Journal of Chromatography A*, 766(1-2):1–14, Apr 4 1997.
- [134] J. A. Peterson and S. E. Graham. A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes p450. *Structure*, 6(9):1079–1085, Sep 1998.
- [135] Katerina Pomazal, Christian Prohaska, and Ilse Steffan. Hydrophobic interaction chromatographic separation of proteins in human blood fractions hyphenated to atomic spectrometry as detector of essential elements. *J Chromatogr A*, 960(1-2):143–150, Jun 2002.
- [136] R. L. Portsmouth and L. F. Gladden. Determination of pore connectivity by mercury porosimetry. *Chemical Engineering Science*, 46(12):3023–3036, 1991.
- [137] Giuseppina Raffaini and Fabio Ganazzoli. Molecular dynamics simulation of the adsorption of a fibronectin module on a graphite surface. *Langmuir*, 20(8):3371–3378, Apr 2004.
- [138] P Rao, A Williams, A Baldwinferro, E Hanigan, D Kroon, M Makowski, E Meyer, V Numsuwan, E Rubin, and A Tran. C-terminal modification occurs in tissue-culture produced OKT3. *Biopharm-The technology & business of biopharmaceuticals*, 4(10):38–43, Nov-Dec 1991.
- [139] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, and J.E. Lemons. *Biomaterials science*. Academic Press, San Diego, New York, Berkeley, Boston, 1996.
- [140] Vivek P Raut, Madhuri A Agashe, Steven J Stuart, and Robert A Latour. Molecular dynamics simulations of peptide-surface interactions. *Langmuir*, 21(4):1629–1639, Feb 2005.
- [141] S. Ravichandran, J.D. Madura, and J. Talbot. A brownian dynamics study of the initial stages of hen egg-white lysozyme adsorption at a solid interface. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(17):3610–3613, 2001.
- [142] S. Ravichandran and J. Talbot. Mobility of adsorbed proteins: a brownian dynamics study. *Biophys J*, 78(1):110–120, Jan 2000.
- [143] J.L. Robeson and R.D. Tilton. Spontaneous reconfiguration of adsorbed lysozyme layers observed by total internal reflection fluorescence with a ph-sensitive fluorophore. *Langmuir*, 12(25):6104–6113, Dec 11 1996.

- [144] W. Rocchia, E. Alexov, and B. Honig. Extending the applicability of the nonlinear poisson-boltzmann equation: Multiple dielectric constants and multivalent ions. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(28):6507–6514, 2001.
- [145] Martha Rosales-Hernandez, Lowell Kispert, Eduardo Torres-Ramirez, Daniel Ramirez-Rosales, Rafael Zamorano-Ulloa, and Jose Trujillo-Ferrara. Electron paramagnetic resonance analyses of biotransformation reactions with cytochrome p-450 immobilized on mesoporous molecular sieves. *Biotechnology Letters*, 29(6):919–924, June 2007.
- [146] MCR Rosales-Hernandez, JEM Wejebe, JIV Alcantara, RM Ruvalcaba, LAG Serrano, and JT Trujillo-Ferrara. Immobilization of cytochrome p-450 on mcm-41 with different silicon/aluminum ratios. *Microporous and Mesoporous Materials*, 80(1-3):25–31, May 2 2005.
- [147] P. Rosen, I. Pecht, and J. S. Cohen. Monitoring the carbohydrate component of the fc fragment of human igg by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Mol Immunol*, 16(6):435–436, Jun 1979.
- [148] C. M. Roth, J. E. Sader, and A. M. Lenhoff. Electrostatic contribution to the energy and entropy of protein adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science*, 203(1):218–221, 1998.
- [149] Charles M. Roth and Abraham M. Lenhoff. Electrostatic and van der waals contributions to protein adsorption: Comparison of theory and experiment. *Langmuir*, 11(9):3500–3509, 1995.
- [150] CM Roth and AM Lenhoff. Electrostatic and van der waals contributions to protein adsorption: Computation of equilibrium-constants. *Langmuir*, 9(4):962–972, Apr 1993.
- [151] J. C. Russ and R. T. DeHoff. *Practical Stereology*. Kluwer Academic, New York, 2000.
- [152] Jean-Paul Ryckaert, Giovanni Ciccotti, and Herman J. C. Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, 23(3):327–341, 1977.
- [153] W. R. Rypniewski, H. M. Holden, and I. Rayment. Structural consequences of reductive methylation of lysine residues in hen egg white lysozyme: an x-ray analysis at 1.8- $\text{\AA}$  resolution. *Biochemistry*, 32(37):9851–9858, Sep 1993.

- [154] J. Cristian Salgado, Ivan Rapaport, and Juan A Asenjo. Prediction of retention times of proteins in hydrophobic interaction chromatography using only their amino acid composition. *J Chromatogr A*, 1098(1-2):44–54, Dec 2005.
- [155] A. Sali and T. L. Blundell. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, 234(3):779–815, Dec 1993.
- [156] SU Sane, SM Cramer, and TM Przybycien. Protein structure perturbations on chromatographic surfaces. *Journal of Chromatography A*, 849(1):149–159, JUL 16 1999.
- [157] LC Santora, Z Kaymakcalan, P Sakorafas, IS Krull, and K Grant. Characterization of noncovalent complexes of recombinant human monoclonal antibody and antigen using cation exchange, size exclusion chromatography, and BIAcore. *Analytical Biochemistry*, 299(2):119–129, Dec 15 2001.
- [158] LC Santora, IS Krull, and K Grant. Characterization of recombinant human monoclonal tissue necrosis factor-alpha antibody using cation-exchange HPLC and capillary isoelectric focusing. *Analytical Biochemistry*, 275(1):98–108, Nov 1 1999.
- [159] E. O. Saphire, P. W. Parren, R. Pantophlet, M. B. Zwick, G. M. Morris, P. M. Rudd, R. A. Dwek, R. L. Stanfield, D. R. Burton, and I. A. Wilson. Crystal structure of a neutralizing human igg against hiv-1: a template for vaccine design. *Science*, 293(5532):1155–1159, Aug 2001.
- [160] Erica Ollmann Saphire, Robyn L Stanfield, M. D Max Crispin, Paul W H I Parren, Pauline M Rudd, Raymond A Dwek, Dennis R Burton, and Ian A Wilson. Contrasting igg structures reveal extreme asymmetry and flexibility. *J Mol Biol*, 319(1):9–18, May 2002.
- [161] P Schaaf and P Dejaridin. Structural-changes within an adsorbed fibrinogen layer during the adsorption process - a study by scanning angle reflectometry. *Colloids and surfaces*, 31:89–103, May 1988.
- [162] H. Bernhard Schlegel. Optimization of equilibrium geometries and transition structures. *Journal of Computational Chemistry*, 3(2):214–218, 1982.
- [163] H. Schwalbe, S. B. Grimshaw, A. Spencer, M. Buck, J. Boyd, C. M. Dobson, C. Redfield, and L. J. Smith. A refined solution structure of hen lysozyme determined using residual dipolar coupling data. *Protein Science*, 10(4):677–688, 2001.

- [164] U. Schwaneberg, A. Sprauer, C. Schmidt-Dannert, and R. D. Schmid. P450 monooxygenase in biotechnology. i. single-step, large-scale purification method for cytochrome p450 bm-3 by anion-exchange chromatography. *J Chromatogr A*, 848(1-2):149–159, Jul 1999.
- [165] Torsten Schwede, Jürgen Kopp, Nicolas Guex, and Manuel C Peitsch. Swiss-model: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3381–3385, Jul 2003.
- [166] I. F. Sevrioukova, H. Li, H. Zhang, J. A. Peterson, and T. L. Poulos. Structure of a cytochrome p450-redox partner electron-transfer complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5):1863–1868, Mar 1999.
- [167] Jia-Wei Shen, Tao Wu, Qi Wang, and Yu Kang. Induced stepwise conformational change of human serum albumin on carbon nanotube surfaces. *Biomaterials*, 29(28):3847–3855, OCT 2008.
- [168] M. J. Sippl. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins*, 17(4):355–362, Dec 1993.
- [169] D. Sitkoff, D. J. Lockhart, K. A. Sharp, and B. Honig. Calculation of electrostatic effects at the amino terminus of an alpha helix. *Biophys J*, 67(6):2251–2260, Dec 1994.
- [170] GL Skidmore, BJ Horstmann, and HA Chase. Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger s sepharose FF. *Journal of Chromatography*, 498(1):113–128, Jan 5 1990.
- [171] C. Mark Smales and David C. James, editors. *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols*, volume 208 of *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2005.
- [172] TF Smith and MS Waterman. Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol*, 147(1):195–7, 1981.
- [173] John P. Snyder. *Map projections - a working manual*. 1987.
- [174] M. Spencer. Reverse salt gradient chromatography of trna on unsubstituted agarose. iii. physical and chemical properties of different batches of sepharose 4b. *J Chromatogr*, 238(2):317–325, Apr 1982.
- [175] J. Ståhlberg, B. Jönsson, and C. Horváth. Theory for electrostatic interaction chromatography of proteins. *Anal Chem*, 63(17):1867–1874, Sep 1991.

- [176] N Sugihara, Y Ogoma, K Abe, Y Kondo, and T Akaike. Immobilization of cytochrome p-450 and electrochemical control of its activity. *Polymers for Advanced Technologies*, 9(5):307–313, May 1998.
- [177] Yu Sun, William J Welsh, and Robert A Latour. Prediction of the orientations of adsorbed protein using an empirical energy function with implicit solvation. *Langmuir*, 21(12):5616–5626, Jun 2005.
- [178] Khurram M Sunasara, Fang Xia, Robert S Gronke, and Steven M Cramer. Application of hydrophobic interaction displacement chromatography for an industrial protein purification. *Biotechnol Bioeng*, 82(3):330–339, May 2003.
- [179] B. J. Sutton and D. C. Phillips. The three-dimensional structure of the carbohydrate within the fc fragment of immunoglobulin g. *Biochem Soc Trans*, 11 Pt 2:130–132, Apr 1983.
- [180] AmirAli H Talasaz, Mohsen Nemat-Gorgani, Yang Liu, Patrik Ståhl, Robert W Dutton, Mostafa Ronaghi, and Ronald W Davis. Prediction of protein orientation upon immobilization on biological and nonbiological surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(40):14773–14778, Oct 2006.
- [181] N. Tanaka, K. Kimata, K. Hosoya, T. Araki, H. Tsuchiya, and K. Hashizume. Tem study on the pore structures of wide-pore silica and polymer gels. *Hrc-Journal of High Resolution Chromatography*, 14(1):40–47, 1991.
- [182] M. H. Tao and S. L. Morrison. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human igg. role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human igg constant region. *J Immunol*, 143(8):2595–2601, Oct 1989.
- [183] M. Taylor, D. C. Lamb, R. J. Cannell, M. J. Dawson, and S. L. Kelly. Cofactor recycling with immobilized heterologous cytochrome p450 105d1 (cyp105d1). *Biochem Biophys Res Commun*, 279(2):708–711, Dec 2000.
- [184] Richard F. Taylor, editor. *Protein Immobilization : fundamentals and applications*. Dekker, New York, 1991.
- [185] JD Thompson, TJ Gibson, F Plewniak, F Jeanmougin, and DG Higgins. The clustal\_x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25(24):4876–82, 1997.

- [186] Mark A. Thompson. *ArgusLab 4.0.1*. Planaria Software LLC, Seattle, WA.
- [187] P. K. Tsai, M. W. Bruner, J. I. Irwin, C. C. Ip, C. N. Oliver, R. W. Nelson, D. B. Volkin, and C. R. Middaugh. Origin of the isoelectric heterogeneity of monoclonal immunoglobulin h1b4. *Pharm Res*, 10(11):1580–1586, Nov 1993.
- [188] C. D. Tsakiroglou and A. C. Payatakes. Pore-wall roughness as a fractal surface and theoretical simulation of mercury intrusion retraction in porous-media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 159(2):287–301, 1993.
- [189] C. D. Tsakiroglou and A. C. Payatakes. Characterization of the pore structure of reservoir rocks with the aid of serial sectioning analysis, mercury porosimetry and network simulation. *Advances in Water Resources*, 23(7):773–789, 2000.
- [190] E. E. Underwood. *Quantitative Stereology*. Addison-Wesley, Reading, MA, 1970.
- [191] R. van Erp, Y. E. M. Linders, A. P. G. van Sommeren, and T. C. J. Gribnau. Characterization of monoclonal antibodies physically adsorbed onto polystyrene latex particles. *Journal of Immunological Methods*, 152(2):191–199, 1992.
- [192] W. F. van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. H. Hünenberger, P. Krüger, A. E. Mark, and I. G. Scott, W. R. P. and Tironi. *Biomolecular Simulation*. vdf Hochschulverlag AG, ETH Zürich and BIOMOS b.v.: Zürich, Groningen, 1996.
- [193] O. D. Velev, E. W. Kaler, and A. M. Lenhoff. Protein interactions in solution characterized by light and neutron scattering: comparison of lysozyme and chymotrypsinogen. *Biophys J*, 75(6):2682–2697, Dec 1998.
- [194] Arnoldus W. P. Vermeer, Carla E. Giacomelli, and Willem Norde. Adsorption of igg onto hydrophobic teflon. differences between the fab and fc domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1526(1):61–69, 2001.
- [195] Rebecca C Wade, Peter J Winn, Ilme Schlichting, and Sudarko. A survey of active site access channels in cytochromes p450. *J Inorg Biochem*, 98(7):1175–1182, Jul 2004.
- [196] D. Wang, W. Bode, and R. Huber. Bovine chymotrypsinogen a x-ray crystal structure analysis and refinement of a new crystal form at 1.8 a resolution. *J Mol Biol*, 185(3):595–624, Oct 1985.

- [197] Jiawei Wang, Mirosława Dauter, Randy Alkire, Andrzej Joachimiak, and Zbigniew Dauter. Triclinic lysozyme at 0.65 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 63(Pt 12):1254–1268, Dec 2007.
- [198] Junmei Wang, Piotr Cieplak, and Peter A. Kollman. How well does a restrained electrostatic potential (resp) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *Journal of Computational Chemistry*, 21(12):1049–1074, 2000.
- [199] LE Weaver and G Carta. Protein adsorption on cation exchangers: Comparison of macroporous and gel-composite media. *Biotechnology Progress*, 12(3):342–355, May-Jun 1996.
- [200] Evelyne Weber, Demet Sirim, Tino Schreiber, Bejoy Thomas, Jürgen Pleiss, Michael Hunger, Roger Gläser, and Vlada B. Urlacher. Immobilization of p450 bm-3 on mesoporous molecular sieves. *Biotechnology Journal* - unpublished.
- [201] Yinmao Wei, Yan Yan, Jianguo Zhao, Xindu Geng, and Ruixian Liu. Temperature effects in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29:439–449, 2006.
- [202] M. Weitzhandler, D. Farnan, J. S. Rohrer, and N. Avdalovic. Protein variant separations using cation exchange chromatography on grafted, polymeric stationary phases. *Proteomics*, 1(2):179–185, Feb 2001.
- [203] L. P. Wen, R. T. Ruettinger, and A. J. Fulco. Requirement for a 1-kilobase 5'-flanking sequence for barbiturate-inducible expression of the cytochrome p-450bm-3 gene in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem*, 264(19):10996–11003, Jul 1989.
- [204] D. Werck-Reichhart and R. Feyereisen. Cytochromes p450: a success story. *Genome Biol*, 1(6):Reviews3003, 2000.
- [205] I. A. Wilson and R. L. Stanfield. Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol*, 4(6):857–867, Dec 1994.
- [206] K. P. Wilson, B. A. Malcolm, and B. W. Matthews. Structural and thermodynamic analysis of compensating mutations within the core of chicken egg-white lysozyme. *Journal of Biological Chemistry*, 267(15):10842–10849, 1992.



- [207] Erich Wintermantel and Suk-Woo Ha. *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*. 3. Springer.
- [208] Robert J. Woods, Raymond A. Dwek, Christopher J. Edge, and Bert Fraser-Reid. Molecular mechanical and molecular dynamic simulations of glycoproteins and oligosaccharides. 1. glycam\_93 parameter development. *J. Phys. Chem*, 99:3832–3846, 1995.
- [209] Fang Xia, Deepak Nagrath, and Steven M Cramer. Modeling of adsorption in hydrophobic interaction chromatography systems using a preferential interaction quadratic isotherm. *J Chromatogr A*, 989(1):47–54, Mar 2003.
- [210] Fang Xia, Deepak Nagrath, and Steven M Cramer. Effect of ph changes on water release values in hydrophobic interaction chromatographic systems. *J Chromatogr A*, 1079(1-2):229–235, Jun 2005.
- [211] Fang Xia, Deepak Nagrath, Shekhar Garde, and Steven M Cramer. Evaluation of selectivity changes in hic systems using a preferential interaction based analysis. *Biotechnol Bioeng*, 87(3):354–363, Aug 2004.
- [212] Y. Yao and A. M. Lenhoff. Electrostatic contributions to protein retention in ion-exchange chromatography. 1. cytochrome c variants. *Anal Chem*, 76(22):6743–52, 2004.
- [213] Yan Yao, Kirk J Czymmek, Rajesh Pazhianur, and Abraham M Lenhoff. Three-dimensional pore structure of chromatographic adsorbents from electron tomography. *Langmuir*, 22(26):11148–11157, Dec 2006.
- [214] Yan Yao and Abraham M Lenhoff. Electrostatic contributions to protein retention in ion-exchange chromatography. 2. proteins with various degrees of structural differences. *Anal Chem*, 77(7):2157–2165, Apr 2005.
- [215] B. J. Yoon and A. M. Lenhoff. Computation of the electrostatic interaction energy between a protein and a charged surface. *Journal of Physical Chemistry*, 96(7):3130–3134, 1992.
- [216] Wei Zhang and Marta J Czupryn. Analysis of isoaspartate in a recombinant monoclonal antibody and its charge isoforms. *J Pharm Biomed Anal*, 30(5):1479–1490, Jan 2003.