



# **Extraktion pharmazeutisch einsetzbarer Plasmid-DNA und Integration in einen skalierbaren Aufarbeitungsprozess**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften Dr. rer. nat.  
an der Technischen Fakultät  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
**Dipl.-Ing. Nadine Streitner**

August 2008

## ***Inhaltsverzeichnis***

<b>1</b>	<b><i>Einleitung und Zielsetzung</i></b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>Theoretischer Hintergrund</i></b>	<b>3</b>
2.1	<i>Plasmide</i>	3
2.1.1	<i>Isoformen von Plasmiden</i>	3
2.1.2	<i>Analyse von Plasmid-DNA mittels Agarosegelelektrophorese</i>	4
2.1.3	<i>Analyse von Plasmid-DNA mittels Kapillargelelektrophorese</i>	6
2.2	<b><i>Gentherapie und genetische Impfung</i></b>	<b>7</b>
2.2.1	<i>Gentransfer und Vektoren</i>	9
2.3	<b><i>Aufarbeitung von Plasmid-DNA</i></b>	<b>11</b>
2.3.1	<i>Qualitätsparameter und Richtlinien</i>	11
2.3.2	<i>Verfahrensoptionen für die Aufarbeitung von Plasmid-DNA</i>	12
2.3.3	<i>Zellaufschluss</i>	13
2.3.4	<i>Einsatz rekombinanter RNase</i>	15
2.3.5	<i>Chromatographische Aufarbeitung</i>	15
2.3.6	<i>Affinitätsverfahren</i>	18
2.3.7	<i>Präzipitation</i>	19
2.4	<b><i>Extraktionsverfahren</i></b>	<b>19</b>
2.4.1	<i>Grundlagen der Extraktion</i>	19
2.4.2	<i>Wässrige Zweiphasensysteme</i>	21
2.4.3	<i>Extraktionssysteme unter Verwendung von Tensiden</i>	26
2.4.3.1	<i>Tenside</i>	26
2.4.3.2	<i>Mikroemulsionen</i>	32
2.4.3.3	<i>Extraktion von Biomolekülen mittels inversmizellarer Zweiphasensysteme</i>	37

---

<b>3</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>45</b>
3.1	<i>Bakterienstämme und Plasmide</i>	45
3.2	<i>Kultivierungsbedingungen</i>	45
3.3	<i>Alkalische Lyse</i>	46
3.4	<i>Aufarbeitung der Nukleinsäuren für den Einsatz als Modellsubstanzen</i>	49
3.5	<i>Diafiltration</i>	50
3.6	<i>Inversmizellare Extraktion</i>	51
3.7	<i>Chromatographische Verfahren</i>	52
3.7.1	<i>Anionenaustauschchromatographie mit Fractogel DEAE</i>	52
3.7.2	<i>Plasmidformentrennung mittels Plasmid Select</i>	52
3.8	<i>Analytik</i>	53
3.8.1	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	53
3.8.2	<i>Kapillargelelektrophorese</i>	53
3.8.3	<i>Bestimmung der Plasmidkonzentration</i>	54
3.8.4	<i>BCA-Test</i>	55
3.8.5	<i>Quantifizierung chromosomaler DNA mittels Q-PCR</i>	55
3.8.6	<i>Endotoxinbestimmung mittels LAL-Test</i>	56
3.8.7	<i>Tensidnachweis</i>	56
<b>4</b>	<b><i>Ergebnisse und Diskussion</i></b>	<b>58</b>
4.1	<i>Einflussfaktoren bei der Extraktion von Nukleinsäuren</i>	58
4.1.1	<i>Einfluss verschiedener Salze und Salzkonzentrationen auf das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren</i>	58
4.1.2	<i>Einfluss des Alkohols auf das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren während der Hinextraktion</i>	66
4.1.3	<i>Extraktionen mit Dialkyldimethylammoniumhalogeniden als kationische Tenside</i>	68

---

<b>4.2</b>	<b><i>Bestimmung der Kapazität der organischen Phase unter Verwendung aufgereinigter Plasmid-DNA</i></b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b><i>Extraktion aus bakteriellem Klarlysat</i></b>	<b>73</b>
<b>4.4</b>	<b><i>Bestimmung der Kapazität der organischen Phase unter Verwendung von bakteriellem Klarlysat</i></b>	<b>75</b>
<b>4.5</b>	<b><i>Trennung der Plasmidisformen bei Extraktionen mit Modellsubstanzen und der Extraktion aus Klarlysat</i></b>	<b>76</b>
<b>4.6</b>	<b><i>Extraktionen mit unterschiedlichen Plasmiden</i></b>	<b>81</b>
<b>4.7</b>	<b><i>Rückextraktion</i></b>	<b>82</b>
4.7.1	<i>Einfluss der Anionenkonzentration</i>	82
4.7.2	<i>Einfluss der Kettenlänge des Alkohols und der Alkoholkonzentration</i>	83
4.7.3	<i>Einflussfaktoren auf die Wiederfindung der RNA nach Rückextraktion</i>	86
4.7.4	<i>Einfluss von SDS auf die Abreicherung der RNA während der Extraktion</i>	86
4.7.5	<i>Einfluss des Alkohols bei der Hinextraktion auf das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren bei der Rückextraktion</i>	89
4.7.6	<i>Einfluss der Anionenkonzentration bei der Hinextraktion auf den Transfer der RNA</i>	93
4.7.7	<i>Einfluss der Phasentrennung nach der Extraktion</i>	95
4.7.8	<i>Einfluss der Lysatkonzentration auf den Transfer der RNA</i>	97
<b>4.8</b>	<b><i>Abreicherung von Verunreinigungen während der Extraktion</i></b>	<b>100</b>
4.8.1	<i>Chromosomale DNA</i>	100
4.8.1.1	<i>Einfluss verschiedener Lysebedingungen auf die Konzentration der chromosomalen DNA im Lysat</i>	101
4.8.1.2	<i>Möglichkeit zur Abreicherung chromosomaler DNA durch Extraktion</i>	105
4.8.2	<i>Proteine</i>	107
4.8.3	<i>Endotoxine</i>	108

---

<b>4.9</b>	<b><i>Integration des Extraktionsverfahrens in verschiedene Aufarbeitungsprozesse</i></b>	<b>111</b>
4.9.1	<i>Extraktion aus verdünntem Klarlysat mit anschließender Aufarbeitung mittels Anionenaustauschchromatographie</i>	111
4.9.2	<i>Rückextraktion mit Ammoniumsulfat und anschließende Aufarbeitung mit Plasmid Select</i>	113
<b>4.10</b>	<b><i>Beurteilung des Extraktionsprozesses hinsichtlich der Qualitätsanforderungen für die Produktion von Plasmid-DNA</i></b>	<b>115</b>
<b>4.11</b>	<b><i>Extraktion im 4 L-Maßstab</i></b>	<b>116</b>
<b>4.12</b>	<b><i>Vergleich von Extraktionssystemen zur Aufreinigung von Plasmid-DNA</i></b>	<b>119</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung und Ausblick</i></b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b><i>Literatur</i></b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>138</b>
7.1	<i>Abkürzungen</i>	138
7.2	<i>Symbole</i>	139
7.3	<i>Chemikalien</i>	140
7.4	<i>Chromatographiematerialien</i>	141
7.5	<i>Primer</i>	141
7.6	<i>Verwendete Kit-Systeme</i>	141
7.7	<i>Geräte</i>	141
7.8	<i>Software</i>	142
<b>8</b>	<b><i>Curriculum Vitae</i></b>	<b>143</b>
<b>9</b>	<b><i>Schriftenverzeichnis</i></b>	<b>144</b>

## *Danksagung*

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Erwin Flaschel danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seine ständige Gesprächsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Carsten Voß für seine fachliche Unterstützung, die freundliche Zusammenarbeit und die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Kirsten Tschapalda möchte ich mich für ihren unermüdlichen Einsatz im Labor und die akkurate Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fermentationstechnik für das gute Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit. Herrn Dipl.-Ing. Thomas Schäffer und Herrn Horst Nosseler danke ich für die hervorragende technische Unterstützung während der Arbeit. Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Lothar Fallak für alle kleineren und größeren Reparaturen.

Außerdem gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern und meiner Schwester Corinna, die mir durch ihre tatkräftige Unterstützung das Studium und die Promotion ermöglicht haben.

## ***1 Einleitung und Zielsetzung***

Die fortschreitende Entwicklung in der Gentherapie führt zu einem immer höheren Bedarf an therapeutisch einsetzbarer Plasmid DNA (pDNA). Zunächst war das Hauptziel der Gentherapie die Behandlung monogenetischer Erkrankungen und Infektionskrankheiten, bis Herz-Kreislauf-Erkrankungen und vor allem Krebs in den Fokus der Forschung rückten. Plasmid-DNA ist als nicht-viraler Vektor für den Transfer therapeutischer Gene geeignet und ist vor allem auch auf dem Gebiet der genetischen Impfung von Interesse. Gegenüber herkömmlichen Vakzinen bietet Plasmid-DNA den Vorteil, dass der Erreger nicht direkt in den Körper gelangt, sondern lediglich die genetische Information eines Antigens, deren Expression im Körper eine zelluläre oder humorale Immunantwort auslöst. Plasmide kommen in Bakterienzellen und anderen Mikroorganismen vor. Die Replikation findet unabhängig von der Wirts-DNA statt. Die kodierten Gene bieten beispielsweise durch Antibiotikaresistenz einen Selektionsvorteil für den Wirtsorganismus. Modifizierte Plasmide sind als Klonierungsvektoren für die molekulare Biologie und Biotechnologie von Bedeutung.

Um Plasmid-DNA in ausreichenden Mengen herstellen zu können, sind effiziente und gut skalierbare Prozesse notwendig. Für den Einsatz im gentherapeutischen Bereich werden hohe Qualitätsanforderungen gestellt. Diesbezüglich müssen die Anforderungen regulatorischer Behörden (Food and Drug Administration, FDA/ European Medicines Agency, EMA) eingehalten werden. Verfahren zur Herstellung von Plasmid-DNA bestehen aus der Kultivierung der plasmidreplizierenden Bakterien, einem Zellaufschluss zur Freisetzung der Plasmide und im Anschluss daran geeigneten Aufarbeitungsprozessen. Die bioverfahrenstechnische Herausforderung besteht in der Abtrennung der superspiralisierten Plasmid-DNA von strukturell ähnlichen Verunreinigungen wie RNA, chromosomaler DNA (chrDNA) und Lipopolysacchariden (LPS). In der Regel werden zur Aufreinigung von Plasmid-DNA chromatographische Verfahren eingesetzt. Die meisten dieser Methoden sind zeitaufwändig, mit hohen Produktverlusten verbunden oder es bestehen Schwierigkeiten in der Maßstabsvergrößerung. Eine Alternative stellen Extraktionsprozesse dar, da diese gut skalierbar sind und lediglich einfache und kostengünstige Chemikalien und Geräte benötigt werden. Es können sowohl

wässrige als auch inversmizellare Zweiphasensystemen zur Aufarbeitung von Plasmid-DNA eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung von Nukleinsäuren in einem inversmizellaren Zweiphasensystem untersucht. Es wurde der Einfluss verschiedener Salze und Salzkonzentrationen sowie die Auswirkung unterschiedlicher Alkohole auf das Extraktionssystem betrachtet. Im Fokus der Untersuchungen stand die Trennleistung des Systems. Darüber hinaus wurde die Kapazität und die Möglichkeit zur Trennung verschiedener Plasmidformen geprüft. Die Ergebnisse konnten erfolgreich eingesetzt werden, um RNA, Proteine, chromosomale DNA und Endotoxine während der Extraktion der Plasmid-DNA aus einem konditionierten bakteriellen Klarlysat abzureichern.

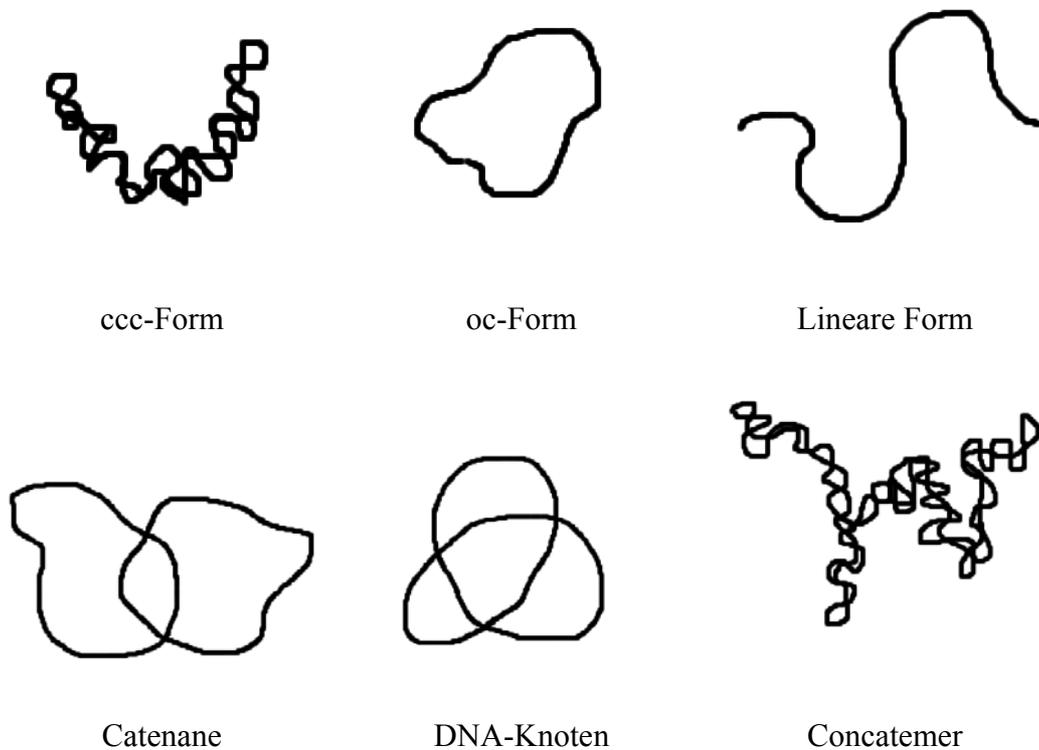
## ***2 Theoretischer Hintergrund***

### ***2.1 Plasmide***

Plasmide sind kleine, in der Regel zirkuläre, doppelsträngige, autonom replizierende DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen vorkommen. Sie zählen nicht zum Kernäquivalent, liegen also extrachromosomal vor. Plasmide können Größen zwischen 1 kb und 400 kb aufweisen. Die Gene, die auf dem Plasmid kodiert sind, sind nicht für das Überleben der Wirtszelle notwendig, wenn keine selektiven Bedingungen vorherrschen, jedoch stellen sie häufig einen Überlebensvorteil dar. Diese Gene können beispielsweise eine Antibiotika-Resistenz vermitteln oder Proteine kodieren, die unübliche Substrate abbauen können, woraus ein Selektionsvorteil für das Wirtsbakterium resultiert. Plasmide können in einer Zelle in unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen. Je nach Replikationsmechanismus und Replikationsursprung unterscheidet man zwischen *low copy* (bis zu 20 Kopien pro Zelle) und *high copy* (20-1000 Kopien pro Zelle) Plasmiden. In der Gentechnik spielen Plasmide als Transportvehikel für rekombinante DNA eine wichtige Rolle.

#### ***2.1.1 Isoformen von Plasmiden***

Plasmide haben eine ringförmige Doppelhelixstruktur. Aufgrund dieser Struktur können verschiedenen topologische Formen ausgebildet werden, die in Abbildung 1 dargestellt sind. Üblicherweise liegt die Plasmid-DNA innerhalb der Zelle in negativer superspiralierter Form vor. Diese Form wird auch als ccc-Form (*covalently closed circular*) bezeichnet. Superspiralisierte Plasmide haben eine kompakte Struktur. Ein Einzelstrangbruch, der durch Nukleasen oder mechanische Einwirkung hervorgerufen wird, führt zur Ausbildung einer offen zirkulären Form (oc-Form). Die lineare Form der Plasmid-DNA entsteht durch einen Doppelstrangbruch, der beispielsweise durch Restriktionsendonukleasen verursacht wird. Zusätzlich zu den bisher genannten Isoformen können größere DNA-Moleküle mit mehreren identischen DNA-Abschnitten nacheinander entstehen. Diese werden als Concatemere bezeichnet und entstehen durch fehlerhafte Replikation oder durch homologe Rekombination (Summers, 1996).



**Abbildung 1** Isoformen von Plasmiden

Außerdem können Plasmide auch ineinander greifen. Diese ineinander verwundenen jedoch nicht kovalent miteinander verbundenen Plasmide werden als Catenane (Kreuzer und Cozzarelli, 1980) oder Concatenane (Martin, 1996) bezeichnet. Catenane können während der Plasmidreplikation entstehen. DNA-Knoten sind einzelne Moleküle, die durch einen Doppelstrangbruch mit Windung der DNA um sich selbst und anschließender Ligation entstehen (Kusano *et al.*, 1989). Die Analyse der Plasmidformen kann mittels Agarosegelelektrophorese (AGE) oder Kapillargelelektrophorese (CGE) erfolgen.

### **2.1.2 Analyse von Plasmid-DNA mittels Agarosegelelektrophorese**

Die relative Menge der Plasmid-Isoformen kann durch Agarosegelelektrophorese bestimmt werden, da die Migrationsgeschwindigkeit von der Form der Nukleinsäuren abhängt. Somit wandert die kompakte ccc-Form am schnellsten. Die elektrophoretische Mobilität der linearen Plasmide und der oc-Formen hängen jedoch zusätzlich von den

Elektrophoresebedingungen wie Gelkonzentration, elektrischer Feldstärke, Temperatur, Ionenstärke des Puffers und der Färbung des Gels ab. Da die direkte Zuordnung von Banden im Agarosegel zu den Plasmidstrukturen nicht möglich ist, müssen unbehandelte, linearisierte und UV-behandelte Proben parallel analysiert werden (Schmidt *et al.*, 1999). Abbildung 2 zeigt die Analyse des Plasmids pUC19 (2,7 kb) mittels Agarosegelelektrophorese. In Spur 2 (Abbildung 2A) wurde die unbehandelte Probe aufgetragen. Es wird angenommen, dass es sich dabei bei der stärkeren Bande um die ccc-Form handelt und die zweitstärkste Bande der oc-Form zugeordnet werden könnte. Dies trifft jedoch in diesem Fall nicht zu. Eine UV-behandelte Probe, die daraus resultierend oc-Monomer und oc-Dimer enthält, wurde in Spur 4 (Abbildung 2A) aufgetragen. Somit ist die obere Bande in Spur 2 (Abbildung 2A) keine oc-Form, sondern ein ccc-Dimer. Eine komplett verdaute Probe, die dadurch nur lineare Monomere enthält, ist in Spur 3 (Abbildung 2A) und Spur 1 (Abbildung 2B) aufgetragen. Wird die Reaktionsdauer und/oder die Restriktionsaktivität verringert, so werden durch den unvollständigen Verdau weitere Banden sichtbar. Neben ccc-Monomer und linearem Monomer ist auch das lineare Dimer in den Spuren 2 und 3 (Abbildung 2B) zu erkennen. Die Plasmidformen haben also im Agarosegel die folgende Reihenfolge mit abnehmender Wanderungsgeschwindigkeit:

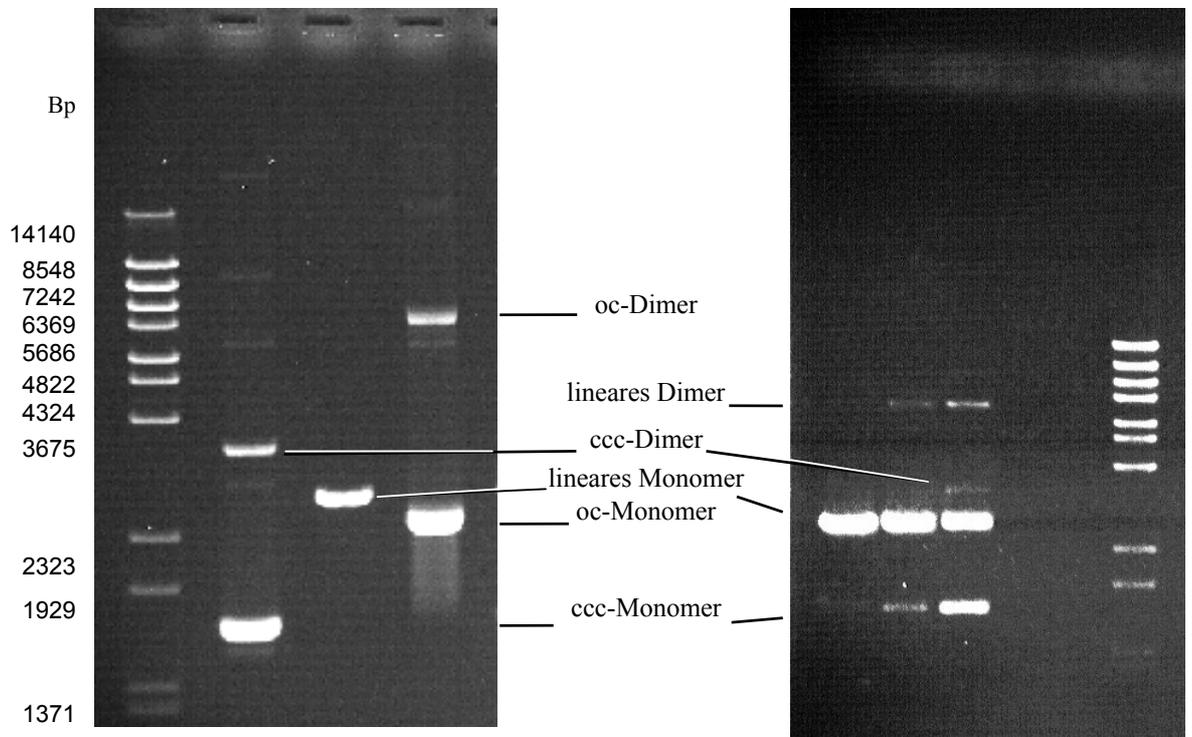
ccc-Monomer > oc-Monomer > lineares Monomer > ccc-Dimer > lineares Dimer > oc-Dimer.

Bei der Auftrennung der Plasmidformen von pCMV-S2S-DNA wurde ein unterschiedliches Wanderungsverhalten des linearen Monomers und oc-Monomers beobachtet. Es wurde folgende Reihenfolge für pCMV-S2S-DNA erhalten:

ccc-Monomer > lineares Monomer > oc-Monomer > ccc-Dimer > lineares Dimer > oc-Dimer.

Dieses unterschiedliche Verhalten ist auf die Konzentrationen der Agarose und auf die Zugabe von Ethidiumbromid vor bzw. nach der Elektrophorese zurückzuführen. Außer-

dem spielte die unterschiedliche Plasmidgröße eine Rolle. Die Reihenfolge der Wanderung ist daher nicht ohne weiteres zu verallgemeinern.

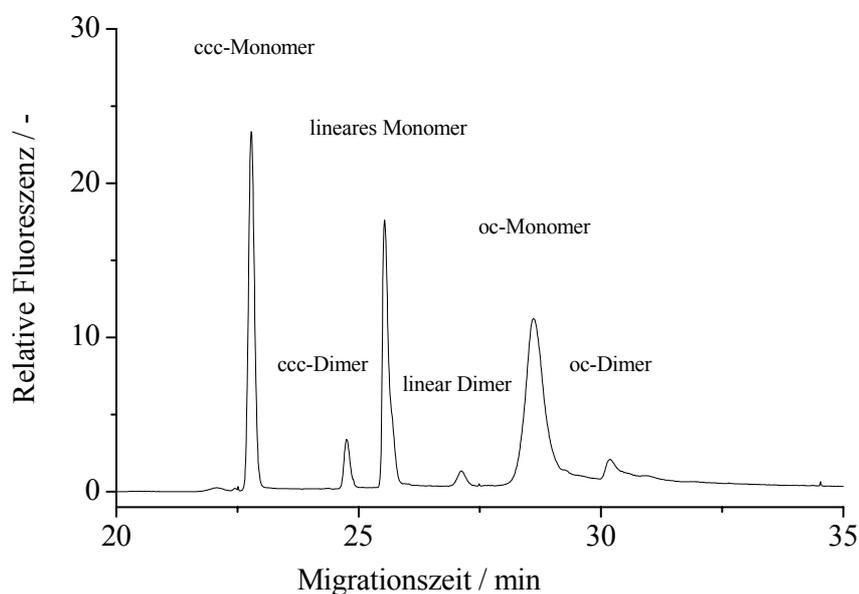


**Abbildung 2** Auftrennung unterschiedlich behandelte pUC19-Proben durch Agarosegelelektrophorese (Schmidt, 1998).

### 2.1.3 Analyse von Plasmid-DNA mittels Kapillargelelektrophorese

Die Kapillargelelektrophorese liefert im Gegensatz zu Agarosegelelektrophorese wesentlich genauere Ergebnisse bezüglich der Analyse der Plasmidformen. Die Trennung der DNA-Moleküle in der Kapillare basiert auf der unterschiedlichen Größe und Struktur der Plasmid-DNA. Erstmals wurde die Trennung aller Plasmidstrukturen, die in der bakteriellen Plasmidaufarbeitung beobachtet werden, von Schmidt *et al.* (1999) beschrieben. Abbildung 3 zeigt das Elektropherogramm unterschiedlich behandelte pUC19 Plasmid-DNA analog der in Abbildung 2 dargestellten Strukturen. Alle Plasmidisoformentypen konnten unter Verwendung einer Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)-Lösung, die als Gelmatrix in der Kapillare verwendet wurde, getrennt werden und mit Hilfe eines LIF (Laser induzierte Fluoreszenz)-Detektors analysiert werden. Die Reihenfolge der Migration der unterschiedlichen Plasmidformen bei CGE weicht von denen im Rahmen der Agarosegelelektrophorese beschriebenen ab. Am schnellsten wan-

dem ccc-Monomer und ccc-Dimer, gefolgt von linearem Monomer und Dimer. Die oc-Formen haben die längste Verweilzeit. Die Reihenfolge der Plasmidformen im Elektropherogramm ist von der Größe des Plasmids unabhängig. Die Identifizierung der Plasmidformen im Elektropherogramm ist somit wesentlich einfacher als im Agarosegel. Für größere Plasmide sinkt jedoch die Auflösung zwischen oc-Monomer und oc-Dimer, wodurch nur noch ein Signal für beide Formen erhalten wird. Im Vergleich zur AGE bietet CGE eine hohe Auflösung und Sensitivität. Außerdem reicht schon eine geringe DNA-Menge zur Analyse aus.

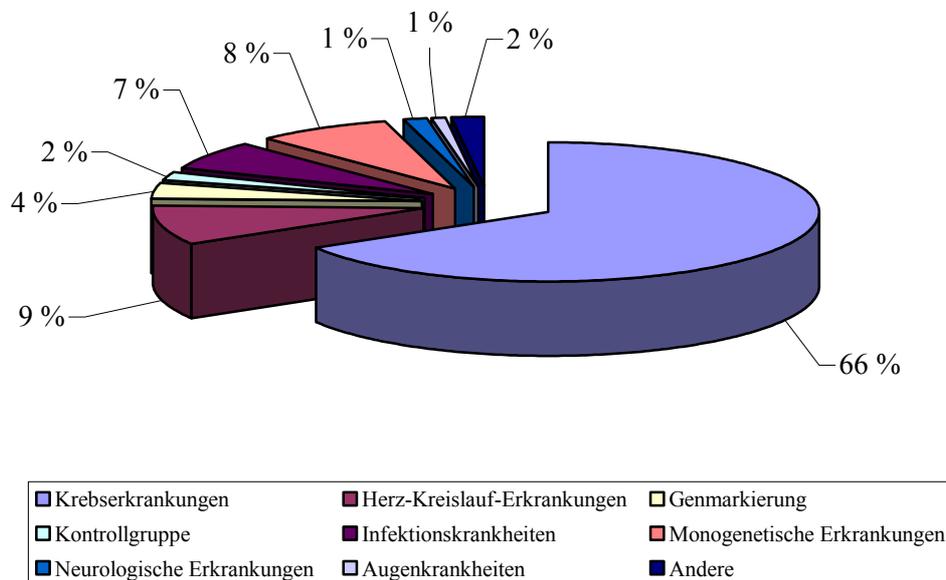


**Abbildung 3** CGE Elektropherogramm einer Mischung unbehandelter, linearisierter und UV-behandelter pUC19 Plasmid-DNA (Schmidt, 1998).

## 2.2 Gentherapie und genetische Impfung

Im Rahmen der Gentherapie werden Nukleinsäuren in Zellen eingebracht. Es kann zwischen einem Gentransfer an Keimzellen und somatischen Zellen unterschieden werden. In Deutschland ist jedoch der Keimbahngentransfer durch das Embryonenschutzgesetz verboten. Bei der somatischen Gentherapie werden Körperzellen behandelt. Hierbei kodiert das therapeutische Gen ein im Organismus benötigtes Protein. Rosenberg *et al.* (1990) führten 1989 die erste klinische Gentherapie durch. Dabei wurde ein Retrovirus,

der für ein Neomycin-Markergen kodierte, zur Transduktion tumorinfiltrierender Lymphozyten eingesetzt. Anfang der 1990er Jahre wurden dann die ersten Gentherapiestudien an Kindern, die an dem Adenosindeaminase-Immundefektsyndrom (ADA-SCID) litten, durchgeführt (Blaese *et al.*, 1995; Muul *et al.*, 2003). Bald darauf rückten auch Krebserkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den Fokus der Gentherapie. Mittlerweile beschäftigen sich 66 % der zur Zeit 1347 klinischen Studien mit der Krebstherapie (Edelstein *et al.*, 2004; Prud'homme, 2005), und lediglich 8 % der Studien sind auf monogenetische Erkrankungen ausgerichtet wie in Abbildung 4 dargestellt ist. Weitere 9 % der Studien werden zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen und 7 % zu Infektionskrankheiten durchgeführt.



**Abbildung 4** Anwendungsbereiche der Gentherapie 2008 (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>).

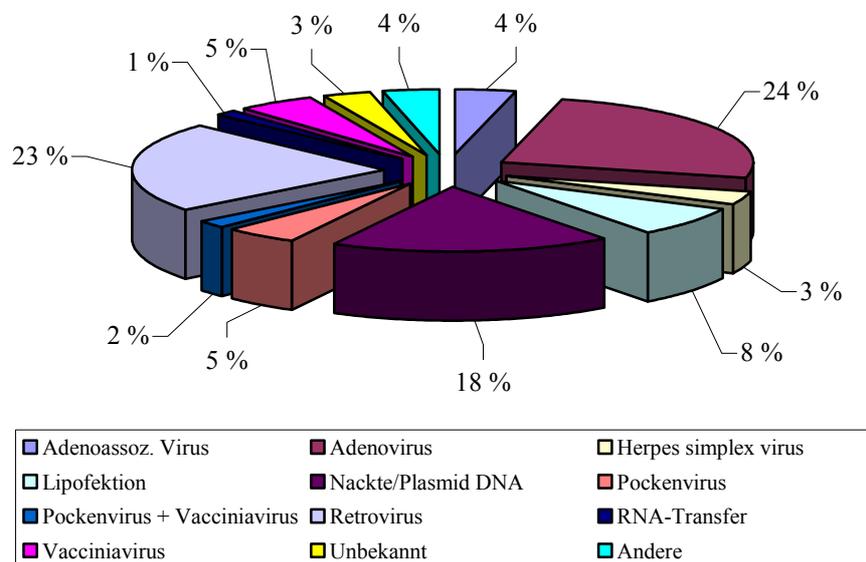
Bei der DNA-Vakzinierung soll die Expression eines immunogenen Antigens im Zielgewebe erreicht werden und zu einer Verbesserung der Immunantwort führen. Erstmals wurde dieses Prinzip von Wolff *et al.* (1990) am Beispiel der Expression eines Reporterproteins nach der Injektion von Plasmid-DNA in einen Mausmuskel beschrieben. Vorwiegend stellen die problematischen Infektionen wie HIV, Ebola- (Nabel, 2003), Dengue-Virus (Costa *et al.*, 2006), Hepatitis C (Duenas-Carrera *et al.*, 2004) oder SARS (Kong *et al.*, 2005; See *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005) große Herausforderungen auf

diesem Gebiet dar. Mittlerweile haben in China erste humantherapeutische Medikamente eine Zulassung erlangt (Jia, 2006). Im veterinärmedizinischen Bereich wurde eine erste Zulassung für die Behandlung des West-Nil-Virus erteilt (Powell, 2004). In den kommenden Jahren ist mit weiteren Anwendungsfeldern im gentherapeutischen Bereich zu rechnen, wodurch der Bedarf an klinisch einsetzbaren Vektorsystemen steigen wird.

### 2.2.1 Gentransfer und Vektoren

Der Gentransfer kann entweder *in vivo* oder *ex vivo* stattfinden. Bei der *in vivo* Methode werden die Gene direkt durch Injektion, Elektroporation oder indirekt mittels liposomaler oder viraler Vektoren in die Körperzelle transferiert. Findet der Gentransfer *ex vivo* statt, werden Körperzellen entnommen und der Gentransfer *in vitro* durchgeführt. Anschließend werden die transformierten Zellen dem Körper wieder zugeführt.

Grundsätzlich kann beim Gentransfer zwischen nicht-viralen und viralen Vektoren unterschieden werden. Wie in Abbildung 5 gezeigt, werden im Rahmen der meisten klinischen Studien virale Vektorsysteme eingesetzt. Lediglich 18 % der Studien verwenden Plasmid-DNA als nicht-viralen Vektor.



**Abbildung 5** Vektorsysteme in gentherapeutischen klinischen Studien 2008 (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>).

### Nicht-virale Vektoren

Die Verwendung nicht-viraler Vektoren führt zur transienten Expression des kodierten Genprodukts. Die Übertragung des therapeutischen Gens findet in Form von nackter DNA durch direkte Injektion, Ultraschallbehandlung (transiente Ruptur der Zellmembranen) oder durch Elektroporation statt. DNA weist im Gegensatz zu Viren keine Spezifität für bestimmte Zellen auf. Somit ist eine gezielte molekulare Lokalisation schwierig. Der größte Nachteil dieser Transfermethode ist die geringe Effizienz, die jedoch durch die Verwendung von Liganden gesteigert werden kann. Eine bessere Aufnahmefähigkeit kann durch Lipoplexe oder molekulare Konjugate erreicht werden, die zur Komprimierung der DNA führen, und diese somit leichter aufnahmefähig machen (Chen und Huang, 2005). Diese Polyplexe beispielsweise aus Polyethylenimin und DNA können auch systemisch verabreicht werden (Erbacher *et al.*, 2004). Durch spezifische Liganden wie Transferrin oder epidermalem Wachstumsfaktor kann ein selektives Targeting an Zielzellen ermöglicht werden (Kloeckner *et al.*, 2004). Durch Verfahren des Vektor-Targetings und Techniken wie Elektroporation und hydrodynamische Injektion wurde eine verbesserte Verteilung im Zielorgan erreicht (Wolff und Budker, 2005). Für den Transport von DNA in Säugerzellen konnten auch apathogene Stämme von Salmonellen, Shigellen, Listerien, Yersinien und *E. coli* als Vektoren eingesetzt werden.

Plasmid-DNA ist zudem ein interessanter Vektor für die genetische Impfung nicht nur im humanmedizinischen sondern auch im veterinärmedizinischen Bereich, da hier die Möglichkeit besteht, große Populationen mit verschiedenen Antigenen in einer Formulierung zu behandeln. Nicht-virale Vektoren wie Plasmid-DNA können im Vergleich zu viralen Vektoren leichter hergestellt werden und bergen keinerlei Sicherheitsrisiken (Mountain, 2000).

### Virale Vektoren

Im Rahmen der Gentherapie werden replikationsdefiziente Viren eingesetzt, um eine weitere Vermehrung im Wirt auszuschließen. Der Vorteil viraler im Vergleich zu nicht-viralen Systemen liegt in der höheren Effizienz und der Spezifität für bestimmte Zellen. Auf der anderen Seite ist die Produktion der viralen Vektoren schwierig, und die Anwendung ist mit Risiken verbunden. Die Immunität gegen einen Virus kann somit nicht

nur zu einer erfolglosen Behandlung führen, sondern es können darüber hinaus immunologische Schockreaktionen ausgelöst werden wie im Fall von Jesse Gelsinger (Stolberg, 1999). Ebenso stellt die Integration der viralen genetischen Information ein weiteres Sicherheitsrisiko dar, da hierdurch Onkogene aktiviert werden können, die zu krebsähnlichen Symptomen führen (Check, 2002).

### **2.3 Aufarbeitung von Plasmid-DNA**

Die Produktion von Plasmid-DNA für pharmazeutische Zwecke besteht generell aus drei Schritten. Zunächst findet die Kultivierung des Plasmid replizierenden Wirtsorganismus statt. Danach werden die Zellen aufgeschlossen, um die Plasmid-DNA freizusetzen, und anschließend wird diese mit Hilfe chromatographischer oder extraktiver Verfahren aufgearbeitet. Während der Kultivierung ist eine hohe Plasmidreplikation wünschenswert. Mit Hilfe geeigneter Kultivierungsverfahren können Plasmidkonzentrationen zwischen  $25 \text{ mg L}^{-1}$  und  $250 \text{ mg L}^{-1}$  erzielt werden (Schmidt, 1998; Voss *et al.*, 2003; 2004). In Ausnahmefällen wurden sogar schon Konzentrationen von  $1 \text{ g L}^{-1}$  erzeugt (Carnes *et al.*, 2006).

#### **2.3.1 Qualitätsparameter und Richtlinien**

Um eine sichere und effektive Anwendung zu garantieren, werden an pharmazeutisch einsetzbare Plasmid-DNA hohe Qualitätsanforderungen gestellt. Gemeinhin akzeptierte Qualitätsparameter und die dazugehörigen Analyseverfahren sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Neben den in Tabelle 1 genannten Qualitätskriterien wird gefordert, keine tierischen Substanzen zur pDNA-Produktion und Aufarbeitung einzusetzen (EMEA, 2001). Somit wird auch der Einsatz von boviner RNase A untersagt, um ein Risiko der Enzephalopathieübertragung nach dem Auftreten neuer Varianten des Creutzfeldt-Jakob-Syndroms in Großbritannien auszuschließen (Cooke *et al.*, 2001).

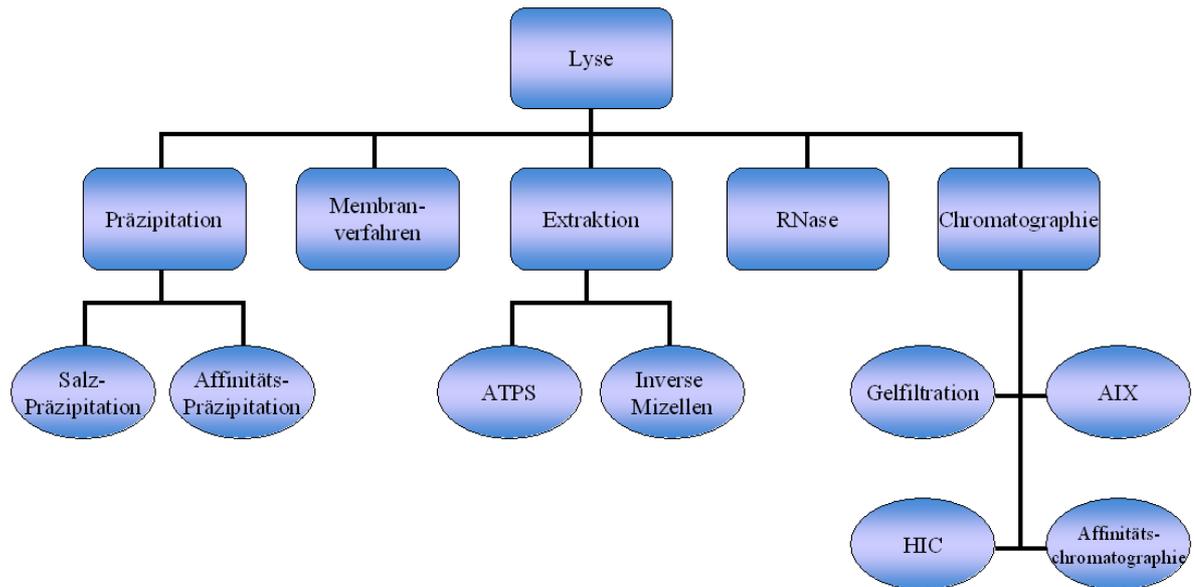
**Tabelle 1** Qualitätsparameter für pharmazeutisch einsetzbare Plasmid-DNA (Voß, 2008).

<i>Qualitätsparameter</i>	<i>Grenzwert</i>	<i>Analyseverfahren</i>
Endotoxine	< 10 E.U./mg pDNA	LAL-Test
chrDNA	< 50 µg/mg pDNA	realtime PCR
RNA	Nicht detektierbar	Agarosegelelektrophorese
Proteine	< 3 µg/mg pDNA	BCA-Test
Anteil ccc-Form	> 95 %	CGE
Identität	Größe	Restriktionsverdau und AGE

Die Abreicherung von chromosomaler DNA und RNA im Produkt ist notwendig, um eine potentielle Aktivierung von Onkogenen und Tumor-Repressorgenen zu vermeiden (Briggs und Panfili, 1991). Endotoxine sind immunreaktionsinitiierende Komponenten der gram-negativen prokaryotischen Zellwand und sind daher ebenfalls während der pDNA-Aufarbeitung abzureichern. Schon sehr geringe Konzentrationen von 5 E.U. pro kg Körpergewicht können Immunreaktionen, wie beispielsweise Fieber im Organismus auslösen (Ferreira *et al.*, 2001). Die Anwesenheit von Proteinen kann aufgrund der Produktion von Cytokinen, Hormonen oder Antikörpern zu Immunantworten und biologischen Reaktionen führen (Briggs und Panfili, 1991).

### ***2.3.2 Verfahrensoptionen für die Aufarbeitung von Plasmid-DNA***

Um die hohen Qualitätsanforderungen erfüllen zu können, müssen Verfahren entwickelt werden, die aufgrund des steigenden Bedarfs an Plasmid-DNA ebenfalls für die Aufarbeitung großer Plasmidmengen geeignet sind. Eine Übersicht über verschiedene Prozessoptionen ist in Abbildung 6 dargestellt. Herstellungsverfahren für pharmazeutisch einsetzbare Plasmid-DNA bestehen aus mehrstufigen Aufreinigungsverfahren, um die geforderte Qualität zu erreichen. Die verschiedenen Prozesse setzen sich aus dem Zellaufschluss, einer Grobreinigung zur Konzentrierung des Produktes und zur Abreicherung der Hauptverunreinigungen und einer anschließenden Feinreinigung zusammen.



**Abbildung 6** Verfahrensoptionen für die Aufarbeitung von Plasmid-DNA.

### 2.3.3 Zellaufschluss

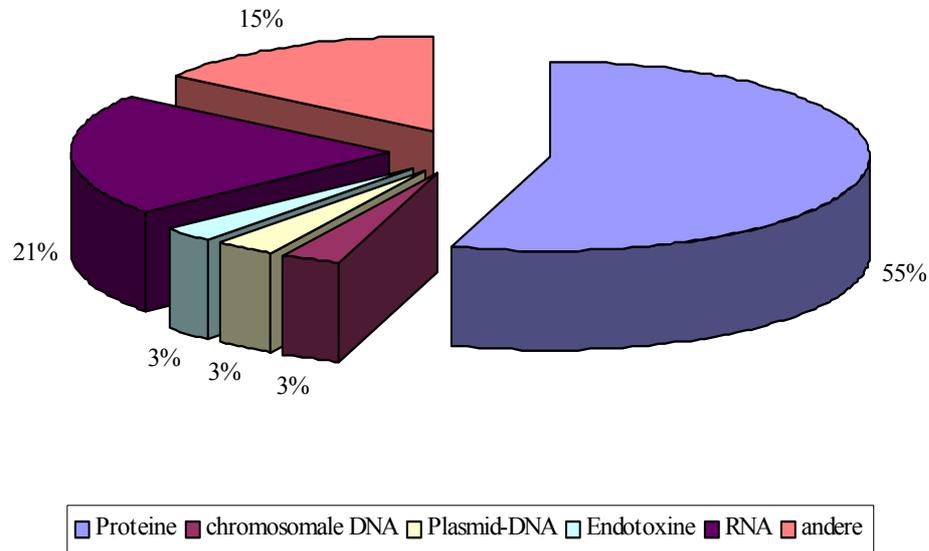
Unabhängig von der weiteren Aufarbeitung, ist der erste Schritt bei der Plasmidaufarbeitung die Lyse der Bakterienzellen. Eine effektive Lyse unter kontrollierten Bedingungen ist ein wichtiger Schritt in der Plasmidisolierung und hat einen großen Einfluss auf die Ausbeute und die Qualität der Plasmid-DNA. Zu diesem Zweck können unterschiedliche Verfahren angewendet werden. Die am weitesten verbreitete Methode ist die von Birnboim und Doly (1979) beschriebene alkalische Lyse. Alternativ können die Zellen auch thermisch aufgeschlossen werden (Holmes und Quigley, 1981).

Bei der alkalischen Lyse werden die Zellen nach der Ernte resuspendiert. Der Chelatbildner EDTA bindet hierbei divalente Kationen und destabilisiert somit die Zellwand (Prazeres *et al.*, 1999). Anschließend werden die Zellen in Gegenwart einer NaOH/Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung lysiert. Sowohl Proteine als auch chromosomale DNA und Plasmid-DNA werden durch die Erhöhung des pH-Wertes auf 12-12,5 denaturiert. Während der folgenden Neutralisation mit Kaliumacetat-Puffer werden die Wasserstoffbrückenbindungen der Nukleinsäuredoppelhelix wieder ausgebildet. Die Renaturierung hängt jedoch von der DNA-Konformation ab. Im Fall der chromosomalen DNA kommt es häufig zu einer nicht korrekten Rehybridisierung und die DNA präzipitiert. Aufgrund der ringförmigen Struktur der Plasmid-DNA und der Kontaktpunkte der Stränge können die Plasmide vollständig renaturiert werden. Das entstandene Kalium-

salz des Dodecylsulfats ist weniger löslich als das Natriumsalz und fällt aus. Die denaturierten Proteine, chromosomale DNA und Zellbruchstücke bilden mit Kaliumdodecylsulfat ein Präzipitat, während die renaturierte Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Die ausgefallenen Komponenten werden anschließend durch Zentrifugation und Filtration von der Produkt tragenden Flüssigkeit getrennt. Im Rahmen der alkalischen Lyse sind die Durchmischung des Systems und die Lysedauer entscheidende Faktoren. Eine zu kurze Lysedauer führt zu einer unvollständigen Freisetzung der Plasmid-DNA. Eine zu lange Wirkzeit hingegen kann zu einem erhöhten Anteil an irreversibel denaturierter pDNA und oc-Form führen und somit die Ausbeute an superspiralisierter Plasmid-DNA verringern (Clemson und Kelly, 2003). Ein entscheidender Faktor bei der Maßstabsvergrößerung ist die Durchmischung. Eine unzureichende Durchmischung führt zu extremen pH-Werten, wodurch die Plasmid-DNA bei Werten über 12,5 geschädigt werden kann. Aus zu niedrigen pH-Werten hingegen resultiert eine unvollständige Lyse. Eine starke Durchmischung führt aufgrund der hohen Scherkräfte zu einer Schädigung des Präzipitats, wodurch die hochmolekulare chromosomale DNA fragmentiert und im Lysat gelöst wird (Levy *et al.*, 2000). Eine breite Größenverteilung der Fragmente erschwert die spätere Abreicherung. Daher wurden verschiedene kontinuierliche Verfahren für eine effektive, scherkraftarme Durchmischung entwickelt. Es werden sowohl statische (Urthaler *et al.*, 2007) als auch aktive Mischer (Hebel *et al.*, 2006) verwendet. Eine Alternative bieten einfache T-Mischer bei ausreichender Fließgeschwindigkeit mit einer anschließenden Schaumflotation (Voß, 2007; Voß *et al.*, 2005). Hieraus resultiert ein effizient geklärtes bakterielles Lysat, dass im Gegensatz zu den anderen Verfahren ohne weitere Behandlung zu nachfolgenden Aufarbeitungsschritten eingesetzt werden kann. Neben der alkalischen Lyse wird auch ein thermischer Aufschluss zur Freisetzung von Plasmiden beschrieben (Holmes und Quigley, 1981). Die Biomasse wird durch Filtration mit einem Filterhilfsmittel abgetrennt und anschließend mit heißem Puffer lysiert (O'Mahony *et al.*, 2005). Auch bei diesem Verfahren ist es möglich durch geeignete Wahl von Temperatur und Pufferzusammensetzung einen Teil der RNA und der chromosomalen DNA während des Aufschlusses abzutrennen.

Die durchschnittliche Zusammensetzung eines bakteriellen Klarlysats ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Hauptkomponenten im Lysat sind Proteine und RNA, während die

Plasmid DNA mit lediglich 3 % nur in einer geringen Konzentration vorhanden ist und von den übrigen Komponenten durch weitere Aufarbeitung abgetrennt werden muss.



**Abbildung 7** Zusammensetzung eines bakteriellen Klarlysats (Stadler *et al.*, 2004).

### 2.3.4 Einsatz rekombinanter RNase

Bei der Herstellung von Plasmid-DNA für die pharmazeutische Anwendung muss auf den Einsatz von Reagenzien tierischen Ursprungs verzichtet werden (EMEA, 2001). Somit darf für den Verdau von RNA keine bovine RNase A eingesetzt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass an Stelle der bovinen eine rekombinante RNase erfolgreich eingesetzt werden kann (Voss *et al.*, 2006). Hierbei handelt es sich um eine 12 kDa große Ribonuklease aus *Bacillus amyloliquefaciens*. Diese kann durch Coexpression eines cytosolischen Inhibitors in *E. coli* rekombinant hergestellt werden. Das Enzym hat eine vergleichbare Aktivität wie RNase A und weist keine DNase-Aktivität auf.

### 2.3.5 Chromatographische Aufarbeitung

Chromatographische Verfahren sind in der Aufarbeitung von Plasmid-DNA weit verbreitet. Am häufigsten werden Anionenaustauschchromatographie (AEC) und hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) angewendet. Die Plasmidaufreinigung bei der Anionenaustauschchromatographie beruht auf der Wechselwirkung zwischen dem

negativ geladenen Rückgrat der pDNA und den positiv geladenen Gruppen auf der Oberfläche des Chromatographiematerials (Ferreira *et al.*, 1998; Schorr *et al.*, 1995). Für die Aufarbeitung von Nukleinsäuren sind Porengröße, Trägermaterial und die Ladungsdichte wichtige Faktoren. Die Retention wird ebenfalls durch die Nukleotidsequenz und Konformation beeinflusst (Lahijani *et al.*, 1996; Onishi *et al.*, 1993; Prazeres *et al.*, 1998). AEC eignet sich zur Entfernung von Proteinen und Abreicherung von RNA und chromosomaler DNA (Ferreira *et al.*, 1999; Prazeres *et al.*, 1998; Varley *et al.*, 1998). Einschränkungen sind jedoch vorhanden, da es sich um ein nicht selektives Material handelt, und es dadurch zur Coelution von Verunreinigungen kommt (Huber, 1998; Lyddiatt und O'Sullivan, 1998).

Mittels Umkehrphasenchromatographie und Ionenpaarchromatographie kann eine Aufreinigung der superspiralisierten Plasmid-DNA aus Lysat mit Basislinientrennung von RNA, niedermolekularer chromosomaler DNA und linearer Plasmid-DNA erreicht werden (Colote *et al.*, 1986). Höhermolekulare chromosomale DNA und Endotoxine bleiben auf der Säule gebunden. Nachteilig bei diesem Verfahren sind jedoch die Toxizität, Mutagenität und Flüchtigkeit der verwendeten organischen Lösungsmittel. Die Anwendung der geeigneteren hydrophoben Interaktionschromatographie wurde von Diogo *et al.* (2001a; 2001b) dargestellt. Ein sehr effektiver Aufarbeitungsprozess mit einer daraus resultierenden hohen Plasmidqualität wurde von Lemmens *et al.* (2003) beschrieben. Zu Beginn des Aufarbeitungsprozesses wurde eine Gelfiltration durchgeführt, um pDNA und RNA zu trennen. Einschränkend ist zu erwähnen, dass dies ein sehr langwieriger Prozess ist und das Produkt in diesem Schritt nicht ankonzentriert werden kann. Ein guter Überblick über erhältliche Gelfiltrationsmaterialien und die Möglichkeiten bezüglich der chromatographischen Aufarbeitung von Plasmid-DNA wird von Diogo *et al.* gegeben (2005). Durch ein HIC-Material mit Mercaptopyridin konnte anschließend die oc-Form von der ccc-Form des Plasmids abgetrennt werden. Zur weiteren Aufkonzentrierung und Abreicherung der Endotoxine wurde ein Anionenaustauschmaterial (Source-30 Q) verwendet.

Durch verschiedene Chromatographieschritte kann zwar eine hohe Plasmidqualität erzielt werden, der Nachteil der chromatographischen Verfahren liegt jedoch in der geringen Kapazität der Materialien. Die verschiedenen Chromatographiematerialien wurden in erster Linie für die Adsorption von Proteinen entwickelt. Makromoleküle und Nanopar-

tikel wie Plasmid-DNA können in Materialien mit einem Porendurchmesser unter 400 nm nicht eindringen (Colpan und Riesner, 1984) und können daher lediglich an der äußeren Oberfläche adsorbieren (Ferreira *et al.*, 2000; Ghose *et al.*, 2004; Ljunglöf *et al.*, 1999; Thwaites *et al.*, 2002). Durch den Ausschluss aus den Poren wird die Kapazität wesentlich herabgesetzt, und es konnten nur 4 % der ionischen Kapazität genutzt werden (Ferreira *et al.*, 2000). Konfokale Mikroskopie bestätigte die Bindung der Plasmid-DNA an der äußere Oberfläche (Ljunglöf *et al.*, 1999). Anionenaustauscher oder HIC-Materialien haben eine dynamische Kapazität von ungefähr  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Durch eine verzweigte Struktur der Liganden wie beispielsweise bei Fractogel kann die dynamische Kapazität auf  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  erhöht werden (Eon-Duval und Burke, 2004; Urthaler *et al.*, 2005). Eine bessere Auflösung und Effizienz kann durch nicht poröse Materialien (Stowers *et al.*, 1988), verdichtende Agenzien (Colpan und Riesner, 1984; Murphy *et al.*, 1999), Modifizierung durch Alkohol (Tseng und Ho, 2003; Tseng *et al.*, 2004), Matrices mit einem festen Kern (Thwaites *et al.*, 2002) oder *lid beads* (Gustavsson *et al.*, 2004; Kepka *et al.*, 2004a) erreicht werden, oder die Poren müssen groß genug sein, damit Plasmid-DNA eindringen kann (Colpan und Riesner, 1984). Monolithen bestehen aus einer kontinuierlichen Festphase, die von makroporösen Kanälen durchzogen ist und konvektiv durchströmt werden kann. Bei diesem Material findet also kein diffusiver Stofftransport in die Poren statt (Strancar *et al.*, 2002). Für Plasmid-DNA konnten dynamische Kapazitäten bis zu  $8 \text{ mg mL}^{-1}$  erreicht werden (Urthaler *et al.*, 2005). Monolithen werden durch die Copolymerisation geeigneter Monomere in Gegenwart porogener Substanzen hergestellt (Lozinsky *et al.*, 2003; Viklund *et al.*, 1997; Viklund *et al.*, 1996). Monolithen wurden bereits für die Bindung von Plasmiden (Branovic *et al.*, 2004; Urthaler *et al.*, 2005), Viren (Kramberger *et al.*, 2004) und Zellen (Arvidsson *et al.*, 2002; Dainiak *et al.*, 2005) eingesetzt. Zusätzlich können durch das Einbringen funktioneller Gruppen unterschiedliche Bindungseigenschaften erzeugt werden. Auf die Möglichkeiten der Affinitätschromatographie wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

### 2.3.6 Affinitätsverfahren

Affinitätsverfahren stellen die selektivste Methode für die Aufreinigung von Plasmid-DNA dar. Das Verfahren der Tripel-Helix-Affinität beruht auf der sequenzspezifischen Bindung eines Oligonukleotids mit dem Doppelstrang der Plasmid-DNA, wodurch eine kurze Dreifachhelix gebildet wird. Das Verfahren wurde erstmals von Ito *et al.* (1992) zur Aufreinigung von DNA eingesetzt. Die Tripel-Helix-Affinität wurde in Verbindung mit unterschiedlichen Festphasen wie Standard-Chromatographiematerialien (Schluep und Cooney, 1998; 1999; Wils *et al.*, 1997), magnetischen Partikeln (Sonti *et al.*, 1995), sowie einem thermoreagierenden N-Isopropylacrylamid-Polymer (Costioli *et al.*, 2003) beschrieben. Bei der Methode von Costioli *et al.* ist eine kurze Oligonukleotid-Sequenz an ein thermoreagierendes N-Isopropylacrylamid-Polymer kovalent gebunden. Die Ziel-DNA wird bei niedrigen Temperaturen von 4 °C durch Ausbildung einer Dreifachhelix gebunden. Durch die anschließende Temperaturerhöhung auf 40 °C präzipitiert der gebildete Komplex. Durch Senkung der Temperatur und einen pH-Shift auf pH 9,0 kann die Plasmid-DNA wieder in Lösung gebracht werden. Ein wesentlicher Nachteil des Tripel-Helix-Systems ist die langsame Ausbildung der Dreifachhelix. Zudem weist das immobilisierte Oligonukleotid eine schlechte chemische und biochemische Stabilität auf.

Ein weiteres Affinitätsverfahren basiert auf der Wechselwirkung zwischen Proteinen und DNA. In der Natur gibt es diesbezüglich viele Beispiele in Form von DNase, Transkriptionsfaktoren oder Polymerasen. Es wurde bereits gezeigt, dass kurze DNA-Fragmente (Kumar *et al.*, 1999; Lundeberg *et al.*, 1990) und auch Plasmid-DNA (Hasche und Voß, 2005) durch einen immobilisierten *lac*-Repressor selektiv gebunden werden konnten. Ferner wurde ein Zinkfinger/Glutathion-S-Transferase Fusionsprotein in Verbindung mit der korrespondierenden DNA-Sequenz beschrieben (Ghose *et al.*, 2004; Woodgate *et al.*, 2002). Die Bindungskapazität war jedoch bei diesem System wie auch beim *lac*-Repressor-System sehr gering.

Für die Plasmid-Aufarbeitung können auch Metallchelatwechselwirkungen genutzt werden (Balan *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003). Die Affinität beruht darauf, dass exponierte Purinbasen über ein Stickstoffatom an ein Metallatom binden können. Sowohl RNA als auch degradierte oder denaturierte DNA weisen solche exponierten Purinbasen

auf. Daher ist eine Abtrennung dieser Komponenten durch Fällung oder Chromatographie möglich.

### **2.3.7 Präzipitation**

Nukleinsäuren können durch Salze gefällt werden. Es ist jedoch schwierig das Verfahren so zu steuern, dass die Präzipitation selektiv verläuft. Häufig werden hohe Produktverluste während des Präzipitationsverfahrens verzeichnet. Hierbei spielen sowohl die Salzkonzentration als auch die Konzentrationen von Plasmid-DNA und RNA eine Rolle. Durch die Verwendung von Calciumchlorid ist es möglich einen großen Teil der RNA durch Fällung abzutrennen (Eon-Duval *et al.*, 2003a). Die verbleibende RNA kann anschließend durch eine Ultrafiltration abgereichert werden (Eon-Duval *et al.*, 2003b).

Als Alternative zur Fällung mit Salz beschreiben Lander *et al.* (2002) die Präzipitation mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB). Durch die Zugabe des kationischen Tensids konnte die Plasmid-DNA selektiv aus einem bakteriellen Klarlysate gefällt werden. Unter geeigneten Bedingungen war es sogar möglich die ccc-Form des Plasmids von oc-Form und chromosomaler DNA abzutrennen. Eine selektive Fällung von Plasmid-DNA kann ebenfalls durch die Zugabe von Poly-N,N-diallyldimethylammoniumchlorid erreicht werden (Wahlund *et al.*, 2004).

## **2.4 Extraktionsverfahren**

### **2.4.1 Grundlagen der Extraktion**

Extrahieren ist das Abtrennen einer oder mehrerer Komponenten aus einem Stoffgemisch mit Hilfe eines nicht mischbaren Lösemittels, das aufgrund seines spezifischen Lösevermögens als Extraktionsmittel wirkt. Durch die Extraktion wird der herauszulösende Stoff von einer Phase in die andere transportiert. Grundsätzlich sind drei Arten der Extraktion zu unterscheiden: Fest-Flüssig-Extraktion, Flüssig-Flüssig-Extraktion (Solventextraktion) und Destraktion (Hochdruck-Gasextraktion). Im weiteren wird lediglich die Solventextraktion genauer erläutert.

Bei der Solventextraktion findet der Übergang des Extraktstoffes von einer flüssigen Phase in eine zweite fluide Phase statt. Die Phasen sind nicht oder nur begrenzt misch-

bar und in ihrer Dichte unterschiedlich. Bei der Extraktion verläuft der Stofftransport in Richtung des vom Nernst-Verteilungsgesetz festgelegten Gleichgewichts. Nach Einstellung des Gleichgewichts stehen die Konzentration des Extraktstoffes im Extrakt  $c_E$  und Raffinat  $c_R$  in einem festen Verhältnis, dem Verteilungskoeffizienten  $K_E$ . Unter der Voraussetzung niedriger Konzentrationen, konstantem Druck, pH und Temperatur gilt für die Verteilung:

$$c_E / c_R = K_E = konst.$$

$K_E$  = Verteilungskoeffizient

$c_E$  = Konzentration des Extraktstoffes im Extrakt

$c_R$  = Konzentration des Extraktstoffes im Raffinat

#### Auswahl des Extraktionsmittels

Für eine erfolgreiche Extraktion ist die Wahl des geeigneten Lösungsmittel von großer Bedeutung. Hierfür sind eine Reihe von generellen Anforderungen zu beachten. Für die Trennung der Phasen nach der Extraktion ist eine möglichst geringe Mischbarkeit von Extraktionsmittel und Raffinat gefordert. Die Dichtedifferenz sollte zumindest 2-5 % betragen. Eine hohe Grenzflächenspannung zwischen den Phasen verhindert zwar die Bildung von Emulsionen, erschwert jedoch auch das Dispergieren der Phase und daraus resultierend die Erzeugung einer großen Austauschfläche für den Stofftransport. Durch eine geringe Viskosität des Lösungsmittels wird eine gute Wärme- und Stoffübertragung erzielt. Das Extraktionsmittel sollte ferner eine hohe Selektivität für die zu extrahierende Komponente und eine große Kapazität aufweisen. Die Rückgewinnung des Extraktionsmittels wird durch niedrige Siedetemperaturen und Verdampfungsenthalpien als auch durch chemische und thermische Beständigkeit erleichtert. Im Hinblick auf die Betriebssicherheit ist eine schlechte Brennbarkeit des Lösungsmittels wünschenswert. Die Verluste durch Verdunstung während der Extraktion können durch einen niedrigen Dampfdruck bei Arbeitstemperatur gemindert werden. Ferner ist auf eine geringe Korrosionswirkung des Extraktionsmittels zu achten, um Anlagenkosten gering zu halten. Zudem ist die Toxizität sowohl für den Menschen als auch für die Umwelt als Kriterium bei der Wahl des Extraktionsmittels zu berücksichtigen.

Besonders die Aufarbeitung von biologischen Produkten stellt spezifische Anforderungen. Daher ist das Extraktionsmittel so zu wählen, dass dadurch das Produkt nicht geschädigt wird. Die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln ist für biotechnologische Produkte lediglich auf Sonderfälle beschränkt. Beispielsweise wird dieses Verfahren für die Gewinnung von Antibiotika eingesetzt. Um hohe Produktverluste und Aktivitätsverluste bei der Extraktion von Proteinen durch den Einsatz organischer Lösungsmittel zu vermeiden, werden wässrige Zweiphasensysteme für den Aufarbeitungsprozess genutzt. Eine weitere Möglichkeit zur schonenden Aufarbeitung stellen inversmizellare Zweiphasensysteme dar. Auf beide Verfahren wird im folgenden näher eingegangen.

#### ***2.4.2 Wässrige Zweiphasensysteme***

Wässrige Zweiphasensysteme werden gebildet, wenn zwei Polymere wie z. B. Polyethylenglykol (PEG) und Dextran in Wasser gelöst werden. Dabei ist die Wechselwirkung der Polymerspezies unter sich günstiger als die Wechselwirkung zwischen den beiden Polymeren, wodurch es zur Phasenbildung kommt. Aufgrund der hohen Wasseranteile in beiden Phasen ist eine wesentlich schonendere Extraktion gegenüber klassischen Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln möglich. Dadurch können die Denaturierung und Fehlfaltung von Proteinen wesentlich herabgesetzt werden. Zudem ist hier auf die physiologische Unbedenklichkeit von PEG und Salzen hinzuweisen. PEG ist ein kostengünstiges Polymer aus Ethylenoxid und wird in unterschiedlichen Kettenlängen hergestellt. Für wässrige Zweiphasensysteme werden Molmassen zwischen 1000 und 20000 eingesetzt. Bei Dextran handelt es sich um ein biotechnologisch hergestelltes Polysaccharid aus Glukoseeinheiten. Da Dextran im Vergleich zu PEG relativ teuer ist, wurden alternativ andere Polymere wie z. B. derivatisierte Stärken eingesetzt. Diese Polymere konnten sich jedoch nicht durchsetzen.

Neben Polymer/Polymer-Systemen werden ebenfalls Polymer/Salz-Systeme für die Extraktion verwendet. Das Phasenverhalten wässriger Polymerlösungen hängt sowohl von der Art des Salzes als auch von dessen Konzentration ab. Eine ausreichend hohe Salzkonzentration in einem Polymer/Wasser-System führt zur Phasentrennung und somit zu einer salzreichen, polymerarmen unteren Phase und einer salzarmen, polymerreichen oberen Phase. Die relative Effektivität verschiedener Salze bezüglich der Phasentrennung folgt der Hofmeister-Reihe, bei der die Ionen in Hinblick auf ihre Aussalzka-

pazität geordnet werden. Dabei ist bei Betrachtung der Effektivität des einzelnen Salzes der Einfluss des Anions größer als der des Kations. Zur Erzeugung der Phasentrennung mit Polyethylenglykol werden vor allem Salze mit hoher Aussalzkapazität wie Phosphat oder Sulfat eingesetzt. Die Möglichkeit zur Trennung von Zellen, Zellbruchstücken und Proteinen in wässrigen Zweiphasensystemen wurde erstmalig von Albertson (1956; 1958a; 1958b; Albertsson und Nyns, 1959) beschrieben. Aufgrund der spezifischen Wechselwirkungen mit den Systemkomponenten verteilen sich Zellen, Zellbruchstücke, Proteine und Nukleinsäuren zwischen den beiden Phasen. Hierbei herrschen ionische, hydrophobe und Van-der-Waals Wechselwirkungen vor. Durch den schon definierten Verteilungskoeffizienten  $K_E$  wird das Verteilungsverhalten der Moleküle charakterisiert. Der Verteilungskoeffizient kann durch die Brönstedt-Gleichung beschrieben werden:

$$\ln K_E = \frac{\lambda A}{kT}$$

$K_E$  = Verteilungskoeffizient

A = Oberfläche des Moleküls

k = Boltzmann-Konstante

T = absolute Temperatur

$\lambda$  = Summe der molmassenunabhängigen Wechselwirkungen

Für Partikel mit hoher Molmasse, wie beispielsweise Zellen und Zellbruchstücke ergibt sich eine einseitige Verteilung, also Verteilungskoeffizienten von nahezu 0 oder unendlich. Dies ist mit der exponentiellen Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten von der Oberfläche und damit indirekt von der Molmasse zu begründen. Daher sind Zweiphasensysteme besonders gut zur Zelltrümmerabtrennung geeignet, da diese sich leicht in die Unterphase verteilen lassen. Der Verteilungskoeffizient für Proteine liegt zwischen 0,01 und 100, für niedermolekulare Stoffe wie Aminosäuren oder Salze um 1 (Chmiel, 2006). Während der Extraktion im wässrigen Zweiphasensystem soll das gewünschte Produkt in eine Phase, und alle anderen Komponenten in die andere Phase verteilt werden. Generell lässt sich das Verteilungsverhalten von Biomolekülen durch die folgenden Bedingungen beeinflussen:

- Art der phasenbildenden Polymere
- Molmasse und Molmassenverteilung der Polymere
- Gegenwart von Ionen
- pH-Wert
- Temperatur
- Verwendung spezifischer Liganden

Häufig werden wässrige Zweiphasensysteme für die Aufarbeitung von Proteinen eingesetzt. Es ist zwar nicht möglich die Verteilung genau vorauszusagen, jedoch lassen sich einige Tendenzen für das Verteilungsverhalten aufzeigen. Durch Erhöhung der Molmasse eines Polymers in einem Polymer/Polymer-System werden die Proteine in die andere Phase gedrängt, unter der Voraussetzung, dass die Molmasse des Polymers dort konstant gehalten oder erniedrigt wird. Ferner steigt der Verteilungskoeffizient für die Proteine mit steigendem pH-Wert. Wird die Salzkonzentration in einem Polymer/Salz-System erhöht, so werden die Proteine in die polymerreiche Oberphase verteilt.

Bei Verwendung eines PEG/Salz-Systems würde das Zielmolekül zunächst in die Polymerphase extrahiert werden. Bei diesem Schritt ist gleichzeitig eine Ankonzentrierung möglich. In einem zweiten Extraktionsschritt wird das Produkt in die Unterphase verteilt und so vom PEG getrennt. Somit sind wässrige Zweiphasensysteme einfach anzuwenden. Die Grenzflächenspannung dieser Systeme ist mit  $0,001 \mu\text{N cm}^{-1}$  bis  $1 \mu\text{N cm}^{-1}$  im Vergleich zu Extraktionssystemen mit organischen Lösungsmitteln mit  $10\text{-}200 \mu\text{N cm}^{-1}$  sehr gering. Dadurch resultiert eine große Austauschfläche der dispergierten Phasen und somit ein effektiver Transfer. Nachteilig ist jedoch, dass die Trennung der Phasen aufgrund der geringen Dichtedifferenz der beiden Phasen und der Viskosität im Gegensatz zur Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel sehr langsam verläuft. Vor allem bei Verwendung von Polymer/Polymer-Systemen wird in der Regel eine Zentrifugation angeschlossen. PEG/Salz-Systeme lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Viskosität besser trennen.

Neben der vielfach beschriebenen Aufarbeitung von Proteinen wurde auch die Aufarbeitung von Nukleinsäuren mit wässrigen Zweiphasensystemen untersucht. Die ersten Untersuchungen in PEG/Dextran-Systemen wurden von Albertsson (1965) durchgeführt. Dabei wurde das System in Hinblick auf die Zugabe verschiedener Elektrolyte,

Polymerkonzentration und die Nukleinsäurekonformation untersucht. Ferner wurde auch die Verteilung von Plasmid-DNA in einem Polyethylenglykol/Dextran-System beschrieben (Ohlsson *et al.*, 1978). Eine weitere Möglichkeit der DNA-Isolierung bieten PEG/Salz-Systeme. Cole (1991) zeigte die Extraktion von Nukleinsäuren in die salzhaltige Phase, während Proteine und zelluläre Bestandteile in der anderen Phase vorlagen oder an der Grenzfläche präzipitierten. Umfassende Untersuchungen bezüglich der Aufreinigung von Plasmid-DNA aus bakteriellem Klarlysat mit Hilfe von PEG/Kaliumphosphat-Systemen wurden von Ribeiro *et al.* (2002) beschrieben. Systeme, die PEGs mit unterschiedlichen Molmassen zwischen  $200 \text{ g mol}^{-1}$  und  $8000 \text{ g mol}^{-1}$  enthielten, wurden auf die Möglichkeit hin untersucht, Verunreinigungen abzureichern. Hinsichtlich der Reinheit der Plasmid-DNA war ein PEG-600-System mit 40 % Lysatbeladung am besten geeignet. Unter diesen Bedingungen befand sich die RNA hauptsächlich an der Grenzfläche, Proteine konnten nicht nachgewiesen werden, und die chromosomale DNA wurde um den Faktor 7,5 reduziert. Es konnte jedoch nur eine Wiederfindung der Plasmid-DNA von 34-44 % erzielt werden, da aufgrund der hohen PEG- und Salzkonzentrationen ein großer Teil des Produktes an der Phasengrenzfläche präzipitierte. Durch die Verwendung anderer PEG-Systeme konnte die Wiederfindung der Plasmid-DNA zwar deutlich verbessert werden, jedoch wurde dadurch die Abreicherung der Verunreinigungen gemindert. Eine optimale Aufreinigung konnte mit keinem der Systeme erreicht werden, zudem konnte keine Ankonzentrierung der Plasmid-DNA erzielt werden. Das beschriebene Extraktionssystem konnte später durch Trindade *et al.* (2005) weiterentwickelt werden und in einen Aufarbeitungsprozess integriert werden, wodurch die Abreicherung der Verunreinigungen verbessert wurde. Als wässriges Zweiphasensystem wurde ein PEG-600/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -System eingesetzt, wodurch der Transfer der Plasmid-DNA in die Salzphase erzielt wurde, und diese direkt zur weiteren Aufarbeitung mittels hydrophober Interaktionschromatographie eingesetzt werden konnte. Im Vergleich zu einem Aufarbeitungsprozess, der eine sequenzielle Fällung mit 2-Propanol und Ammoniumsulfat vor dem chromatographischen Aufarbeitungsschritt beinhaltet, konnte mit der wässrigen Zweiphasenextraktion eine höhere Reinheit des Endproduktes erreicht werden. Die Wiederfindung der Plasmid-DNA ist jedoch mit 75 % niedriger im Vergleich zu 87 % im Falle der Aufreinigung mittels Präzipitation.

Frerix *et al.* (2005) untersuchten ebenfalls wässrige Zweiphasensysteme bezüglich der Fähigkeit Plasmid-DNA von RNA, Proteinen und chromosomaler DNA zu trennen. Hierbei wurde PEG in Verbindung mit Kaliumcitrat oder Kaliumphosphat als phasenbildende Komponenten eingesetzt. Unter Verwendung eines PEG 800/Phosphat-Systems und eines PEG 600/Citrat-Systems konnten die besten Ergebnisse erzielt werden. Während der Extraktion konnte eine Wiederfindung der Plasmid-DNA von 85 % und 80 % erreicht werden, während die RNA zu 80 % und 85 % abgereichert wurde. Wurde die Beladung des Systems mit pDNA und RNA erhöht, konnte eine Abreicherung der RNA von 89 % erreicht werden, während die Wiederfindung der Plasmid-DNA 60-75 % betrug. Durch die Extraktion konnten 99 % der chromosomale DNA und 90 % der Proteine entfernt werden. Bezüglich der chromosomalen DNA ist jedoch anzumerken, dass die Messungen mit PicoGreen an einem gespikten System durchgeführt wurden. Daher lagen keine realen Bedingungen zugrunde. Die Extraktion unter Verwendung des PEG/Phosphat-Systems konnte erfolgreich in einen Aufarbeitungsprozess integriert werden (Frerix *et al.*, 2007). Zur weiteren Aufarbeitung wurden Membranfiltration und/oder Anionenaustauschchromatographie eingesetzt.

Alternativ zur Verwendung von PEG kann ein thermoseparierendes Polymer zur Extraktion eingesetzt werden. Kepka *et al.* (2004b) beschreiben ein wässriges Zweiphasensystem unter Verwendung eines Ethylenoxid-Propylenoxid-Copolymers (EO<sub>50</sub>PO<sub>50</sub>) und Dextran T 500. Mit Hilfe dieses Systems konnte die Plasmid-DNA erfolgreich extrahiert werden, während 80 % der RNA und 58 % der Proteine in der Dextran-Phase verblieben und dadurch abgetrennt wurden. Zusätzlich konnte das Volumen der pDNA-haltigen Phase um den Faktor 3,8 reduziert werden. Durch einen thermoseparierenden Schritt konnte das Polymer recycelt werden. Eine weitere Aufarbeitung der Plasmid-DNA nach der Extraktion ist jedoch zwingend notwendig, um die verbliebenen Verunreinigungen abzutrennen und somit eine bessere Produktqualität zu erreichen. Kepka *et al.* (2004a) zeigten, dass das beschriebene wässrige Zweiphasensystem gut in einen Aufarbeitungsprozess integriert werden konnte. Im Anschluss an das Extraktionsverfahren wurde zur weiteren Aufreinigung eine *lid bead* Chromatographie durchgeführt (Gustavsson *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um ein Chromatographiematerial, das positiv geladene Innenräume aufweist, wodurch die verbliebene RNA gebunden wird,

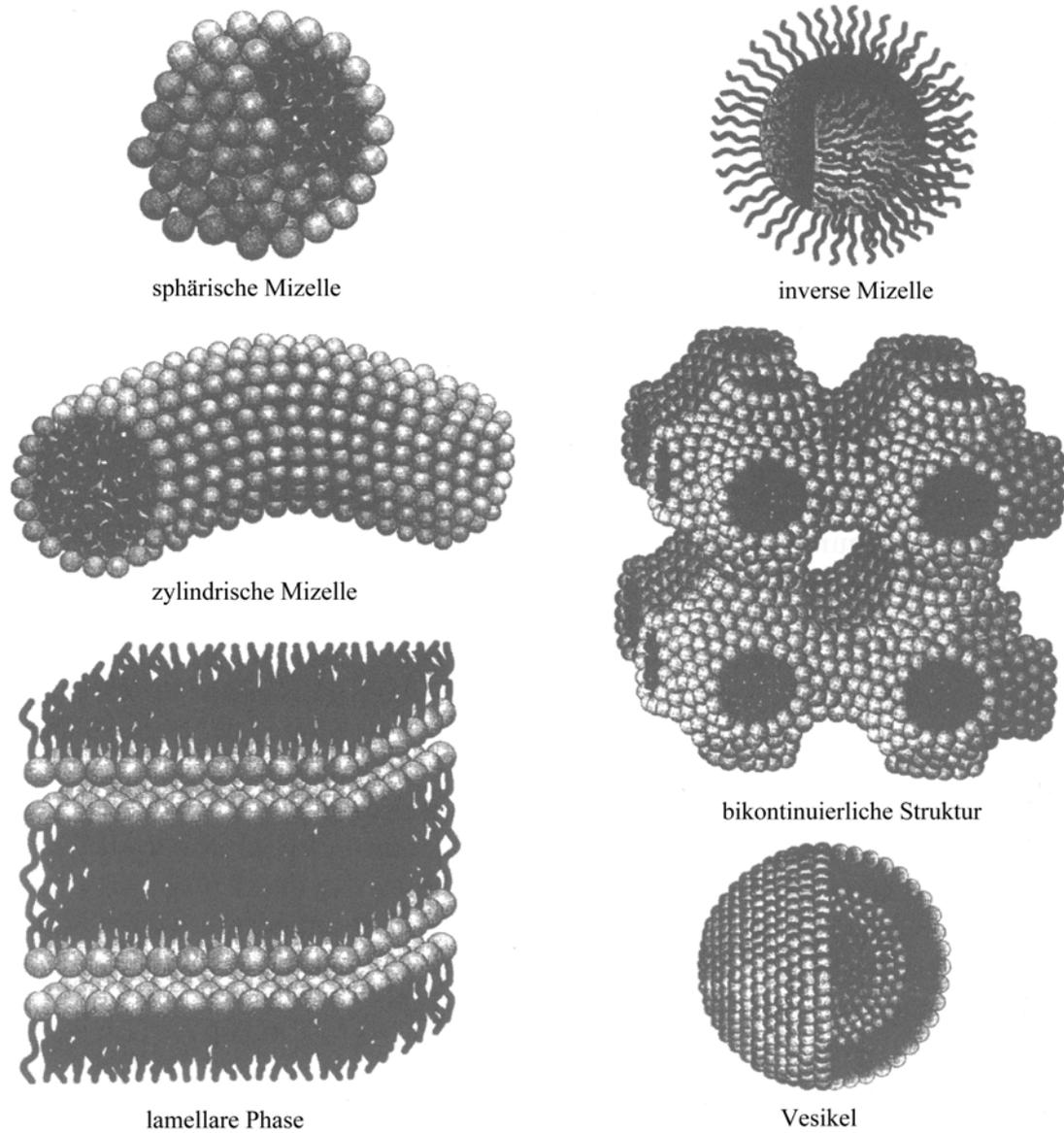
während sich die Plasmid-DNA, da sie aufgrund ihrer Größe nicht in die Poren eindringen kann, im Durchlauf befindet.

### ***2.4.3 Extraktionssysteme unter Verwendung von Tensiden***

#### ***2.4.3.1 Tenside***

Tenside bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Rest. Der hydrophobe Teil eines Tensids ist entweder linear oder verzweigt und besteht meist aus 8-18 Kohlenstoffatomen. Der Grad der Verzweigung, die Position der polaren Gruppe und die Länge der Alkylkette sind wichtige Parameter für die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Tensids. Die polare Kopfgruppe kann ionisch oder nicht-ionisch sein. Bei nicht-ionischen Tensiden kann die Größe der Kopfgruppe stark variiert werden. Für ionische Tenside hingegen ist die Größe ein mehr oder weniger fester Parameter. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften werden durch die relative Größe der hydrophoben und polaren Gruppen bestimmt und nicht durch die absolute Größe der beiden. Die Klassifizierung von Tensiden findet auf der Basis der Ladung der polaren Kopfgruppe statt. Es wird zwischen anionischen, kationischen, nicht-ionischen und zwitterionischen Tensiden unterschieden. Für ionische Tenside spielt die Wahl des Gegenions eine wichtige Rolle bezüglich der physikalisch-chemischen Eigenschaften. Die meisten anionischen Tenside haben Natrium als Gegenion. Andere Kationen wie Lithium, Kalium, Calcium oder protonierte Amine werden ebenfalls verwendet. Als Gegenion für kationische Tenside werden meist Halogenide eingesetzt. Die hydrophobe Gruppe des Tensids ist normalerweise ein Kohlenwasserstoff, weniger üblich sind Polydimethylsiloxan und Fluorkohlenwasserstoff.

Durch die Zusammenlagerung von Tensiden können unterschiedliche Strukturen entstehen, die in Abbildung 8 dargestellt sind.



**Abbildung 8** Strukturen, die durch die Zusammenlagerung von Tensiden entstehen können (Holmberg *et al.*, 2004).

Grundsätzlich können Systeme, die Tenside enthalten, in homogene und heterogene Systeme unterteilt werden. Eine detailliertere Einteilung der Systeme ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2** Einteilung tensidhaltiger Systeme

<i>Homogene Systeme</i>	<i>Heterogene Systeme</i>
Feste Phasen unterschiedliche Strukturen	Emulsionen Suspensionen Vesikel, Liposomen
Flüssig Kristalle lamellar hexagonal invershexagonal kubisch	Schäume, Aphron Adsorbierte Tensidschichten und Tensidfilme Gele
Isotrope Phasen konzentrierte und verdünnte mizellare Lösungen inversmizellare Lösungen Mikroemulsionen Vesikel	

Werden verschiedene physikalisch-chemische Eigenschaften einer wässrigen Tensidlösung betrachtet, sind Besonderheiten festzustellen. Bei einer geringen Tensidkonzentration sind die Eigenschaften ähnlich denen einfacher Elektrolyte. Allerdings verringert sich die Oberflächenspannung stark mit steigender Tensidkonzentration. Bei höheren Konzentrationen stellen sich für die Oberflächenspannung und den osmotischen Druck konstante Werte ein, während Lichtstreuung und Diffusion zunehmen. Von einzelnen Tensidmolekülen ausgehend bilden sich mit steigender Tensidkonzentration immer mehr verbundene und geordnete Strukturen. Die ersten gebildeten Aggregate sind meist Mizellen. Die Konzentration, die zur Ausbildung von Mizellen führt wird als kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) bezeichnet. Die kritische Mizellbildungskonzentration hängt von der chemischen Struktur des jeweiligen Tensids ab. Die CMC nimmt mit steigender Alkylkettenlänge des Tensids zu. CMCs für nicht-ionische Tenside sind wesentlich niedriger als die für ionische Tenside. Neben dem Unterschied von ionischen und nicht-ionischen Tensiden, spielt der Einfluss der polaren Kopfgruppe eine eher un-

tergeordnete Rolle. Kationische Tenside weisen eine etwas höhere CMC auf als anionische Tenside. Die Wertigkeit der Gegenionen ist hingegen von größerer Bedeutung. Zweiwertige Gegenionen führen zu einer Erniedrigung der CMC um den Faktor 4 im Vergleich zu einwertigen Gegenionen. Neben der Struktur des Tensids hat die Anwesenheit im System gelöster Komponenten wie Salz und Alkohol einen wesentlichen Einfluss auf die kritische Mizellbildungskonzentration. Die Zugabe von Salz bewirkt eine deutliche Verringerung der CMC um bis zu eine Zehnerpotenz. Die Auswirkung ist bei längerkettigen Tensiden größer als bei kurzkettigen Tensiden. Die Zugabe von Alkoholen führt ebenfalls zu niedrigeren CMCs, jedoch in sehr unterschiedlichen Maßen. Alkohol ist weniger polar als Wasser und verteilt sich zwischen der Wasserphase und den Mizellen. Je größer die Präferenz für die Mizelle ist, desto mehr wird diese stabilisiert. Eine lange Alkylgruppe führt zu einer bevorzugten Position in der Mizelle im Vergleich zur Wasserphase. Grundsätzlich wirkt der Alkohol hier wie ein nicht-ionisches Tensid und senkt die kritische Mizellbildungskonzentration.

Mizellen können über einen weiten Konzentrationsbereich über der CMC als mikroskopische wässrige Kohlenwasserstoff-Tröpfchen umgeben von polaren Kopfgruppen angesehen werden, die sich in einer wässrigen Phase befinden. Der Radius des Mizellkerns, der aus den Alkylketten besteht, ist ungefähr mit der ausgestreckten Länge der Alkylkette gleichzusetzen, d.h. im Bereich von 1,5-3,0 nm. Im Fall von kurzkettigen Tensiden wird auch bei hoher Tensidkonzentration keine Veränderung der Mizellgröße festgestellt. Die Konzentrationserhöhung längerkettiger Tenside führt jedoch auch schon bei mittleren Konzentrationen zu einem Wachstum der Mizelle beginnend mit einer länglichen oder zylindrischen Form bis hin zu faserartigen Strukturen. Diese stäbchenförmigen Strukturen können eine Länge von 10 nm bis zu mehreren 100 nm aufweisen.

Im Fall von inversen Mizellen ist das Phasenverhalten im Vergleich zu normalen Mizellen umgekehrt. Es handelt sich hierbei also um einen Wasserkern, der von dem Tensid gegen eine unpolare Phase abgeschirmt ist. Der Radius solcher Wasserkerne beträgt 2-10 nm.

Bezüglich der Struktur ist festzuhalten, dass Tenside mit einer Alkylkette im allgemeinen Mizellen bilden, während doppelkettige Tenside eher lamellare Phasen und inverse Mizellen bilden. Die geometrische Charakterisierung von Tensidmolekülen ist hilfreich,

um die von dem Tensid gebildeten Strukturen zu erklären. Die Aggregationszahl  $N$  ist definiert als das Verhältnis zwischen dem Volumen des Mizellkerns  $V_m$  und dem Volumen  $v$  einer hydrophoben Kette:

$$N = V_m / v = \frac{4}{3} \pi R_m^3 / v$$

Alternativ kann die Aggregationszahl durch das Verhältnis zwischen der Mizellfläche  $A_m$  und der Querschnittsfläche  $a$  eines Tensidmoleküls beschrieben werden:

$$N = A_m / a = 4\pi R_m^2 / a$$

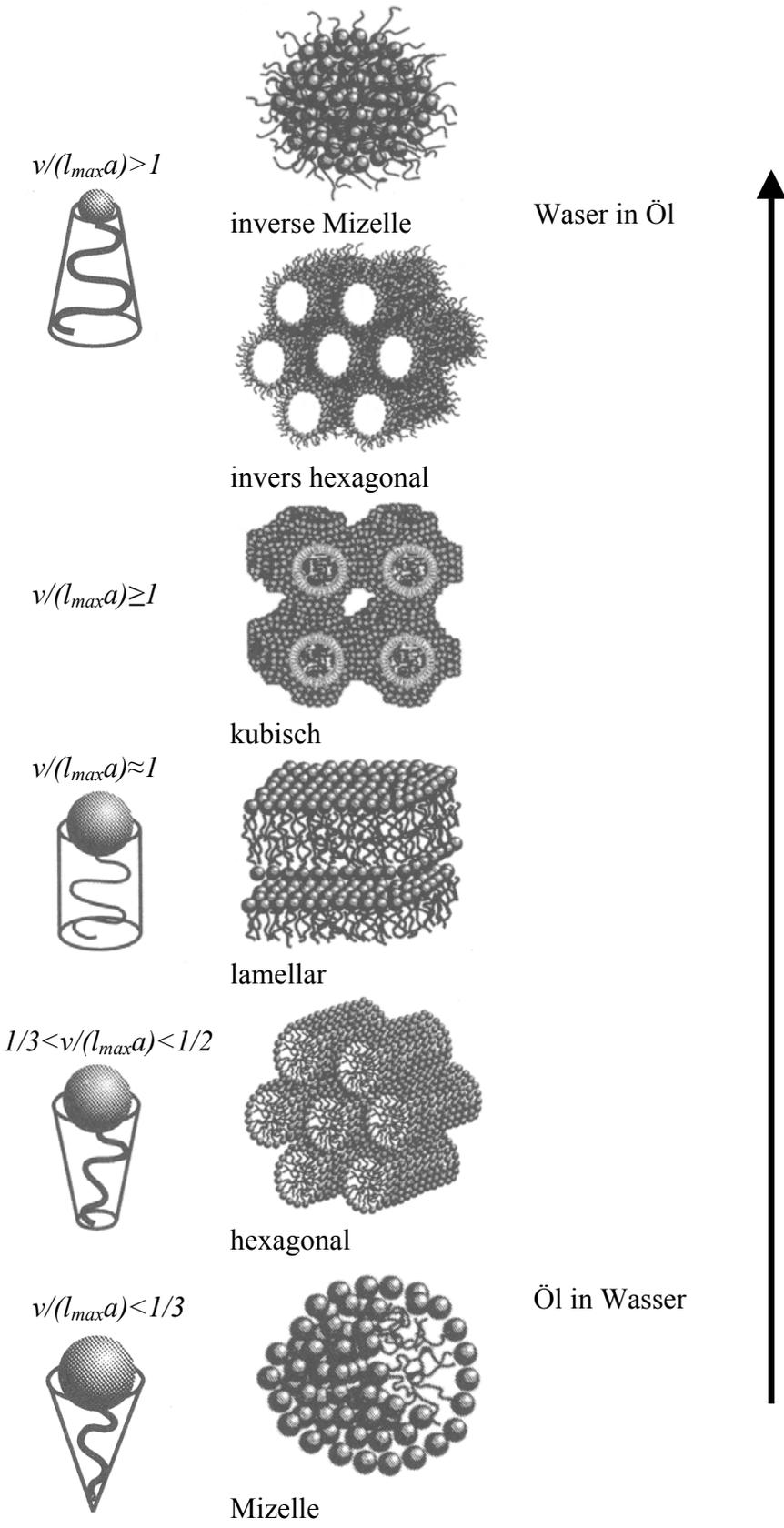
Werden die Aggregationszahlen gleichgesetzt, gilt:

$$v / (R_m a) = \frac{1}{3}$$

Da  $R_m$  nicht die Länge der ausgestreckten Alkylkette ( $l_{\max}$ ) überschreiten kann, gilt:

$$v / (l_{\max} a) \leq \frac{1}{3} \text{ für eine sphärische Mizelle.}$$

Das Verhältnis  $v / l_{\max} a$  wird als kritischer Packungsparameter (CPP) bezeichnet. Würde nun  $v$  aufgrund einer zweiten Alkylkette des Tensids verdoppelt werden, während die anderen Faktoren konstant bleiben, wird deutlich warum diese Tenside andere Strukturen als eine Mizelle favorisieren. Alternativ kann der kritische Packungsparameter auch als Verhältnis zwischen der Querschnittsfläche des hydrophoben Teils und der der Kopfgruppe gesehen werden. Von der chemischen Struktur auf die Struktur der gebildeten Aggregate zu schließen ist jedoch wesentlich komplexer als hier dargestellt. Daher sollte diese geometrische Analyse nur als Hilfe gesehen werden, einen Trend im Phasenverhalten aufzuzeigen. Grundsätzlich ist die gebildete Struktur ein Resultat aus dem Verhältnis der polaren und nicht polaren Teile eines Tensidmoleküls. Aus der Definition des kritischen Packungsparameters lassen sich die in Abbildung 9 dargestellten Strukturen ableiten.



**Abbildung 9** Kritische Packungsparameter von Tensidmolekülen und die geometrisch bevorzugten Aggregatstrukturen (Holmberg *et al.*, 2004).

In dem geometrischen Modell wurden jedoch zwei Faktoren noch nicht berücksichtigt. Zum einen ist das die Interaktion zwischen den Kopfgruppen. Im Fall von ionischen Tensiden kann die Interaktion der Kopfgruppen zusätzlich durch das Vorhandensein von Salzen beeinflusst werden. Zum anderen hat für nicht-ionische Tenside die Temperatur einen größeren Einfluss als die Salzkonzentration und muss ebenfalls berücksichtigt werden.

#### **2.4.3.2 Mikroemulsionen**

Thermodynamisch stabile, optisch isotrope und transparente, einphasige und niederviskose Mischungen aus Wasser, einem Kohlenwasserstoff und einem Tensid werden als Mikroemulsionen bezeichnet. Mikroemulsionen können zudem als vierte Komponente ein Cotensid enthalten. Meist ist dies ein aliphatischer Alkohol mittlerer Kettenlänge. Nach Winsor können vier Arten von Phasengebieten mit der Mikroemulsionsphase unterschieden werden und in einem Dreiecksdiagramm dargestellt werden.

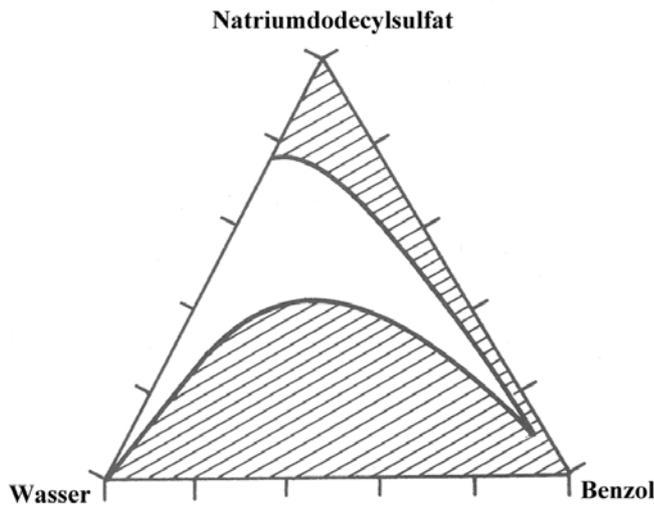
Typ I: Zweiphasengebiet aus einer Ölphase und der Mikroemulsionsphase

Typ II: Zweiphasengebiet aus einer Wasserphase und der Mikroemulsionsphase

Typ III: Dreiphasengebiet aus Wasserphase, Ölphase und Mikroemulsionsphase

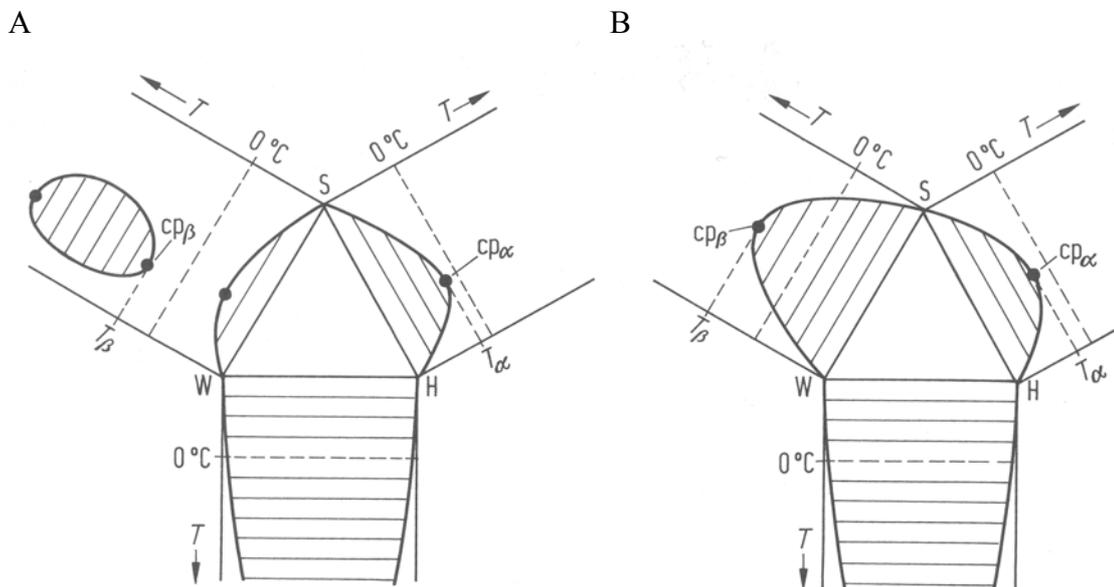
Typ IV: Einphasengebiet der Mikroemulsionsphase

In Abbildung 10 ist das Dreiecksdiagramm eines aus Wasser, Benzol und Natriumdodecylsulfat bestehenden Systems dargestellt. Der weiße Bereich ist das Existenzgebiet der Mikroemulsion. Das Dreiecksdiagramm in Abbildung 10 setzt eine konstante Temperatur voraus. Um das Phasenverhalten tensidhaltiger Mehrkomponentensysteme genauer charakterisieren zu können, ist die Aufnahme von Diagrammen als Funktion der Temperatur erforderlich.



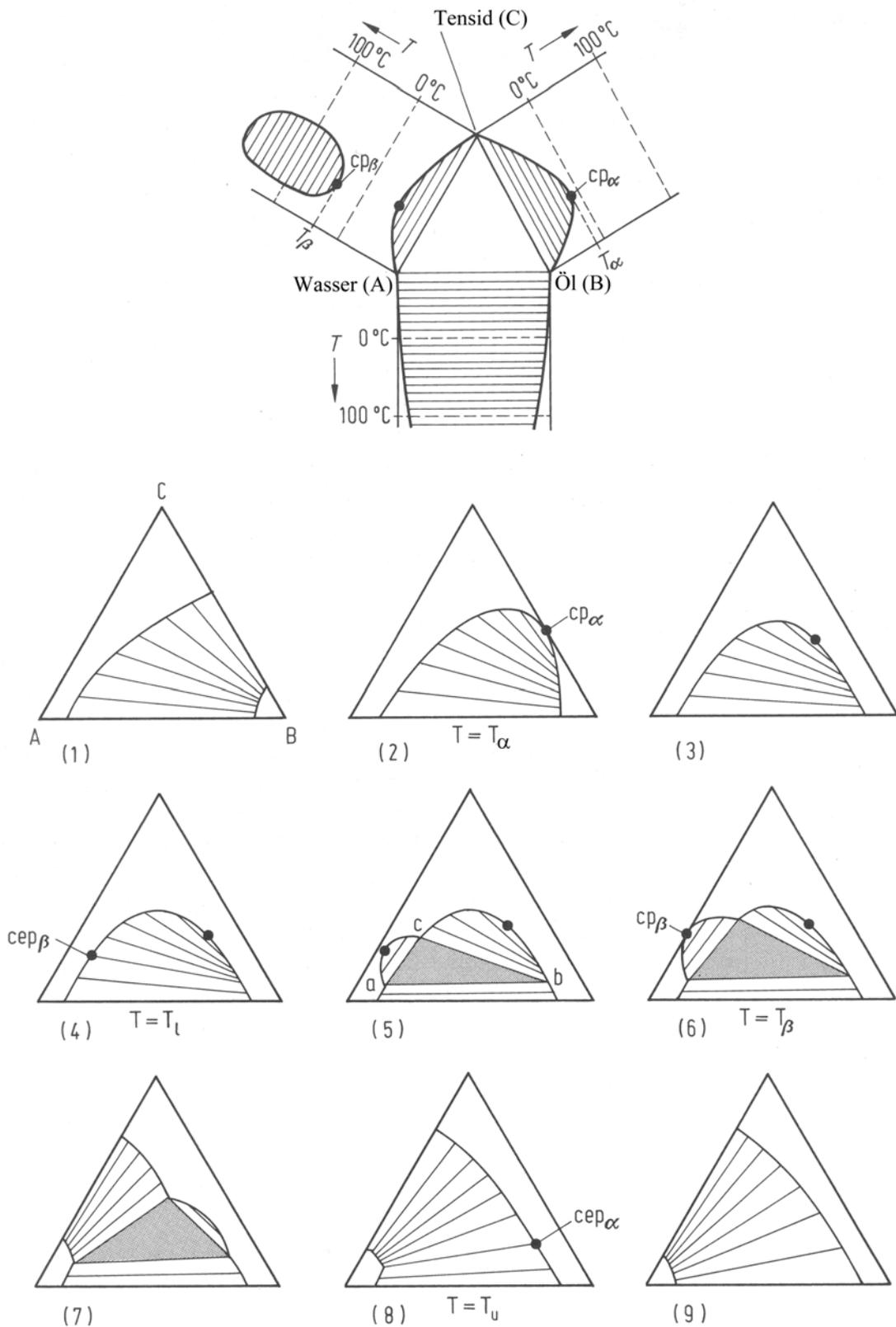
**Abbildung 10** Dreiecksdiagramm eines Systems aus Wasser, Benzol, Natriumdodecylsulfat und Ethanol als Cotensid bei einem Gewichtsverhältnis Tensid : Cotensid = 1 : 2 und 25 °C (Kosswig und Stache, 1993).

Die Temperatur hat einen wesentlichen Einfluss auf die Existenzbereiche der einzelnen Phasen. Somit ergeben sich Phasenprismen mit einem Dreieck als Grundfläche und der Temperatur als Höhe des Prismas wie in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11** Schematische Darstellung aufgefalteter Phasenprismen ternärer Systeme aus Wasser (W), Tensid (S) und einem Kohlenwasserstoff (H). A: nicht-ionisches Tensid. B: ionisches Tensid (Kosswig und Stache, 1993).

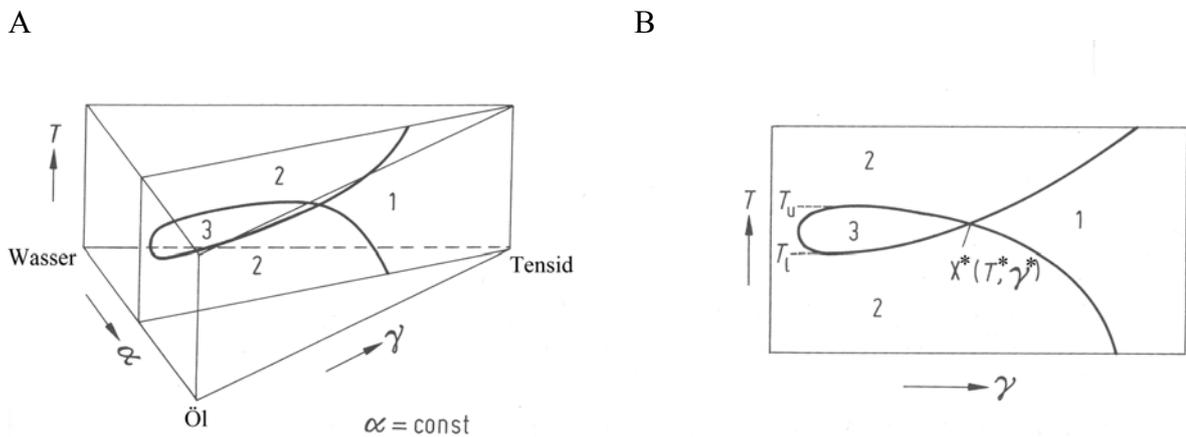
Die drei binären Phasendiagramme der Komponenten Wasser-Tensid, Öl-Tensid und Öl-Wasser dienen dazu, das Phasenverhalten des Dreikomponentensystems darzustellen. Es wird dabei von der Tatsache ausgegangen, dass die Zweikomponentensysteme abhängig von den einzelnen Komponenten unterschiedlich große Mischungslücken bei unterschiedlichen Temperaturen aufweisen. In Abbildung 11 wird gezeigt, dass sich die Mischungslücke (schraffierter Bereich) für das System Wasser-Öl fast über den gesamten Bereich des Diagramms erstreckt. Die beiden anderen Phasendiagramme sind stark von der Art des Tensids abhängig. Ein nicht-ionisches Tensid ist bei tiefen Temperaturen besser in Wasser löslich als in der Ölphase. Im Fall von hohen Temperaturen ist es jedoch schlechter in Wasser löslich und dafür besser in der Ölphase. Ein ionisches Tensid hingegen weist das umgekehrte Verhalten auf. Die drei binären Phasendiagramme dienen nun dazu ein ternäres Phasendiagramm zu entwickeln. In Abbildung 12 ist dies für ein System bestehend aus Wasser (A), Öl (B) und einem nicht-ionischen Tensid (C) unter dem Einfluss steigender Temperatur gezeigt. Abbildung 12.1 zeigt das Phasenverhalten bei tiefer Temperatur ( $T < T_\alpha$ ). In diesem Fall weisen die Systeme Öl-Wasser und Öl-Tensid ein Zweiphasengebiet auf, das sich von einer Achse durch das Phasengebiet zur anderen Achse zieht. Wasser und Tensid sind im gesamten Bereich mischbar, und dieses Einphasengebiet zieht sich ein Stück in das Diagramm hinein. In der Ecke des Öls befindet sich ein weiteres wesentlich kleineres Einphasengebiet. Steigt die Temperatur auf die kritische Temperatur  $T_\alpha$  des Systems Öl-Tensid an, berührt das Zweiphasengebiet die Öl-Tensid-Achse nur noch in einem Punkt (Abbildung 12.2). Liegt die Temperatur über  $T_\alpha$  aber noch unterhalb der unteren kritischen Temperatur für das System Wasser-Tensid ( $T_\beta$ ), so erstreckt sich das Einphasengebiet über den gesamten Mischungsbereich von Wasser-Tensid als auch zusätzlich über den Mischungsbereich Öl-Tensid. Die Mischungslücke besteht jetzt nur noch über der Achse Wasser-Öl und ragt in das Diagramm hinein (Abbildung 12.3). Der kritische Punkt  $cp_\beta$  des Systems Wasser-Tensid liegt in Abbildung 12.4 noch innerhalb des Primas. Abbildung 12.5 zeigt die Ausbildung eines dreieckigen Dreiphasengebiets. An die drei Seiten grenzen jeweils Zweiphasengebiete und die Ecken haben Kontakt zum Einphasengebiet. Wird nun die kritische Temperatur  $T_\beta$  für das System Wasser-Tensid erreicht, so stößt das neugebildete Zweiphasengebiet an die Wasser-Tensid Achse und bildet somit dort eine Mischungslücke im Wasser-Tensid-System (Abbildung 12.6).



**Abbildung 12** Schematische Darstellung der Entwicklung eines ternären Phasendiagramms bei steigenden Temperaturen unter Verwendung eines nicht-ionischen Tensids (Kosswig und Stache, 1993).

Steigt die Temperatur weiter an, so verbreitert sich die Mischungslücke auf der Wasser-Tensid-Achse (Abbildung 12.7). Durch den Temperaturanstieg löst sich das Dreiphasengebiet in ein Zweiphasengebiet auf (Abbildung 12.8). In Abbildung 12.9 ist nur noch ein Zweiphasengebiet vorhanden, welches sich von der Wasser-Öl-Achse zur Wasser-Tensid-Achse zieht. Das Dreiphasengebiet ist also nur in einem gewissen Temperaturbereich, zwischen den charakteristischen Temperaturen  $T_l$  und  $T_u$ , vorhanden. Wird statt des nicht-ionischen Tensids ein ionisches Tensid eingesetzt, so kehrt sich das Phasenverhalten bezüglich der Temperatur um. Das Zweiphasengebiet zieht sich dann bei tiefen Temperaturen von der Wasser-Öl-Achse zur Wasser-Tensid-Achse und bei Erhöhung der Temperatur schließlich von der Wasser-Öl-Achse zur Öl-Tensid-Achse.

Um das Phasenverhalten eines Systems schnell abschätzen zu können, kann ein alternatives Verfahren angewendet werden (Kahlweit und Strey, 1986). Dazu wird das Verhältnis Öl-Wasser ( $\alpha$ ) konstant gehalten und lediglich die Tensidkonzentration ( $\gamma$ ) verändert. Die verschiedenen Systeme werden erhitzt, und die Anzahl der sich bildenden Phasen wird in Abhängigkeit der Temperatur beobachtet. Daraus resultiert die in Abbildung 13 gezeigte Darstellung der Phasen, die auch als Fischdiagramm bezeichnet wird.



**Abbildung 13** Schematische Darstellung eines vertikalen Schnitts durch das Phasenprisma des Systems Tensid-Wasser-Öl bei einem konstanten Mischungsverhältnis Wasser : Öl von 1:1 (Kosswig und Stache, 1993).

Ab einer bestimmten Tensidkonzentration bildet sich innerhalb der Temperaturen  $T_l$  und  $T_u$  ein Dreiphasengebiet (3) aus. Mit steigender Tensidkonzentration nimmt der

Temperaturbereich dieses Phasengebietes zu und später wieder ab, wodurch der Kopf des Fisches gebildet wird. Ab einer bestimmten Tensidmenge liegt schließlich nur noch ein Einphasengebiet (1) vor, also eine Mikroemulsion von Wasser und Öl. Durch die Temperatur  $T^*$  und die Tensidkonzentration  $X^*$  ist die kleinste Tensidmenge festgelegt, die notwendig ist, um eine Mikroemulsion gleicher Öl- und Wasseranteile herzustellen. Für nicht-ionische Tenside gilt, dass sich unterhalb des Fischkopfes ein Zweiphasensystem (2) mit einer tensidreichen Wasserphase und einer tensidarmen Ölphase ausbildet. Bei hohen Temperaturen bilden sich eine tensidreiche Ölphase und eine tensidarme Wasserphase. Bei ionische Tensiden hingegen gilt der umgekehrte Zusammenhang. Das Phasenprisma kann anstelle der Temperatur auch in Abhängigkeit anderer Parameter dargestellt werden. Die Phasenausbildung wird ebenfalls durch die Zugabe von Salz oder Alkohol beeinflusst. Der Druck spielt eine eher untergeordnete Rolle, da sehr große Druckdifferenzen nötig wären, um das Phasenverhalten zu beeinflussen. Die Zugabe von Salz bewirkt einen Aussalzeffekt bei Tensiden und verringert somit die Wasserlöslichkeit. Auf die Ölphase haben Salze aufgrund ihrer Unlöslichkeit keinen Einfluss. Die Erhöhung der Salzkonzentration wirkt in gleicher Weise wie eine Temperaturerhöhung. Die Wirkungsweise auf ionische und nicht-ionische Tenside ist jedoch unterschiedlich. Im Fall von nicht-ionischen Tensiden hängt der Einfluss von den Anionen nach der Ordnung der Hofmeister-Reihe ab. Bei ionischen Tensiden wirken Salze aufgrund ihrer Ionenstärke. Die Zugabe von Alkoholen erhöhen generell die Löslichkeit von Tensiden im Wasser und im Öl. Daher begünstigen sie die Bildung von Mikroemulsionen.

#### ***2.4.3.3 Extraktion von Biomolekülen mittels inversmizellarer Zweiphasensysteme***

Eine weitere Möglichkeit Proteine und Nukleinsäuren zu extrahieren bieten neben den wässrigen Zweiphasensystemen inversmizellare Zweiphasensysteme. Hierbei wird eine wässrige Lösung in Gegenwart eines Tensids in einer apolaren Phase stabilisiert. Die Aufarbeitung von Biomolekülen findet bei diesem Verfahren in zwei Schritten statt. Während der Hinextraktion werden eine oder mehrere Komponenten in die inversmizellare Phase extrahiert. Die sich im wässrigen Kern der inversen Mizellen befindenden Biomoleküle werden durch das Tensid gegenüber dem organischen Lösungsmittel abgeschirmt. In einem zweiten Schritt, der Rückextraktion, wird das Zielprodukt in eine neue wässrige Phase überführt. Durch Veränderung der Parameter des Extraktionssys-

tems findet ein selektiver Transfer statt. Zusätzlich ist eine Ankonzentrierung durch Variation der Volumenverhältnisse der Phasen während des Aufarbeitungsprozesses möglich.

Zuerst wurde die inversmizellare Extraktion für Proteine beschrieben. Ein sehr umfangreicher Überblick wird von Krishna *et al.* (2002) gegeben. Für die meisten dieser Arbeiten wurde AOT als anionisches Tensid genutzt. AOT bildet in organischen Lösungsmitteln inverse Mizellen mit einem Radius des Wasserkerns von mehr als 17 nm (Maitra, 1984). Die kinetischen und thermodynamischen Aspekte der Extraktionssysteme sind bisher noch nicht vollständig bekannt. Die Kräfte, die den Phasentransfer beeinflussen, als auch die Struktur der Mizellen, wenn Biomoleküle aufgenommen wurden, sind bislang noch nicht geklärt. Offensichtlich können neben den eher kleinen Proteinen auch wesentlich größere Biomoleküle wie Nukleinsäuren (Imre und Luisi, 1982), Plasmide und Bakterienzellen (Häring *et al.*, 1985) aufgenommen werden. Die Verteilung der Biomoleküle zwischen der inversmizellaren Phase und der wässrigen Phase hängt von einer Reihe von Parametern ab. Bezüglich der wässrigen Phase sind Art des Salzes, Ionenstärke und im Fall von Proteinextraktionen zusätzlich der pH-Wert zu nennen. Parameter der inversmizellaren Phase, die den Extraktionsprozess beeinflussen, sind die Konzentration und die Art des Tensids, das verwendete Lösungsmittel und die Verwendung von Cotensiden. Die Temperatur kann ebenfalls eine Rolle spielen (Hentsch *et al.*, 1992a).

#### Einfluss der Ionenstärke

Eine Erhöhung der Ionenstärke in der wässrigen Phase reduziert die elektrostatische Interaktion. Die Wechselwirkung zwischen den hydrophilen Biomolekülen und den polaren Gruppen des Tensids wird durch eine hohe Ionenstärke abgeschwächt. In gleicher Weise wird auch die Abstoßung der Kopfgruppen des Tensids verringert, und es entstehen kleinere Mizellen. Als Konsequenz wird also bei hoher Ionenstärke der wässrigen Phase die Aufnahmefähigkeit der inversen Mizellen gesenkt. Andererseits findet auch bei zu geringer Ionenstärke kein Transfer der Biomoleküle in die inversmizellare Phase statt. Göklen und Hatton (1985) beschreiben diesen Zusammenhang für die Extraktion von Cytochrom C in einem iso-Octan/AOT-System. In diesem Fall ist eine Mindestkonzentration von 100 mM KCl für die Extraktion notwendig.

### Einfluss der Salzart

Neben der Ionenstärke hat auch die Art des Salzes einen Effekt auf den Phasentransfer. Die spezifische Wechselwirkung der Biomoleküle und/oder des Tensids mit den verschiedenen Ionen führt zu unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten im Extraktionssystem (Leser *et al.*, 1986; Luisi *et al.*, 1983; Misiorow und Wells, 1974).

### Einfluss des pH-Wertes

Der pH-Wert spielt für die Extraktion von Proteinen eine bedeutende Rolle, da der pH-Wert der wässrigen Phase die Ladung der Proteine beeinflusst. Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Protein und der Tensidkopfgruppe ist für den Transfer in die inversmizellare Phase entscheidend. Dieser Zusammenhang wurde sowohl für anionische (Göklen und Hatton, 1987) als auch für kationische (Dekker *et al.*, 1986) Tenside bestätigt. Eine Extraktion findet nur bei entgegengesetzt geladenen Proteinen und Tensiden statt.

### Einfluss der Tensidkonzentration und von Tensidmischungen

Durch Erhöhung der Tensidkonzentration kann die Kapazität der inversmizellaren Phase gesteigert werden. Im Fall von Proteinen wurde von Göklen und Hatton (1987) und Woll *et al.* (1987) ein positiver Einfluss auf die Extraktion bei Steigerung der Tensidkonzentration beobachtet, indem für den Transfer in die inversmizellare Phase ein größerer pH-Bereich genutzt werden konnte. In anderen Studien bezüglich der Extraktion von  $\alpha$ -Amylase mit dem kationischen Tensid TOMAC (Methyltrioctylammoniumchlorid) konnten Dekker *et al.* (1987) durch die Zugabe eines nicht-ionischen Tensids eine Verbreiterung des pH-Bereichs für die Extraktion erreichen. Dieser Effekt ist auf die strukturellen Veränderungen der inversen Mizellen zurückzuführen, die bei der Mischung von Tensiden auftreten, wodurch auch die Größe beeinflusst wird.

### Einfluss von Cotensiden

Die genaue Wirkungsweise von Cotensiden ist bislang noch nicht geklärt. Als Cotenside werden häufig verschiedene Alkohole eingesetzt, die sich vermutlich zwischen den Tensidmolekülen anordnen (Jolivald *et al.*, 1990). Die Cotenside schwächen die starke

Abstoßung zwischen den Tensidkopfgruppen ab, wodurch die Größe des inneren Kerns der inversen Mizelle beeinflusst wird (Krei und Hustedt, 1992).

#### *Einfluss des Lösungsmittels*

Die Art des Lösungsmittels hat einen Einfluss auf die Größe der inversen Mizellen und somit auf die Kapazität des Extraktionssystems. Luisi *et al.* (Luisi *et al.*, 1979) konnten wesentliche Unterschiede für den Transfer von  $\alpha$ -Chymotrypsin unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel nachweisen. Goto *et al.* (2004) wiesen ebenfalls einen Einfluss verschiedener organischer Lösungsmittel auf die Effektivität der Extraktion von Nukleinsäuren nach. Lang *et al.* (1988) beobachteten, dass die Mizellgröße mit Zunahme der Molekülgröße des Lösungsmittels abnahm. Demnach können höhermolekulare Lösungsmittel schlechter in die Grenzschicht der Tensidmoleküle eindringen, wodurch die Wechselwirkung zwischen den hydrophoben Resten verstärkt wird.

#### *Verwendung von biospezifischen Liganden*

Die Verwendung von spezifischen Liganden wurde unter anderem von Woll *et al.* (1989) und Poppenborg und Flaschel (1994) beschrieben. Woll *et al.* konnten durch die Verwendung von Octyl- $\beta$ -D-glycopyran den Verteilungskoeffizienten von Concanavalin A verbessern. Poppenborg und Flaschel zeigten, dass das Prinzip der Metallchelate-Protein-Interaktion auch für die Proteinextraktion mittels inverser Mizellen angewendet werden konnte. Zudem führten Poppenborg *et al.* (1997) hierzu weitere Untersuchungen in Verbindung mit GFP (*green fluorescent protein*) durch.

#### ***Inversmizellare Extraktion von Proteinen***

Im Bereich der Proteinaufreinigung wurden inversmizellare Systeme schon häufig beschrieben. An dieser Stelle soll lediglich auf die umfangreiche Literatur bezüglich der Extraktion von Proteinen hingewiesen werden. Die Proteinextraktion mittels inversmizellarer Zweiphasensysteme wird sowohl von Hatton (1989) als auch sehr ausführlich wie eingangs erwähnt von Krishna *et al.* (2002) beschrieben. Es wird ein Überblick über die verwendeten Tenside, Lösungsmittel und Cotenside gegeben, sowie über den Mechanismus der inversmizellaren Extraktion. Darüber hinaus werden die verschiedenen Einflussparameter charakterisiert. Neben den physikalisch-chemischen und biologi-

schen Aspekten werden zudem kinetischer Transfer, mathematische Modellierung und technologische Aspekte betrachtet. Ferner werden Entwicklungen in der inversmizellaren Extraktion diskutiert wie beispielsweise affinitätsbasierte Extraktionen, enzymatische Reaktionen in inversen Mizellen gekoppelt mit Membranprozessen und Extraktionsprozesse in Hohlfasermodule.

### ***Rückextraktion aus der inversmizellaren Phase***

Eine besondere Schwierigkeit stellt die Rückextraktion der Biomoleküle dar. Im Gegensatz zur Hinextraktion wird die Rückextraktion in der Literatur nur selten beschrieben. Es wurde angenommen, dass Faktoren, die die Hinextraktion behindern, sich positiv auf den Transfer der Biomoleküle während der Rückextraktion auswirken würden. Dieser Zusammenhang war jedoch für die Rückextraktion von Proteinen nicht zutreffend, und der Transfer durch Veränderung des pH-Wertes und Erhöhung der Ionenstärke war unzureichend (Carlson und Nagarajan, 1992; Jolivald *et al.*, 1990). Hentsch *et al.* (1992b; 1996) zeigten, dass die Tensidkonzentration bei Proteinextraktionen eine wichtige Rolle spielt. Durch die Verwendung relativ geringer AOT-Konzentrationen (2-20 mM AOT) konnte die Ausbeute während der Extraktion wesentlich gesteigert werden. Im Übersichtsartikel von Krishna *et al.* (2002) werden einige Möglichkeiten zur Verbesserung der Rückextraktion aufgezeigt wie beispielsweise die Verwendung von Silicapartikeln für die Sorption von Proteinen sowie Tensiden und Wasser aus den inversen Mizellen (Leser und Luisi, 1990; Leser *et al.*, 1993) und die Anwendung von Anionenaustauschmaterialien. Ferner werden die Zugabe von Alkohol (Carlson und Nagarajan, 1992; Mathew und Juang, 2005) und die Dehydrierung der inversen Mizellen mit Molekularsieb (Gupta *et al.*, 1994) genannt. Zudem werden Möglichkeiten zur Verbesserung der Rückextraktion durch die Zugabe großer Mengen eines zweiten organischen Lösungsmittels zur Destabilisierung der inversen Mizellen (Wolbert *et al.*, 1989), Temperaturänderung zur Dehydrierung (Dekker *et al.*, 1991; Huang und Chang, 1995) und Zugabe eines entgegengesetzt geladenen Tensids (Jarudilokkul *et al.*, 1999; Mathew und Juang, 2005) aufgezeigt.

Die Rückextraktion von Proteinen konnte ebenfalls durch die Verwendung gemischter inverser Mizellen gesteigert werden. Goto *et al.* (1998) nutzen AOT-DOLPA inverse

Mizellen, um den Transfer von Chymotrypsin unter dem Einfluss von 10 % Alkohol bei der Rückextraktion wesentlich zu verbessern.

Marcozzi *et al.* (1991) zeigten im Rahmen der Extraktion von Proteinen, dass nicht nur die Rückextraktion, sondern schon unterschiedliche Bedingungen während der Hinextraktion wie beispielsweise Salzart und -konzentration einen wesentlichen Einfluss auf die Wiederfindung und Enzymaktivität nach der Rückextraktion haben.

### ***Extraktion von Nukleinsäuren***

Imre und Luisi (1982) beschrieben erstmalig die Extraktion von Nukleinsäuren mit Hilfe von AOT inversen Mizellen. Hierbei wurde eine geringe Menge einer wässrigen DNA-Lösung in die organische Phase injiziert. Das CD-Spektrum der niedermolekularen DNA (5.000 Dalton) zeigte keinerlei Veränderungen. Hingegen wies das CD-Spektrum der 250.000 Dalton Probe Veränderungen auf und lässt aufgrund der  $\psi$ -Form kondensierte DNA vermuten. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass es sich bei den Fragmenten mit Größen von 8 bp und 411 bp um sehr kleine Moleküle handelt. Die Ergebnisse wurden von Pietrini und Luisi (2002) wieder aufgegriffen und weiter untersucht. Zusätzlich wurden DNA enthaltende mizellare Lösungen mittels Lichtstreuungsmessungen untersucht, wobei drei unterschiedliche Aggregatstrukturen beobachtet werden konnten. Die Strukturen wiesen Werte von 5 nm, 100 nm und 1000 nm bezüglich des Radius auf. Leere Mizellen, die lediglich Wasser jedoch keine DNA enthielten hatten eine durchschnittliche Größe von 5 nm. Nach der Zugabe von DNA konnten ebenfalls Aggregate mit Größen von 100 nm und 1000 nm beobachtet werden. Die relativ instabilen 1  $\mu$ m großen Aggregate verschwanden jedoch schon nach wenigen Stunden. Die 100 nm großen Strukturen hingegen waren mindestens einen Tag lang stabil und enthielten DNA in kondensierter als auch in nicht kondensierter Form. Wahrscheinlich können die sehr großen Aggregate auf die Ausbildung von Clustern bestehend aus kleineren Mizellen zurückgeführt werden. Inverse Mizellen mit einem Radius von 100 nm stellen relativ stabile, charakteristische Formen DNA enthaltender Aggregate dar. An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass der DNA-Transfer nur durch Injektion in die inversemizellare Phase in Gegenwart von AOT möglich ist. Ein Extraktionsprozess ist

mit AOT inversen Mizellen aufgrund der gleichen Ladung und daraus resultierenden Abstoßung nicht möglich wie auch von Goto *et al.* (1999) gezeigt wurde.

Budker *et al.* (2002) beschrieben die Kondensierung und Verdichtung von DNA in neutralen inversen Mizellen. Für die Untersuchungen wurde das 5865 kb Plasmid pCI-Luc in Gegenwart von Tetraethylglycoldodecylether ( $C_{12}E_4$ ) in iso-Octan gelöst. Fluoreszenz-Quenching von kovalent an die DNA gebundenem Ethidiumbromid und Rhodamin ließ vermuten, dass die DNA in den inversen Mizellen in kondensierter Form vorlag. Dies zeigte auch das CD-Spektrum der DNA. Zusätzlich wurde die Struktur der DNA mittels Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie untersucht, und es konnten kleine kompakte Strukturen beobachtet werden.

Der Transfer von DNA in eine inversmizellare Phase bestehend aus einem kationischen Tensid und iso-Octan wurde erstmals von Goto *et al.* (1999) beschrieben. Für die Untersuchungen wurden 300 kDa große DNA-Fragmente eingesetzt. Goto *et al.* (2004) führten später sowohl Hin- als auch Rückextraktionen mit DNA-Fragmenten durch und untersuchten verschiedene Variablen bezüglich ihres Einflusses auf die Extraktion. Besonderes Augenmerk wurde auf die Extraktionseffektivität verschiedener Tenside gerichtet. Für die Extraktion wurden Cetyltrimethylammoniumbromid, Methyltrioctylammoniumchlorid (TOMAC) und verschiedene Dimethyldialkylammoniumbromide mit unterschiedlichen Alkylkettenlängen untersucht. Die quartären Ammoniumtenside mit zwei Alkylketten stellten sich als am besten geeignet heraus, und es konnte eine komplette Extraktion der DNA in die inversmizellare Phase erzielt werden. Mit TOMAC und CTAB konnte hingegen nur ein sehr geringer Transfer der DNA erreicht werden. Als Haupteinflussfaktor wird die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem kationischen Tensid und der negativ geladenen DNA beschrieben. Darüber hinaus wurde der Transfer der DNA wesentlich durch die hydrophobe Struktur des von kationischen Tensiden und der DNA gebildeten Komplexes beeinflusst. Tenside mit längeren Alkylketten wirkten sich daher positiv auf die Extraktion aus. Bei Verwendung von Tensiden mit kürzeren Kohlenwasserstoffketten wurde eine Präzipitation an der Phasengrenzfläche beobachtet. Außerdem konnten mit quartären Ammoniumtensiden mit Chlorid als Gegenion bessere Resultate erzielt werden als mit Bromid als Gegenion. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass hier nur der Einfluss verschiedener Tenside in Gegenwart einer salzfreien wässrigen Phase betrachtet wurde. Durch Verwendung geringer Ionenstärken

in der wässrigen Phase kann auch die Effektivität der Extraktionen mit TOMAC und anderen kationischen Tensiden wesentlich gesteigert werden. Dies wurde für die Extraktion von Plasmid-DNA unter Verwendung einer inversmizellaren Phase bestehend aus TOMAC und iso-Octan gezeigt (Streitner *et al.*, 2007). Zudem ist der Transfer der DNA in die inversmizellare Phase unter salzfreien Bedingungen sehr langsam, und es ist somit eine Extraktionszeit von zwei Stunden anstatt weniger Minuten in Gegenwart von Salz notwendig.

Neben dem Einfluss verschiedener Tenside wurde ebenfalls die Beeinflussung durch unterschiedliche Lösungsmittel untersucht. Dabei konnten mit iso-Octan die besten Ergebnisse bezüglich des DNA-Transfers im Rahmen der Hinextraktion erzielt werden. Ein weiterer Faktor, der die Extraktion beeinflusst, ist der Alkohol, der zunächst als Lösungsvermittler in der organischen Phase dient. Goto *et al.* (2004) zeigten, dass sowohl durch Zugabe von Alkohol als auch durch die Steigerung der Salzkonzentration in der wässrigen Phase die Rückextraktion der DNA wesentlich gesteigert werden konnte.

### 3 Material und Methoden

Eine Liste der verwendeten Geräte und Chemikalien befindet sich im Anhang. Soweit nicht anders angegeben, waren alle Chemikalien vom Reinheitsgrad p.A..

#### 3.1 Bakterienstämme und Plasmide

Als Wirtsorganismus für die eingesetzten Plasmide wurde der Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet. Die Plasmide und ihre wichtigsten Eigenschaften sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3** Verwendete Plasmide und ihre wichtigsten Eigenschaften.

<i>Plasmid</i>	<i>Grösse</i>	<i>Replikationsverhalten</i>	<i>Resistenz</i>	<i>Literatur</i>
pUC18	2686 bp	<i>high copy</i>	Ampicillin	(Yanisch-Perron et al., 1985)
pUT649	4618 bp	<i>high copy</i>	Ampicillin	Eurogentec
pUK21CMV $\beta$	7612 bp	<i>high copy</i>	Kanamycin	(Schmidt, 1998)

#### 3.2 Kultivierungsbedingungen

Zur Kultivierung der *E. coli*-Zellen wurde ein halbsynthetisches Glycerinmedium (HSG) verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 4 beschrieben ist.

**Tabelle 4** Zusammensetzung des HSG-Mediums.

<i>Komponente</i>	<i>Konzentration / g L<sup>-1</sup></i>
Sojapepton	13,5
Hefeextrakt	7,0
Glycerin	14,9
NaCl	2,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,14

Als Innokulationskulturen wurden Schüttelkolbenkultivierungen in 1000 mL-Kulturkolben mit Schikanen für 6-8 Stunden ( $OD_{600}$  ca. 7-10) bei 37 °C bei einer Rotationsfrequenz von  $160 \text{ min}^{-1}$  und einer Auslenkung von 25 mm durchgeführt. Das Kulturvolumen betrug 100 mL. Ein Volumen von 30 mL dieser Innokulationskulturen wurden zur Beimpfung einer Kultivierung in einem 30 L-Rührkesselbioreaktor (20 L Arbeitsvolumen, MBR, Schweiz) mit HSG-Medium verwendet. Die Rührerfrequenz der Bioreaktorkultur wurde über die gelöstsauerstoffkonzentration geregelt. Der pH-Wert der Kultur wurde durch Zugabe von Phosphorsäure ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) und Natronlauge (2 M) auf pH 7,0 eingestellt. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase (16-18 Stunden Kultivierungsdauer) wurde die Biomasse durch Zentrifugation (10 min bei  $9600 \text{ min}^{-1}$ , Rotor 12500) in einer SIGMA 6K10 Zentrifuge vom Kulturüberstand getrennt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20 \text{ °C}$  eingefroren.

### 3.3 Alkalische Lyse

Die für die alkalische Lyse verwendeten Puffer sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5** Verwendete Puffer für die alkalische Lyse.

<i>Resuspensionspuffer</i>	<i>Lysepuffer</i>	<i>Neutralisationspuffer</i>
50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH 8,0	0,2 M NaOH 1 % SDS	3 M Kaliumacetat Essigsäure (100 %) zur Einstellung auf pH 5,5

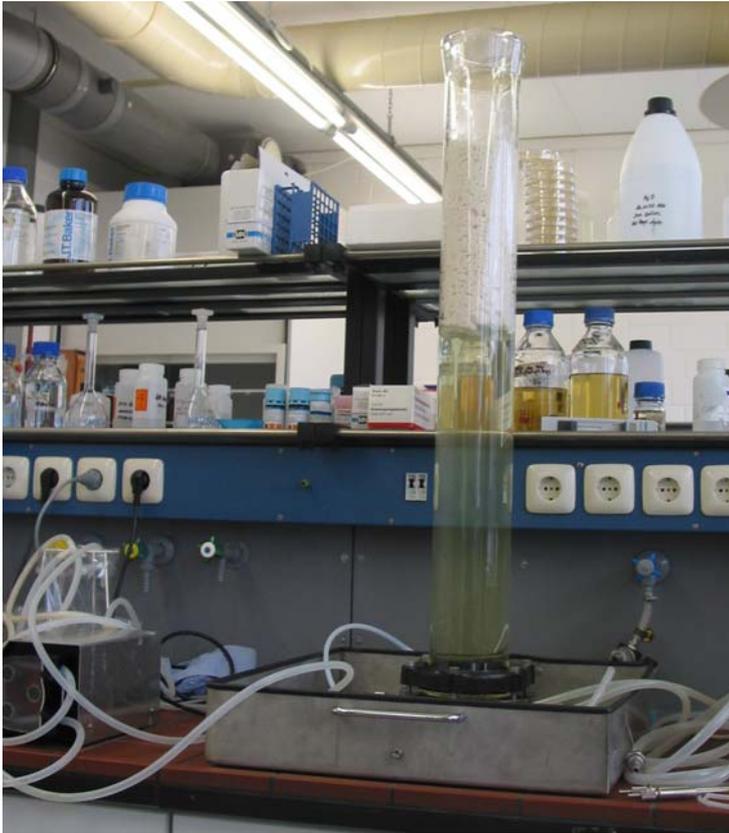
Die in Resuspensionspuffer aufgenommene Biofeuchtmasse ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) wurde mit einem äquivalenten Volumen Lysepuffer 3 Minuten lang lysiert und im Anschluss mit Neutralisationspuffer neutralisiert. Das entstandene Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 min,  $9600 \text{ min}^{-1}$ , Rotor 12500) abgetrennt. Anschließend wurde das Lysat mit Hilfe eines Faltenfilters von Schwebstoffen befreit.

Für die in Kapitel 4.8.1 dargestellten Versuche wurde die Durchmischung und somit die Scherkraftintensität während der Lyse variiert. Die alkalische Lyse wurde unter manuellem Invertieren der Lösungen (1 L-Maßstab, Schottflasche), Rühren mittels Magnetrührkern bei  $400 \text{ min}^{-1}$  (1 L-Maßstab, Schottflasche) und Rühren mit Hilfe eines EKATO-Intermigrierrührers (EKATO Rühr- und Mischtechnik GmbH, Schopfheim, Deutsch-

land) bei  $200 \text{ min}^{-1}$  und  $600 \text{ min}^{-1}$  durchgeführt (3 L-Maßstab). Die Lyse unter Verwendung des Internigrührers wurde in einem 5 L-Gefäß mit einem Innendurchmesser von 17 cm durchgeführt. Der Durchmesser des Rührers betrug 11 cm, wodurch das Verhältnis 0,65 bestand. Der untere Flügel war 3,3 cm über dem Boden positioniert. Der zweite Rührflügel befand sich 8,5 cm über dem ersten.

Ferner wurde eine Flotationssäule für die Lyse verwendet (Voß *et al.*, 2005). Hierbei wurden 2 L Zellsuspension und 2 L Lysepuffer in einem T-Verbindungsstück durch Gegeneinanderströmen mit Hilfe von Peristaltikpumpen (Ecoline VC, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) bei einem Volumenstrom von  $246 \text{ mL min}^{-1}$  gemischt und in einem  $90^\circ$  Winkel in einen Verbindungsschlauch (Länge 224 cm, Durchmesser 0,5 cm, Verweildauer ca. 27,3 Sekunden) zur Flotationssäule (Durchmesser 10 cm) weitergeleitet. Durch die Begasung mit Druckluft mittels einer gesinterten Metallplatte (Durchmesser 9,2 cm) des Neutralisationspuffers (2 L) in der Flotationssäule wurde das gebildete Präzipitat durch einfache Schaumflotation abgetrennt. Eine weitere Klärung des Lysats war nicht erforderlich. Die Flotationssäule, der Säulenfuß und die gesinterte Metallplatte sind in Abbildung 14 dargestellt.

A



B



C



**Abbildung 14** A: Flotationssäule, B: Säulenfuß, C: gesinterte Metallplatte

### 3.4 Aufarbeitung der Nukleinsäuren für den Einsatz als Modellsubstanzen

Plasmid-DNA und RNA wurden mit Hilfe eines GradiFrac FPLC-Systems (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) aufgearbeitet. Die Zusammensetzung der für die chromatographische Aufarbeitung verwendeten Puffer ist Tabelle 6 zu entnehmen.

**Tabelle 6** Zusammensetzung der Puffer für die chromatographische Aufarbeitung.

<i>Gelfiltration</i>	<i>Anionenaustauschchromatographie</i>	
<i>Ammoniumsulfatpuffer</i>	<i>Äquilibrierungspuffer</i>	<i>Elutionspuffer</i>
2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 M NaCl	1,0 M NaCl
10 mM EDTA	10 mM EDTA	10 mM EDTA
100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl
pH 7,0	pH 7,0	pH 7,0

Das nach der alkalischen Lyse erhaltene Klarlysat wurde in mehreren Chargen (150-200 mL) auf eine mit 450 mL Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) gepackte XK50/30-Säule (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) geladen, nachdem die Säule mit Ammoniumsulfatpuffer äquilibriert wurde. Die lineare Fließgeschwindigkeit (Leerrohrgeschwindigkeit) betrug 30 cm h<sup>-1</sup>. Die aufgefangenen Fraktionen der Plasmid-DNA bzw. RNA wurden vereinigt und mit dem 1,5fachen Volumen Wasser verdünnt. Sowohl Plasmid-DNA als auch RNA wurde anschließend durch Anionenaustauschchromatographie mit Hilfe einer mit 25 mL Fractogel DEAE (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefüllten XK16/20-Säule (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) weiter aufgereinigt. Die Säule wurde mit 0,5 M NaCl-Puffer äquilibriert und bei einer linearen Fließgeschwindigkeit (Leerrohrgeschwindigkeit) von 120 cm h<sup>-1</sup> mit der Probe beladen. Anschließend wurde mit 10 Säulenvolumina des Äquilibrierungspuffers gewaschen. Für die Elution wurde ein linearer Gradient über 5 Säulenvolumina gegen 1,0 M NaCl-Puffer verwendet. Im Anschluss an die Chromatographie wurden die Nukleinsäuren durch Zugabe des 0,7fachen Volumens 2-Propanol präzipitiert. Nach der Zentrifugation bei 10000 min<sup>-1</sup> (Rotor 12169) für 30 Minuten wurden die Nukleinsäuren mit 70 % kaltem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) aufgenommen. Die Aufreinigung

wurde, wie unten beschrieben, durch Agarosegelelektrophorese nach Standardlabor-technik (Sambrook *et al.*, 1989) überprüft.

### ***3.5 Diafiltration***

#### ***Umpufferung plasmidhaltiger Lösungen***

Das bakterielle Klarlysat wurde wie oben beschrieben generiert. Um störende Einflüsse durch oberflächenaktive Substanzen und prozessbedingte hohe Salzkonzentrationen bei der Bildung inverser Mizellen oder auf das Verteilungsverhalten während der Extraktion auszuschließen, wurden diese durch Diafiltration entfernt. Maßstabsabhängig wurden eine 100 kDa Polyethersulfonmembran (Austauschfläche 50 cm<sup>2</sup>, Millipore, Eschborn, Deutschland) oder eine 100 kDa Hydrosart Sartocoonmembran (Austauschfläche 0,1 m<sup>2</sup>, Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit Membranhalter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) eingesetzt. Das Volumen wurde dreimal mit 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) ausgetauscht. Die Reinigung und Handhabung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die wässrige Extraktphase nach der Rückextraktion wurde auf gleiche Weise diafiltriert.

Die Polyethersulfonmembran wurde mit einer Peristalrikpumpe (Ecoline VC, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) betrieben. Mit der Hydrosartmembran wurden größere Volumina unter Verwendung einer Zahnradpumpe (IWAKI Europe GmbH, Willich, Deutschland) diafiltriert. Der Volumenstrom wurde mit einem induktiven Durchlaufmesser (Krohne Messtechnik GmbH & Co. KG, Duisburg, Deutschland) bestimmt, und der Druck wurde mit Hilfe einer Druckmesseinheit von WIKA (WIKA, Klingenberg, Deutschland) gemessen. Mittels eines Druckregelventils (Badger Meter Europa GmbH, Neuffen, Deutschland) auf der Retentatseite konnte der Permeatfluss gesteigert werden.

#### ***Herstellung endotoxinfreier Puffer***

Im Rahmen der Endotoxinabreicherung mittels inversmizellarer Extraktion wurden für diese Versuche endotoxinfreie Puffer eingesetzt. Hierzu wurden die Lösungen durch eine 5 kDa Polyethersulfonmembran (Austauschfläche 50 cm<sup>2</sup>, Millipore, Eschborn, Deutschland) filtriert.

### ***3.6 Inversmizellare Extraktion***

#### ***Hinextraktion***

Die aufgereinigten Nukleinsäuren bzw. das diafiltrierte Klarlysat wurde unter Verdünnung um den Faktor 2 mit salzhaltigem 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) auf die gewünschte Ionenstärke eingestellt. Die Angaben zu den verwendeten Salzen und Konzentrationen bei den jeweiligen Versuchen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Die wässrige Zulaufphase wurde mit der inversmizellaren Phase bestehend aus 40 mM TOMAC oder einem Dialkyldimethylammoniumhalogenid und Alkohol als Lösungsvermittler in iso-Octan durch über Kopf Rotieren auf einem Rotationsschüttler bei einer Drehfrequenz von  $100 \text{ min}^{-1}$  gemischt. Der verwendete Rotationsschüttler ist in Abbildung 15 dargestellt. Angaben zur Rotationsdauer befinden sich im Ergebnisteil. Die verwendeten Alkohole und eingesetzten Konzentrationen bei den jeweiligen Versuchen sind ebenfalls im Ergebnisteil angegeben. Die Phasentrennung erfolgte durch 5-minütige Zentrifugation bei  $5000 \text{ min}^{-1}$  (Rotor 3325).

#### ***Rückextraktion***

Die inversmizellare Phase aus der Hinextraktion wurde mit einer neuen wässrigen Phase mit bestimmten Salz- und Alkoholkonzentration gemischt. Die Angaben bezüglich der verwendeten Salze und Alkohole sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Die Phasentrennung fand unter den oben genannten Bedingungen statt.

Angaben zu den Volumenverhältnissen von wässriger Phase zu inversmizellarer Phase bei der Hin- und Rückextraktion sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.



**Abbildung 15** Rotationschüttler

### ***3.7 Chromatographische Verfahren***

#### ***3.7.1 Anionenaustauschromatographie mit Fractogel DEAE***

Zur weiteren Aufarbeitung der wässrigen Extraktphase nach der Rückextraktion im Rahmen der Extraktion mit verdünntem Klarlysat wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit Fractogel DEAE unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

#### ***3.7.2 Plasmidformentrennung mittels Plasmid Select***

Die wässrige Extraktphase nach der Rückextraktion unter Verwendung von 2,5 M Ammoniumsulfat wurde zur Trennung von oc-Form und ccc-Form des Plasmids auf eine, mit *PlasmidSelect* (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) gefüllte XK16/20-Säule (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit 2,5 M Ammoniumsulfatpuffer (2,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 7,0) äquilibriert wurde. Die Leerrohrgeschwindigkeit betrug  $120 \text{ cm h}^{-1}$ . Anschließend wurde mit 10 Säulenvolumina Ammoniumsulfatpuffer gewaschen und über 11 Säulenvolumina gegen Wasser eluiert.

### 3.8 Analytik

#### 3.8.1 Agarosegelelektrophorese

Um das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren im Extraktionssystem zu untersuchen, wurden die wässrigen Extraktphasen mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Proben auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und bei einer Feldstärke von  $5 \text{ V cm}^{-1}$  getrennt. Die Nukleinsäurebanden wurden mit einer wässrigen Ethidiumbromidlösung ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  Ethidiumbromid) für 20-30 Minuten gefärbt und in Wasser für weitere 10 Minuten entfärbt. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Transilluminator, und die Agarosegele wurden mit Hilfe einer E.A.S.Y. Geldokumentationssoftware (Herolab, Wiesloch, Deutschland) dokumentiert und analysiert. Zum Vergleich wurde zusätzlich ein DNA-Marker (Gene Ruler 1 kb DNA ladder, Fermentas, Burlington, Ontario) auf die Agarosegele aufgetragen.

#### 3.8.2 Kapillargelelektrophorese

Zur Untersuchung der Plasmidformenverteilung wurde eine P/ACE MDQ Kapillarelektrophoreseapparatur (Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA) verwendet. Die Trennung der Plasmidformen erfolgte nach der von Schmidt *et al.* (1999) beschriebenen Methode. Hierzu wurde eine Probe mit 50-100 ng Plasmid-DNA mit  $45 \mu\text{L}$  Probenpuffer gefärbt. Die gefärbte Probe wurde anschließend in eine 50 cm lange (Laser induzierte Fluoreszenzdetektion nach 40 cm) DB-17-Kapillare (Agilent, Waldbronn, Deutschland) injiziert, die zuvor mit Separationspuffer gespült wurde. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 7 beschrieben.

**Tabelle 7** Zusammensetzung der Puffer für die Kapillargelelektrophorese.

<i>TBE-Puffer</i>	<i>Separationspuffer</i>	<i>Probenpuffer</i>
89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,4	0,1 % (v/v) Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) 4000cP 67 $\mu\text{M}$ YOYO in TBE-Puffer	1,44 $\mu\text{M}$ YOYO in TBE-Puffer

Die Plasmidformentrennung wurde bei einer Spannung von  $100 \text{ V cm}^{-1}$  durchgeführt, und die Signale wurden mit einem Laser induzierten Fluoreszenzdetektor bei 522 nm (Anregungswellenlänge 488 nm) detektiert. Für die Quantifizierung der Plasmidisoformen wurden die auf die Migrationszeit normierten Peakflächen für jede Isoform berechnet.

### 3.8.3 Bestimmung der Plasmidkonzentration

Bei den Extraktionsversuchen unter Verwendung der aufgereinigten Nukleinsäuren wurde die Konzentration der Plasmid-DNA und RNA durch Messung der Absorption bei 260 nm in einer Quarzglas-Mikrotiterplatte (Hellma, Mülheim, Deutschland) bestimmt. Die Messungen wurden mit Nukleinsäurestandards kalibriert. Im Rahmen der Extraktionsversuche aus Klarlysat wurden die Proben zur Abreicherung der RNA zunächst mit RNase behandelt. Die anschließende Aufarbeitung der Proben erfolgte mit *Qiagen Plasmid Mini Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland). Zunächst wurden die *tip-20*-Säulen mit 1 mL Puffer QBT äquilibriert. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist

Tabelle 8 zu entnehmen. Ein geeignetes Volumen der Proben wurde auf die Säulen gegeben. Danach wurden die Säulen zweimal mit je 2 mL Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 0,8 mL Puffer QF von der Säule eluiert. Auf eine anschließende Fällung der Proben wurde verzichtet, um daraus resultierende Verluste und somit eine Verfälschung des Messergebnisses zu vermeiden. Die Bestimmung der Plasmidkonzentration im Eluat erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm in einer UV-Mikroliterküvette.

**Tabelle 8** Zusammensetzung der Puffer für den *Qiagen Plasmid Mini Kit*.

<i>Puffer QBT</i>	<i>Puffer QC</i>	<i>Puffer QF</i>
750 mM NaCl	1,0 M NaCl	1,25 M NaCl
50 mM MOPS	50 mM MOPS	50 mM MOPS
pH 7,0	pH 7,0	pH 8,5
15 % (v/v) 2-Propanol	15 % (v/v) 2-Propanol	15 % (v/v) 2-Propanol
0,15 % (v/v) Triton X-100		

### **3.8.4 BCA-Test**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde als Referenz eine BSA-Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0,01-0,1 g L<sup>-1</sup> in 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) angelegt. Ein Volumen von 1 mL der BCA-Arbeitsreagenz (50 mL BCA<sup>TM</sup> Protein Reagent A, 200 µL Kupfersulfatlösung (Konzentration der Kupfersulfatlösung 40 g L<sup>-1</sup>)) wurden mit 50 µL Probe gemischt und für 60 Minuten bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten auf Eis abgekühlt und bei 562 nm vermessen.

### **3.8.5 Quantifizierung chromosomaler DNA mittels Q-PCR**

Die Quantifizierung der chromosomalen DNA wurde mit Hilfe eines *QuantiTect*<sup>®</sup> *SYBR*<sup>®</sup> *Green PCR-Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurde eine Standardreihe erstellt. Zu diesem Zweck wurde die mittels eines *Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA) aus *E. coli* DH5α isolierte chromosomale DNA nach Konzentrationsbestimmung durch Messung der Absorption bei 260 nm in sterilem Wasser auf Konzentrationen von 150, 50, 10, 5 und 1 ng µL<sup>-1</sup> verdünnt. Die Standards wurden um den Faktor 1:1000 weiter verdünnt, und jeweils 5 µL hiervon wurden pro PCR eingesetzt.

Für einen PCR-Ansatz wurden 10 µL Mastermix (*HotStarTaq*<sup>®</sup> DNA-Polymerase, *QuantiTect SYBR Green PCR Puffer*, dNTP-Mix (enthält dUTP), *SYBR Green I*, *Rox-Passive Referenz*, MgCl<sub>2</sub> (5 mM)), je 1 µL Primer (pykA, 20 mg L<sup>-1</sup>), 3 µL steriles, RNase-freies Wasser und 5 µL Probe eingesetzt. Die Sequenzen der Primer befinden sich im Anhang. Die Proben wurden zuvor entsprechend des erwarteten DNA-Gehaltes verdünnt. Sowohl für die Proben, als auch für die Standards wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die PCR wurde im Rotorgene-Thermocycler (Corbett Life Science, Sydney, Australien) gemäß dem in Tabelle 9 beschriebenen Programm (45 Zyklen) durchgeführt und mit der Rotorgene Software 6.0.19 (Corbett Life Science, Sydney, Australien) ausgewertet.

**Tabelle 9** Programmparameter der Q-PCR.

<i>Programmschritt</i>		<i>Temperatur / °C</i>	<i>Zeit / sec</i>
Hold	Aktivierung HotStart Polymerase	95	15 min
Cycling	Denaturierung	95	15
	Annealing	53	30
	Elongation	72	30
		80	55

### 3.8.6 Endotoxinbestimmung mittels LAL-Test

Zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration wurde ein *Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kinetic QCL*<sup>®</sup> (Cambrex, Walkersville, USA) gemäß Herstelleranweisungen verwendet. Der Test basiert auf einer enzymatischen Reaktion eines in den Amebocyten des Blutes von Pfeilschwanzkrebsen (*Limulus*) vorkommenden Enzyms, dass bei Kontakt mit Endotoxinen gerinnt (Pearson und Weary, 1980). Die Reaktion wird kalorimetrisch durch die Umsetzungskinetik von p-Nitroanilin nachgewiesen. Die Reaktionskinetik wurde mit einem Spektramax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) aufgenommen. Für die Quantifizierung wurde eine Standardreihe des *E. coli* 055:B5 Endotoxins mit Konzentrationen von 0,005-50 E.U. mL<sup>-1</sup> erstellt.

### 3.8.7 Tensidnachweis

Zum Nachweis geringer Mengen TOMAC in der wässrigen Extraktphase nach der Rückextraktion wurde eine Zweiphasentitration durchgeführt. Der Tensidnachweis basiert auf dem von Wickbold (1976) beschriebenen Verfahren. Dabei bilden die Tensidkationen mit dem Tetraphenylboratanion salzartige, stöchiometrische Verbindungen. Diese haben ein kleineres Löslichkeitsprodukt als die Tensidkation-Farbstoff-Salze.

Für den Nachweis wurden 20 mL der wässrigen Extraktphase in einen 250 mL-Schüttelzylinder pipettiert, mit 50 mL H<sub>2</sub>O verdünnt, mit 5 mL Puffer pH 3 (0,25 M Citronensäure, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 2 Tropfen einer 0,15 %igen Methylorangefärbung und 30 mL Chloroform versetzt. Anschließend wurde der Zylinder kräftig geschüttelt. Die Tetraphenylborat-Maßlösung (0,01 M Na[B(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>]) wurde im Zweiphasensystem un-

ter jeweiligem Schütteln titriert, bis sich die Emulsion mehr und mehr auflöste. Zu Beginn der Titration war der Farbindikator in der Chloroformphase, die durch das Tensid im Wasser emulgiert wurde. Nahe dem Extraktionspunkt trennten sich die Phasen schneller. Der Endpunkt wurde erreicht, wenn die gelbe Färbung der  $\text{CHCl}_3$ -Phase verschwunden war und die wässrige Phase rot wurde.

## ***4 Ergebnisse und Diskussion***

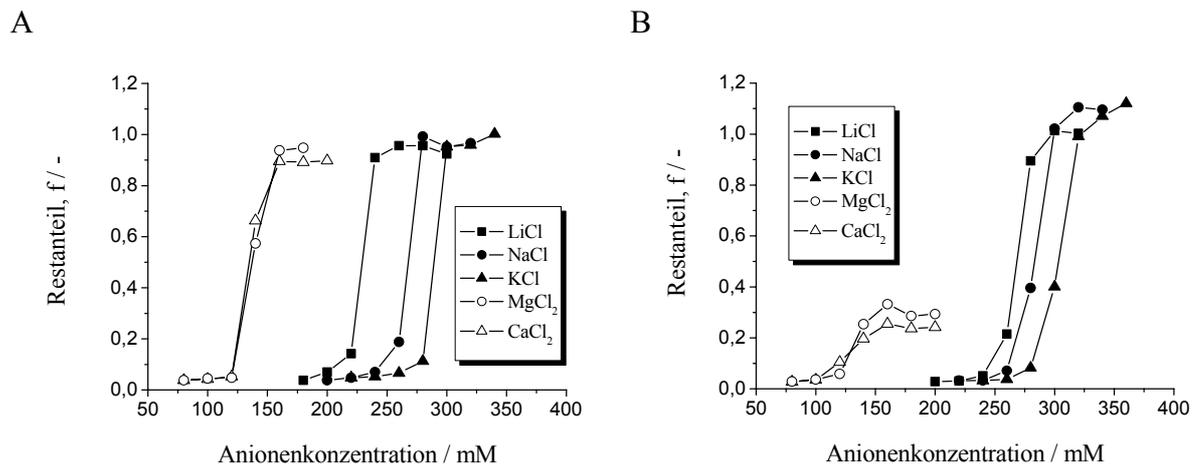
### ***4.1 Einflussfaktoren bei der Extraktion von Nukleinsäuren***

Während der ersten Versuche wurden die Verfahrensvariablen untersucht, die das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren im Extraktionssystem bei der Hinextraktion beeinflussen. Hierzu zählen die Art des Salzes und Ionenstärke in der wässrigen Phase, sowie Struktur und Konzentration des Alkohols, der als Lösungsvermittler in der organischen Phase verwendet wird. Weitere Einflussgrößen stellen das verwendete Tensid und das Lösungsmittel der organischen Phase dar.

#### ***4.1.1 Einfluss verschiedener Salze und Salzkonzentrationen auf das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren***

Um den Einfluss verschiedener Salze und Salzkonzentrationen auf das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren zu untersuchen, wurden zunächst Plasmid-DNA und RNA aus *E. coli* isoliert und aufgereinigt und als Modellsubstanzen eingesetzt. Somit konnten Einflüsse, die sich aus der Verwendung von bakteriellem Klarlysat ergeben, zunächst vernachlässigt werden. Die aufgereinigte Plasmid-DNA bzw. RNA wurde mit verschiedenen Salzlösungen in 10 mM Tris-Puffer verdünnt. Bei allen mit Modellsubstanzen durchgeführten Extraktionen wurde der pH-Wert der wässrigen Zulaufphase auf 7,0 eingestellt. Die Plasmid-DNA-Konzentration in der wässrigen Phase betrug  $25 \text{ mg L}^{-1}$  während die RNA-Konzentration  $250 \text{ mg L}^{-1}$  betrug. Diese Konzentrationen spiegeln in etwa die in einem bakteriellen Klarlysat vorhandenen Mengen und Konzentrationsverhältnisse wieder. Die Nukleinsäuren wurden mit 40 mM TOMAC und 0,5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan extrahiert. Das Phasenverhältnis von wässriger Phase zu inversmizellarer Phase betrug bei diesen Versuchen 1:1. Zunächst wurden die Phasen zur Durchmischung 2 Stunden auf einem Rotationsschüttler invertiert. Spätere Versuche zeigten, dass schon wenige Minuten für eine vollständige Extraktion ausreichend sind. In Abbildung 16 ist das Verteilungsverhalten von Nukleinsäuren am Beispiel von pUT649 und *E. coli* RNA in Gegenwart verschiedener Alkali- und Erdalkalimetallchloride dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass nicht nur die Anionenkonzentration einen Einfluss auf die Extraktion der Nukleinsäuren hat, sondern auch der Kationentyp.

Die Extraktionspunkte für  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$  liegen bei 140-160 mM Chlorid sowohl für RNA als auch für pUT649. Als Extraktionspunkt wird die Konzentration bezeichnet, bei der sich das Verteilungsverhalten der Nucleinsäuren umkehrt. Bei Extraktionen mit  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$  konnte eine Präzipitation der RNA an der Phasengrenzfläche im System beobachtet werden, was sich in einem deutlich geringeren Restanteil in der wässrigen Phase widerspiegelt (Abbildung 16B). Im Fall der Alkalimetallchloride liegt der Extraktionspunkt für LiCl bei 240 mM, für NaCl bei 280 mM und KCl bei 300 mM für Extraktionen mit pUT649. Die Extraktionspunkte der RNA weichen mit 280 mM für LiCl, 300 mM für NaCl und 320 mM für KCl von denen der Extraktion mit Plasmid-DNA ab. Dieser Unterschied im Verteilungsverhalten eröffnet die Möglichkeit RNA von Plasmid-DNA schon während der Hinextraktion zu trennen. Eine Übersicht der Extraktionspunkte für die verschiedenen Salze ist in Tabelle 10 gegeben.



**Abbildung 16** Restanteil des Plasmids pUT649 (A) und *E. coli* RNA (B) in der wässrigen Phase nach der Extraktion mit 40 mM TOMAC und 0,5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan unter dem Einfluss verschiedener Metallchloride (Streitner *et al.*, 2007).

Für die Bestimmung und Darstellung der Extraktionspunkte wurde die Anionenkonzentration gewählt. Die Anionen der Salze stehen bezüglich der elektrostatischen Wechselwirkung mit den Tensidkopfgruppen in Konkurrenz zu den Nucleinsäuren. Die Kationenkonzentration hätte ebenfalls zur Darstellung der Extraktionspunkte genutzt werden können. Im Fall der Alkalimetallchloride würde dies keinen Unterschied bedeuten. Lediglich für die Erdalkalimetallchloride würden die Extraktionspunkte bei Betrachtung der Kationenkonzentration geringere Werte annehmen. Die Reihenfolge der Extrak-

tionspunkte würde sich jedoch nicht ändern. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Extraktionspunkte in Abhängigkeit der Ionenstärke darzustellen. Die Ionenstärke kann aus den Konzentrationen der Ionen berechnet werden und ist durch die folgende Gleichung definiert:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

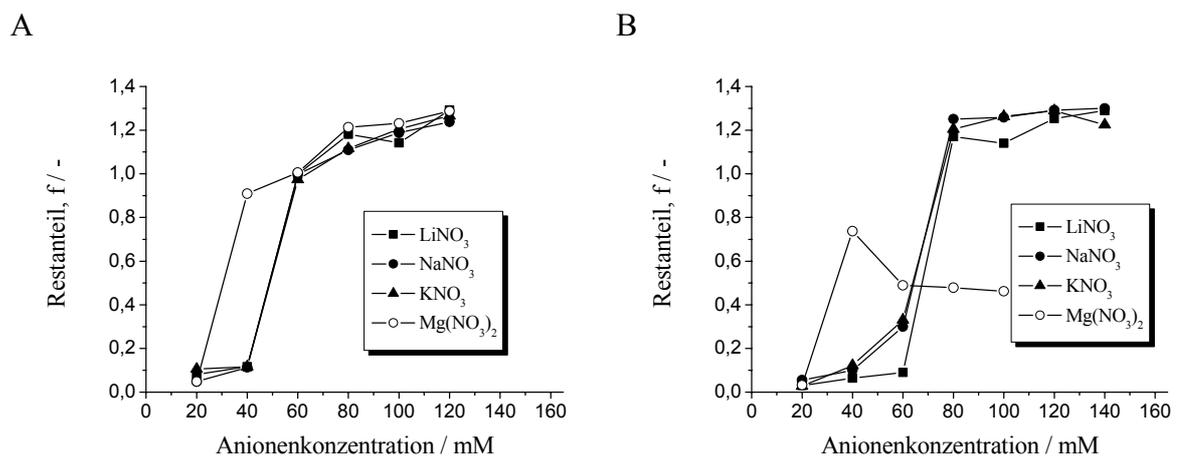
$n$  = Anzahl der Ionenarten

$c$  = molare Konzentration der jeweiligen Ionenart

$z$  = Ladung des einzelnen Ions

Durch die Darstellung in Abhängigkeit der Ionenstärke würden die Extraktionspunkte für Erdalkalimetallchloride demnach höhere Werte annehmen und über denen der Alkalimetallchloride liegen. Für die Aufarbeitung von Plasmid-DNA ist jedoch nicht die Reihenfolge der Extraktionspunkte für die verschiedenen Anionen entscheidend, sondern vielmehr die Differenz der Extraktionspunkte für pDNA und RNA, um so eine Abtrennung erreichen zu können.

Neben den Erdalkali- und Alkalimetallchloriden wurden weitere Salze hinsichtlich ihres Einflusses auf das Verteilungsverhalten untersucht. In Abbildung 17 sind Extraktionen mit verschiedenen Nitraten dargestellt.

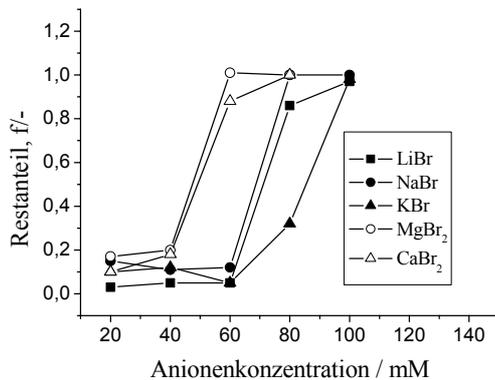


**Abbildung 17** Verteilungsverhalten von pUT649 (A) and *E. coli* RNA (B) in Gegenwart verschiedener Metallnitratre (Streitner *et al.*, 2007).

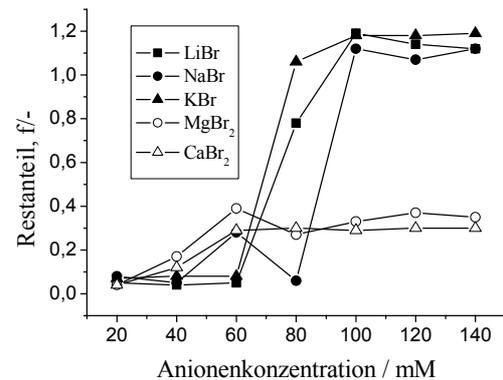
Im Gegensatz zu den Metallchloriden findet hier die Extraktion bei wesentlich geringeren Anionenkonzentrationen statt. Die Extraktionspunkte für pUT649 unter Verwendung von Nitraten liegen bei  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  mit 40 mM Nitrat und bei den Alkalimetallnitraten mit 60 mM dicht bei einander. RNA wird im Fall von  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  mit 40 mM Nitrat und im Fall von Alkalimetallnitraten mit 80 mM Nitrat aus der wässrigen Phase extrahiert.

Ein ähnliches Extraktionsverhalten ist unter dem Einfluss verschiedener Bromide zu beobachten, wie in Abbildung 18 gezeigt ist. Bei der Verwendung von Nitraten als auch Bromiden ist die Möglichkeit der Trennung von RNA und Plasmid-DNA nur in einem schmalen Konzentrationsbereich gegeben. Wie schon bei den Extraktionen mit  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$  beschrieben, kommt es bei den Erdalkalimetallnitraten und -bromiden ebenfalls zur Präzipitation der RNA, was zu einem niedrigen Restanteil in der wässrigen Phase führt und durch eine Trübung der Zwischenphase im Extraktionssystem zu beobachten ist.

A



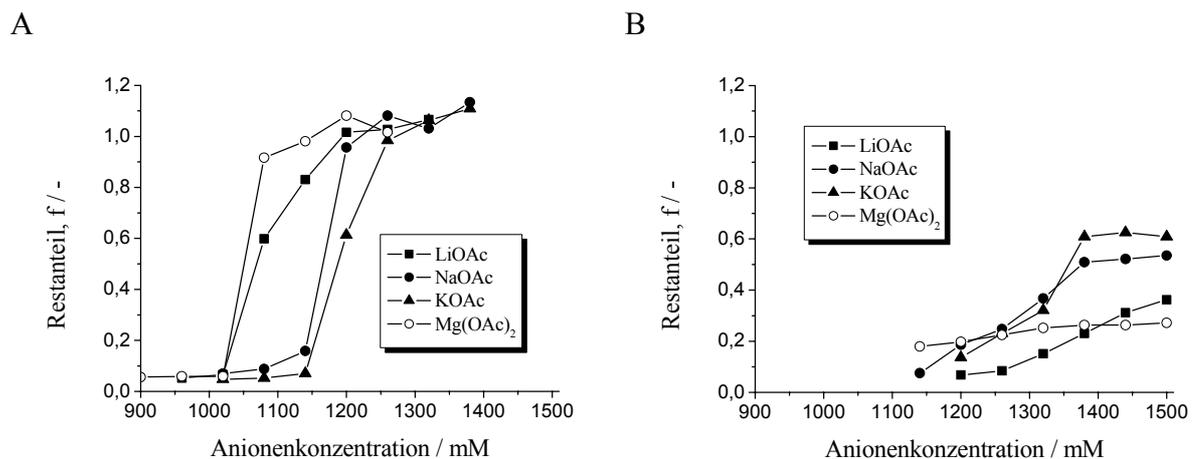
B



**Abbildung 18** Verteilungsverhalten von pUT649 (A) und *E. coli* RNA (B) in Gegenwart verschiedener Metallbromide.

Bei Extraktionen mit Acetaten kehrt sich das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren erst bei Acetatkonzentrationen ab 1000 mM Acetat um. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 19 dargestellt. Durch die Einstellung des pH-Wertes der wässrigen Zulaufphase auf 7,0 wurde sichergestellt, dass keine freie Essigsäure vorliegt. Eine signifikante Präzipitation der RNA kann sowohl in Gegenwart von Erdalkali- als auch Alkalimetallacetaten beobachtet werden. Daraus resultiert ein Restanteil von ma-

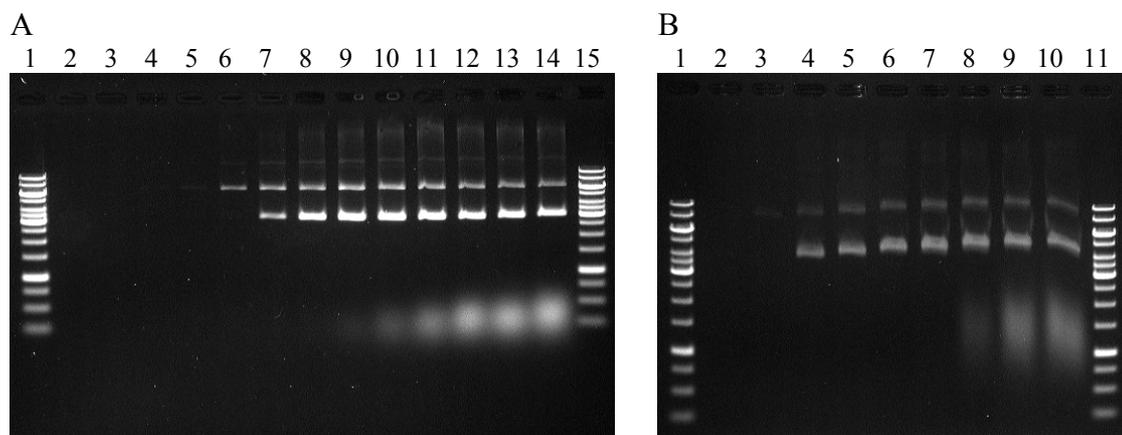
ximal 0,6 bei hohen Acetatkonzentrationen. Die Plasmid-DNA bleibt unter Verwendung von Magnesiumacetat bei Konzentrationen über 1080 mM Acetat in der wässrigen Phase des Extraktionssystems. Bei den Alkalimetallacetaten ist dies bei Konzentrationen von 1110 mM Lithiumacetat, 1200 mM Natriumacetat und 1230 mM Kaliumacetat zu beobachten. Wie auch schon bei den zuvor betrachteten Salzen, ist auch hier die Reihenfolge der Extraktionspunkte bezüglich der verwendeten Kationen gleichbleibend. Bezüglich der unterschiedlichen Extraktionspunkte von pUT649 und RNA ist mit 270 mM für Lithiumacetat, 180 mM für Natriumacetat und 150 mM für Kaliumacetat eine größere Differenz zu beobachten als bei den übrigen Salzen. Auffällig ist im Gegensatz zu Extraktionen mit anderen Salzen, dass bei der Verwendung von Acetaten vor allem für RNA keine konkreten Extraktionspunkte beobachtet werden, an denen sich das Verteilungsverhalten umkehrt, sondern es sich vielmehr um Extraktionsbereiche handelt. Dennoch ist auch hier ein ausreichendes Fenster für eine selektive Extraktion von Plasmid-DNA und RNA während der Hinextraktion vorhanden.



**Abbildung 19** Verteilungsverhalten von pUT649 (A) und *E. coli* RNA (B) in Gegenwart verschiedener Metallacetate (Streitner *et al.*, 2007).

Mit Hilfe der in Abbildung 20 dargestellten Agarosegele soll noch einmal der Unterschied zwischen der Verwendung von Chlorid und Acetat während der Hinextraktion am Beispiel von Lithiumchlorid und Lithiumacetat verdeutlicht werden. Bei der Extraktion mit LiCl in Abbildung 20A werden sowohl Plasmid-DNA als auch RNA bis zu einer LiCl-Konzentration von 210 mM aus der wässrigen Phase extrahiert. Bei 240 mM bis 260 mM LiCl wird lediglich die RNA extrahiert. In einem Bereich von 220-230 mM

LiCl ist sogar eine Trennung von oc-Form und ccc-Form des Plasmids möglich, indem RNA und ccc-Form aus der wässrigen Phase extrahiert werden, und die oc-Form im Raffinat verbleibt. Wird die LiCl-Konzentration über 260 mM erhöht findet keine Extraktion statt, und sowohl Plasmid-DNA als auch RNA befinden sich in der wässrigen Phase. Bei einem Vergleich dieser Extraktion mit einer Extraktion unter Verwendung von LiOAc wird deutlich, dass der Extraktionsbereich, in dem Plasmid-DNA von RNA getrennt werden kann, im Fall von LiOAc mit 180 mM im Gegensatz zu 20 mM für LiCl wesentlich größer ist wie in Spur 4-7 in Abbildung 20B zu sehen ist. Eine selektive Trennung von oc-Form und ccc-Form ist hier jedoch nur angedeutet.



**Abbildung 20** Agarosegelelektrophorese einer pUT649/RNA Mischung in der wässrigen Raffinatphase nach Extraktion mit 40 mM TOMAC in iso-Octan in Gegenwart von LiCl (A) und LiOAc (B). A: Spuren 1, 15: DNA 1 kb Marker, Spuren 2-14: 190-310 mM LiCl in 10 mM Schritten. B: Spuren 1, 11: DNA 1 kb Marker, Spuren 2-10: 1020-1500 mM LiOAc in 60 mM Schritten (Streitner *et al.*, 2007).

Eine Übersicht über die unterschiedlichen Extraktionspunkte von pUT649 und RNA unter Verwendung der verschiedenen Salze ist in Tabelle 10 gegeben.

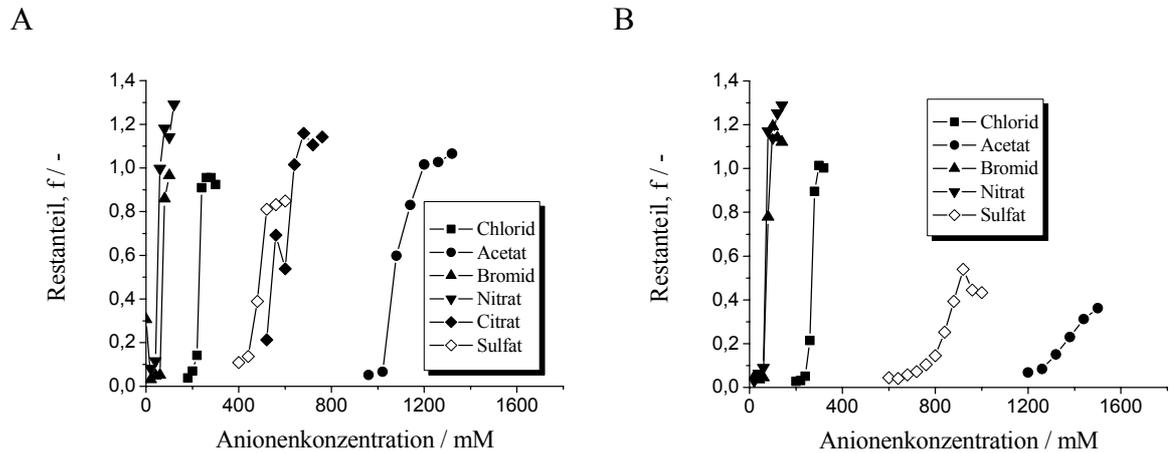
**Tabelle 10** Extraktionspunkte von pUT649 und RNA unter Verwendung verschiedener Salze.

Salz	Extraktionspunkt für pUT649 / mM	Extraktionspunkt für RNA / mM
LiCl	240	280
NaCl	280	300
KCl	300	320
CaCl <sub>2</sub>	140-160	140-160
MgCl <sub>2</sub>	140-160	140-160
LiNO <sub>3</sub>	60	80
NaNO <sub>3</sub>	60	80
KNO <sub>3</sub>	60	80
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	40	40
LiBr	80	80
NaBr	80	80
KBr	90	90
MgBr <sub>2</sub>	60	60
CaBr <sub>2</sub>	60	60
LiOAc	1110	1280
NaOAc	1200	1380
KOAc	1230	1380
Mg(OAc) <sub>2</sub>	1080	1200

Weitere Untersuchungen ergaben, dass Lithiumsalze den weitesten Konzentrationsbereich bieten, um RNA und Plasmid-DNA zu trennen. Abbildung 21 zeigt den Einfluss verschiedener Lithiumsalze bezüglich des Verteilungsverhaltens von pUT649 und RNA im Extraktionssystem. Die Untersuchung des Extraktionsverhaltens von Nukleinsäuren in Gegenwart verschiedener Anionen hat ergeben, dass sich das Verteilungsverhalten erst für Nitrat und Bromid umkehrt, gefolgt von Chlorid, Sulfat, Citrat und Acetat. Eine Trennung von RNA und Plasmid-DNA ist sowohl unter Verwendung von Chloriden als auch Sulfaten, Citraten oder Acetaten im Extraktionssystem möglich.

Es wurde versucht die Reihenfolge der verwendeten Anionen mit der Hofmeister-Reihe zu begründen. Es ist zwar eine gewisse Vergleichbarkeit, allerdings keine vollständige Übereinstimmung vorhanden. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da es sich bei der

Hofmeister-Reihe um einen hydrophoben Effekt handelt und nicht mit unterschiedlichen Ladungen zu begründen ist. Da die Verteilung der Nukleinsäuren im inversmizellaren Extraktionssystem durch die elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Tensidkopfguppen beeinflusst wird, ist kein salzabhängiger hydrophober Hofmeister-Effekt zu erwarten.



**Abbildung 21** Restanteil der Nukleinsäuren in der wässrigen Phase unter dem Einfluss verschiedener Lithiumsalze für pUT649 (A) und *E. coli* RNA (B) (Streitner *et al.*, 2007).

Generell lässt sich sagen, dass die Größe der inversen Mizellen sowohl durch die Salzart als auch durch die Salzkonzentration in der wässrigen Phase beeinflusst wird. Je höher letztere ist, desto mehr werden die Wechselwirkungen zwischen den Tensidkopfguppen abgeschwächt. Durch die geringere Abstoßung lagern sich die Kopfgruppen näher zusammen, und es entstehen kleinere inverse Mizellen. Zusätzlich wird die Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Kopfgruppen und den negativ geladenen Nukleinsäuren abgeschwächt. Die elektrostatische Anziehung nimmt demnach ab. Diese Effekte führen zu einem Ausschluss der Nukleinsäuren aus der inversmizellaren Phase bei hohen Salzkonzentrationen. Mit zunehmender Anionenkonzentration verbleiben die Nukleinsäuren in der Reihenfolge oc-Form, ccc-Form und RNA in der wässrigen Phase.

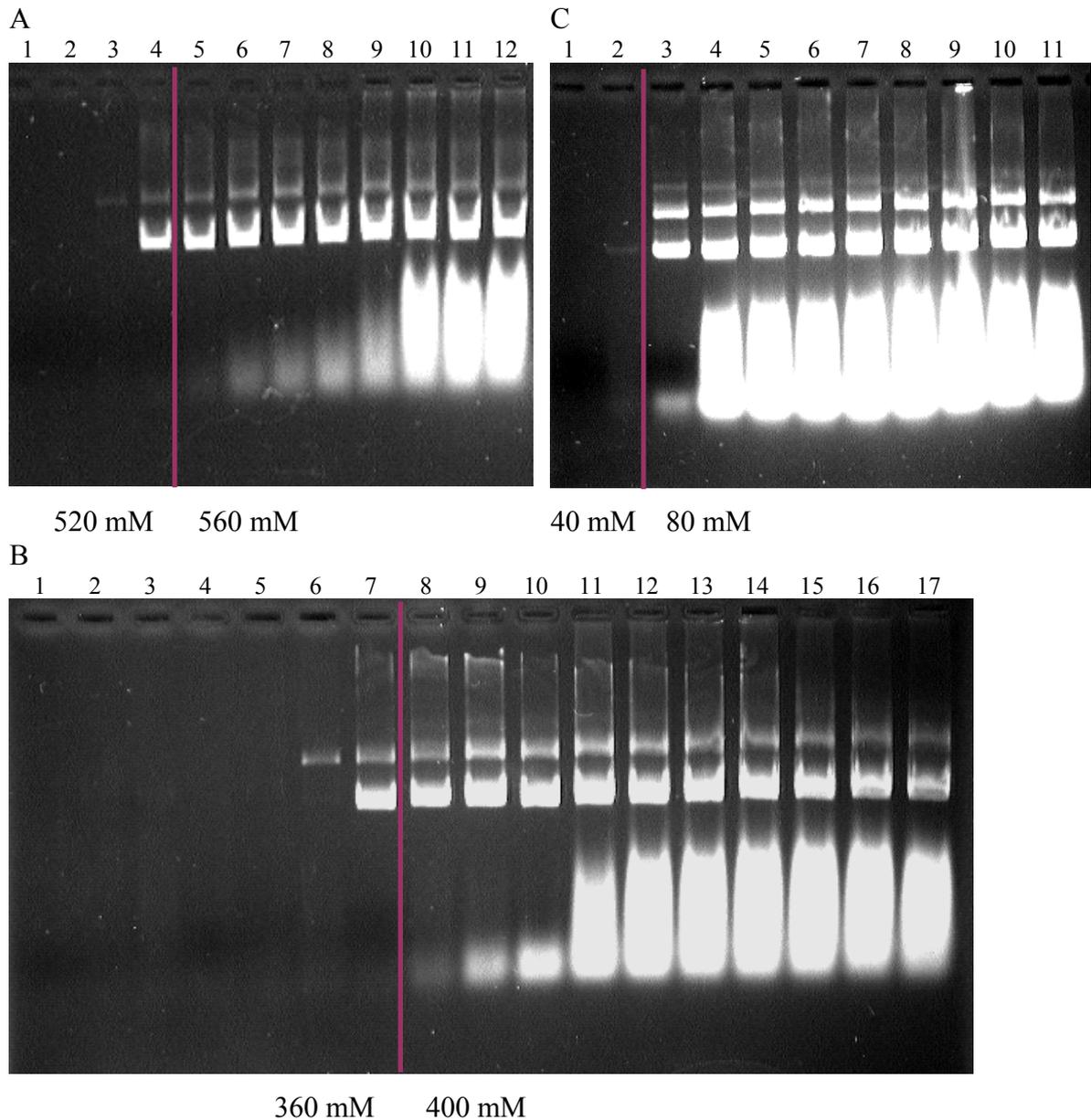
### 4.1.2 Einfluss des Alkohols auf das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren während der Hinextraktion

Neben der Anionenkonzentration der wässrigen Phase des Extraktionssystems haben auch Konzentration und Struktur des verwendeten Alkohols einen wesentlichen Einfluss auf das Extraktionsverhalten der Nukleinsäuren. In erster Linie dient Alkohol als Lösungsvermittler in der inversmizellaren Phase, um TOMAC vollständig zu lösen und somit den Transfer der Nukleinsäuren zu ermöglichen. Ohne die Zugabe von Alkohol ist TOMAC nicht in iso-Octan löslich und eine starke Trübung ist zu beobachten. Um die minimale Alkoholkonzentration zum Lösen von TOMAC zu bestimmen, wurden die jeweiligen Alkohole zu der organischen Phase zugegeben bis augenscheinlich die Trübung verschwunden war. Die minimalen Konzentrationen verschiedener Alkohole, die hierzu benötigt wurden, sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

**Tabelle 11** Minimale Konzentration verschiedener Alkohole bezogen auf das Volumen der organische Phase, welche für eine vollständige Lösung von TOMAC in der organischen Phase notwendig ist (Streitner *et al.*, 2008).

Alkohol	Konzentration des Alkohols in der inversmizellaren Phase / % (v/v)
Ethanol	0,040 ± 0,005
1-Propanol	0,045 ± 0,005
2-Propanol	0,050 ± 0,005
1-Butanol	0,040 ± 0,005
Isobutylalkohol	0,050 ± 0,005
1-Pentanol	0,050 ± 0,005
1-Hexanol	0,060 ± 0,005
Cyclohexanol	0,200 ± 0,005
1-Heptanol	0,040 ± 0,005
2-Octanol	0,060 ± 0,005
2-Ethylhexanol	0,050 ± 0,005
1-Nonanol	0,060 ± 0,005
1-Decanol	0,070 ± 0,005

Es wurde festgestellt, dass die Alkoholkonzentration einen wesentlichen Einfluss auf den Extraktionspunkt der Nukleinsäuren bei der Hinextraktion hat. In Abbildung 22 ist die Extraktionspunktverschiebung aufgrund unterschiedlicher Ethylhexanolkonzentrationen in der inversmizellaren Phase dargestellt.



**Abbildung 22** Veränderung des Extraktionspunktes bei der Extraktion mit  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  unter Verwendung verschiedener Alkoholkonzentrationen in der inversmizellaren Phase. A: 0,5 % (v/v) Ethylhexanol. Spuren 1-12: 400-840 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 40 mM Schritten. B: 1,0 % (v/v) Ethylhexanol. Spuren 1-17: 120-760 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 40 mM Schritten. C: 5,0 % (v/v) Ethylhexanol. Spuren 1-11: 0-400 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 40 mM Schritten.

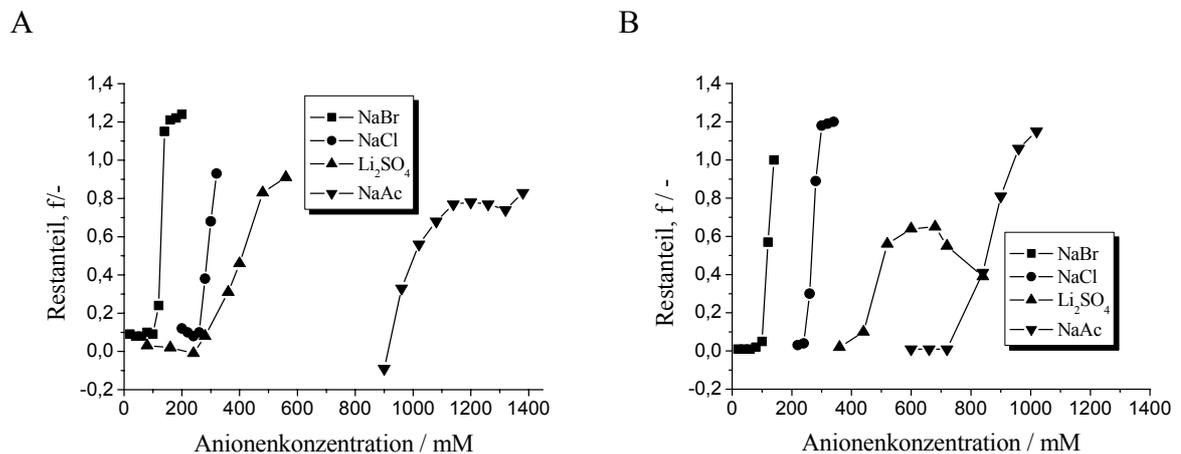
Bei einem Volumenanteil von 0,5 % (v/v) Ethylhexanol liegt der Extraktionspunkt zwischen 520 mM und 560 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ . Wird das Volumenverhältnis auf 1 % (v/v) erhöht, befindet sich der Extraktionspunkt in einem Bereich von 360 mM bis 400 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , und eine weitere Erhöhung auf 5 % (v/v) Ethylhexanol bewirkt eine weitere Verschiebung des Extraktionspunktes auf etwa 80 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ . Die Verwendung unterschiedlicher Alkoholkonzentrationen wirkt sich auf die Struktur der inversen Mizellen aus. Es ist davon auszugehen, dass sich der Alkohol zwischen den Tensiden anordnet mit der Hydroxylgruppe zum Wasserkern der inversen Mizelle hin ausgerichtet. Die Wechselwirkung zwischen den Tensidkopfgruppen wird dadurch abgeschwächt. Der Alkylrest des Alkohols würde sich demnach zwischen den hydrophoben Resten des Tensids befinden und dadurch ebenfalls die Größe der inversen Mizellen beeinflussen. Hohe Alkoholkonzentrationen führen zu einer Abnahme der Mizellgröße. Daher liegt der Extraktionspunkt bei höherer Alkoholkonzentration bei einer geringeren Anionenkonzentration. Inwieweit sich die Struktur des Alkohols auf die Extraktion auswirkt wurde ebenfalls untersucht und ist in Verbindung mit der Rückextraktion von Nukleinsäuren in Kapitel 4.7.2 dargestellt.

Die genaue Wirkungsweise des Alkohols ist bislang noch nicht bekannt. Daher werden für die Erklärungsansätze bezüglich des Alkoholeinflusses sowie der Auswirkung anderer Extraktionsbedingungen auf die Struktur des inversemizellaren Systems auch in den nächsten Kapiteln häufig Hypothesen aufgestellt. Derzeit werden Untersuchungen bezüglich der Struktur des Extraktionssystems in Zusammenarbeit mit einem chemisch-physikalischen Institut durchgeführt. In diesem Rahmen wird ebenfalls der Einfluss unterschiedlicher Variablen auf das Phasenverhalten des TOMAC/iso-Octan/Wasser-Systems und die Mikroemulsionsbildung untersucht.

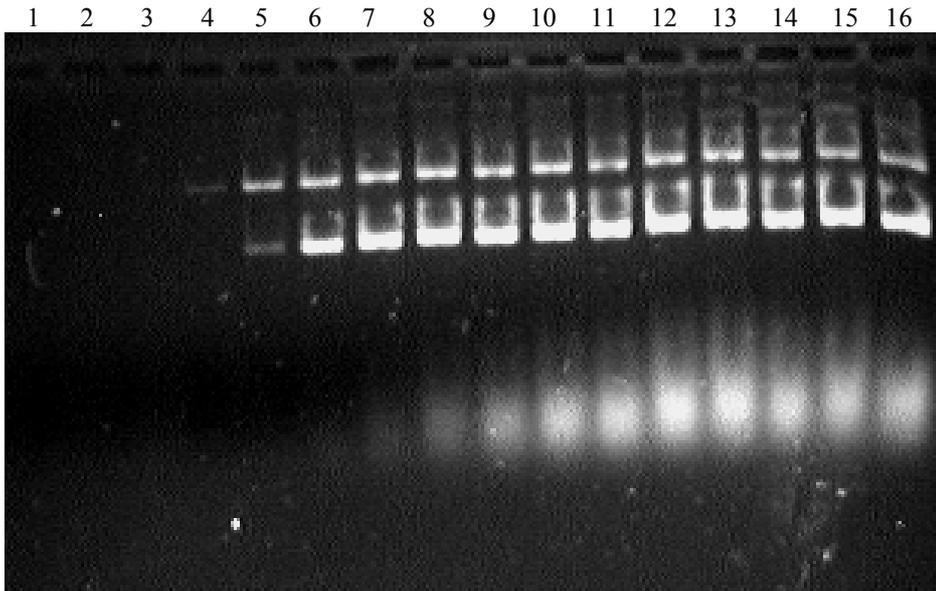
### ***4.1.3 Extraktionen mit Dialkyldimethylammoniumhalogeniden als kationische Tenside***

Neben TOMAC wurden auch verschiedene Dialkyldimethylammoniumhalogenide mit unterschiedlichen Kettenlängen als weitere Tenside zur Ausbildung von inversen Mizellen in Betracht gezogen. Hierbei handelte es sich um Didecyldimethylammoniumbromid ( $\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{BrN}$ ), Didodecyldimethylammoniumbromid ( $\text{C}_{26}\text{H}_{56}\text{BrN}$ ), Dimethylditradecylammoniumbromid ( $\text{C}_{30}\text{H}_{64}\text{BrN}$ ), Dihexadecyldimethylammoniumbromid und Di-

methyldioctadecylammoniumchlorid ( $C_{34}H_{72}BrN$  und  $C_{38}H_{80}ClN$ ). In Abbildung 23, Abbildung 25 und Abbildung 26 sind Extraktionen mit Didecyldimethylammoniumbromid, Dimethylditetradecylammoniumbromid und Dihexadecyldimethylammoniumbromid unter Verwendung verschiedener Natriumbromid-, Natriumchlorid-, Lithiumsulfat- und Natriumacetatkonzentrationen dargestellt. Als Lösungsvermittler wurden zunächst 5 % (v/v) Ethylhexanol eingesetzt, um zu gewährleisten, dass sich die Tenside vollständig in iso-Octan lösen. In Abbildung 23 sind für die Extraktionen mit NaBr und NaCl für pUT649 Extraktionspunkte von 100 mM und 240 mM abzulesen. Im Fall von Lithiumsulfat und Natriumacetat handelt es sich vielmehr um Extraktionsbereiche als um konkrete Extraktionspunkte. Werden die Extraktionen mit RNA betrachtet, besteht kaum die Möglichkeit der Trennung von Plasmid-DNA und RNA während der Hinextraktion. Durch Herabsetzen der Konzentration des Lösungsvermittlers konnte die Trennung leicht verbessert werden, wie in Abbildung 24 gezeigt ist. Im Gegensatz zu TOMAC (mindestens 0,05 % (v/v) Ethylhexanol als Lösungsvermittler) ist jedoch für die Dialkyldimethylammoniumhalogenide mit mindestens 2 % (v/v) ein wesentlich höherer Volumenanteil Ethylhexanol zum Lösen in iso-Octan notwendig. Dies schränkt die Möglichkeit zur Trennung der Nukleinsäuren während der Hinextraktion wesentlich ein.



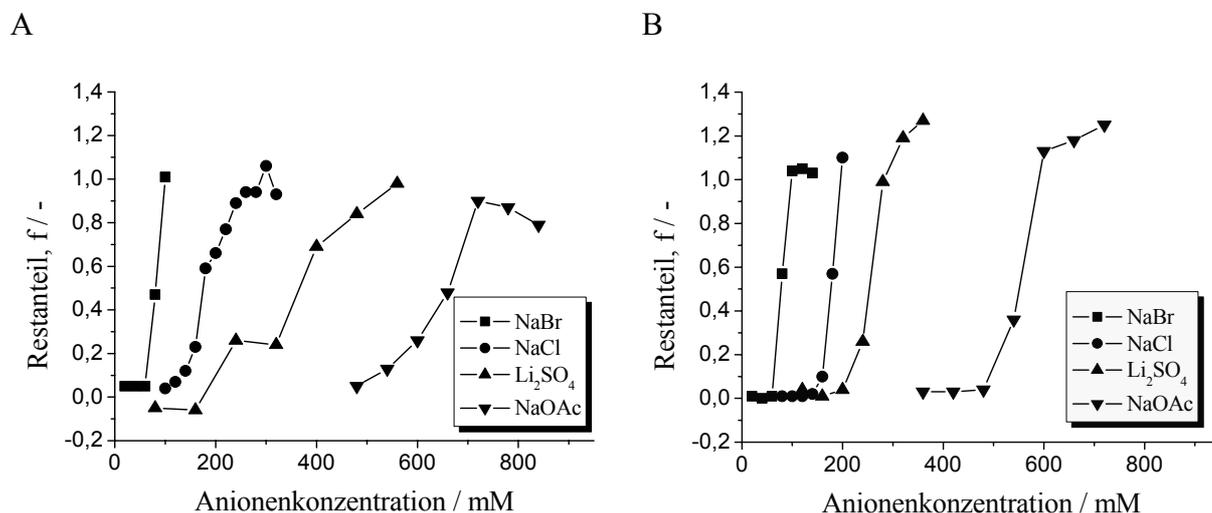
**Abbildung 23** Restanteil der Nukleinsäuren in der wässrigen Raffinatphase nach Extraktion mit einer inversemizellaren Phase bestehend aus 40 mM Didecyldimethylammoniumbromid und 5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan in Gegenwart verschiedener Natriumsalze und Lithiumsulfat. (A) Plasmid pUT649. (B) *E. coli* RNA.



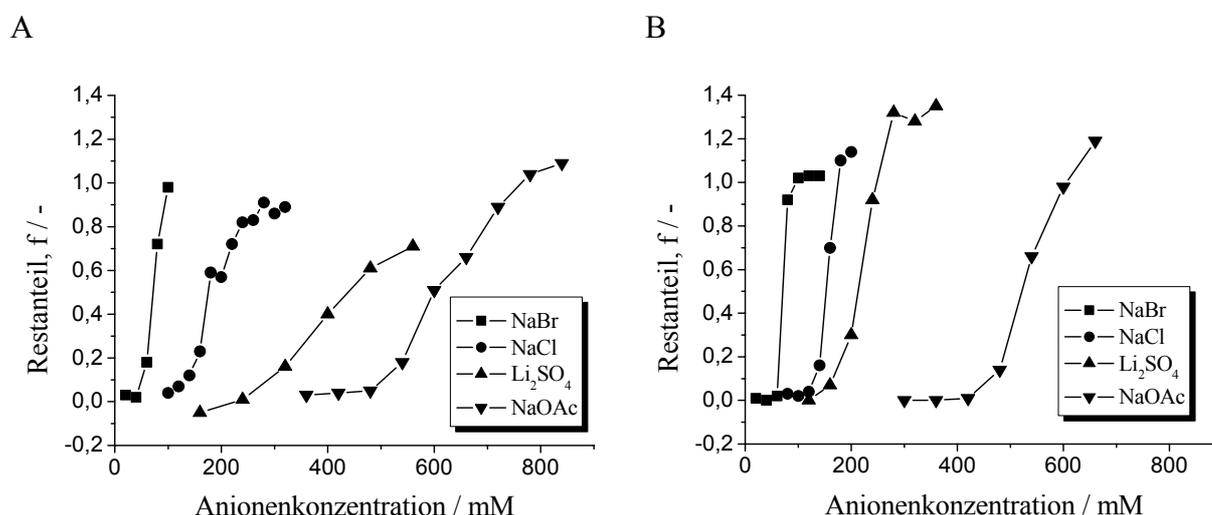
**Abbildung 24** Agarosegelelektrophorese einer RNA/pUT649-Mischung in der wässrigen Raffinatphase nach Extraktion mit einer inversmizellaren Phase aus 40 mM Didecyldimethylammoniumbromid und 2 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan in Gegenwart von  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ . Spuren 1-16: 400-1000 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 40 mM Schritten.

Bei der Verwendung längerkettiger Tenside zieht sich der Extraktionsbereich für Plasmid-DNA bei der Hinextraktion über einen noch weiteren Bereich bezüglich der Anionenkonzentration. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 25 und Abbildung 26 am Beispiel von Dimethylditetradecylammoniumbromid und Dihexadecyldimethylammoniumbromid dargestellt. Auch bei der Extraktion mit NaCl handelt es sich hier eher um einen Extraktionsbereich als um einen konkreten Extraktionspunkt. Besonders deutlich wird die länger gezogene Umkehrung des Verteilungsverhaltens jedoch für Lithiumsulfat und Natriumacetat. Für Extraktionen mit RNA sind hingegen schärfere Grenzen erkennbar. Dadurch liegen die Extraktionspunkte für RNA bei der Verwendung längerkettiger Tenside sogar bei einer niedrigeren Anionenkonzentration als die der Plasmid-DNA. Zusätzlich zu der geringen Selektivität zwischen Plasmid-DNA und RNA im Rahmen der Hinextraktion, stellte die schlechte Phasentrennung einen weiteren Nachteil bei der Verwendung von Dialkyldimethylammoniumhalogeniden dar. Bei den Extraktionssystemen konnte vor allem bei der Verwendung längerkettiger Tenside keine vollständige Trennung von inversmizellarer und wässriger Phase erreicht werden. In diesen Fällen wurde eine Emulsionsbildung an der Phasengrenze beobachtet. Aufgrund der schlechten Trennung der Phasen und dem Auftreten von Trübungen waren die Messun-

gen teilweise fehlerhaft, und es wurden daher Restanteile über 1 und unter 0 gemessen. Aus diesen Gründen wurde die Extraktion mit Dialkyldimethylammoniumhalogeniden nicht weiter verfolgt. Auch aus ökonomischer Sicht ist TOMAC den anderen Tensiden vorzuziehen.



**Abbildung 25** Restanteil der Nucleinsäuren in der wässrigen Raffinatphase nach Extraktion mit einer inversmizellaren Phase aus 40 mM Dimethylditetradecylammoniumbromid und 5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan in Gegenwart verschiedener Natriumsalze und Lithiumsulfat. (A) Plasmid pUT649. (B) *E. coli* RNA.



**Abbildung 26** Restanteil der Nucleinsäuren in der wässrigen Raffinatphase nach Extraktion mit einer inversmizellaren Phase aus 40 mM Dihexadecyldimethylammoniumbromid und 5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan in Gegenwart verschiedener Natriumsalze und Lithiumsulfat. (A) Plasmid pUT649. (B) *E. coli* RNA.

Des Weiteren fällt auf, dass mit zunehmender Kettenlänge der Tenside die Extraktionspunkte bei geringeren Salzkonzentrationen liegen. Dies deutet darauf hin, dass lange Alkylketten zu einer dichteren Aneinanderlagerung der Tensidkopfgruppen führen, wodurch kleinere inverse Mizellen entstehen. Daher ist bei länger-kettigen Tensiden eine geringere Anionenkonzentration notwendig, um die inversen Mizellen weiter zu verkleinern und die Wechselwirkung zwischen den Kopfgruppen als auch zwischen Kopfgruppen und Nukleinsäuremolekülen abzuschwächen, wodurch die Nukleinsäuren bei der Hinextraktion in der wässrigen Phase verbleiben. Die breiten Extraktionsbereiche der Plasmid DNA bei der Extraktion mit Dialkyldimethylammoniumhalogeniden im Gegensatz zu den Extraktionen mit TOMAC können darauf beruhen, dass Tenside mit zwei Alkylketten mehr Möglichkeiten bezüglich der Anordnung haben als Tenside mit drei Alkylketten. Durch die unterschiedliche Anordnung der Alkylketten bei teilweise abgeschwächten Wechselwirkungen der Tensidkopfgruppen wird der Transfer der Plasmid-DNA negativ beeinflusst und ist über einen großen Bereich nur unvollständig. Im Fall von RNA liegen anstelle der breiten Extraktionsbereiche konkrete Extraktionspunkte vor, da der Großteil der RNA gar nicht erst in die inversmizellare Phase extrahiert wird, sondern sich an der Phasengrenze befindet. Da die positiv geladenen Kopfgruppen der Tensidmoleküle nur mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der RNA wechselwirken, ist lediglich die eine Seite des Moleküls durch Tenside gegenüber dem organischen Lösungsmittel abgeschirmt. Dadurch bleibt die andere Seite der RNA hydrophil und orientiert sich an der Grenzfläche zur wässrigen Phase hin. Vermutlich findet dadurch kein oder unter bestimmten Umständen nur ein geringer Transfer der RNA in die inversmizellare Phase statt.

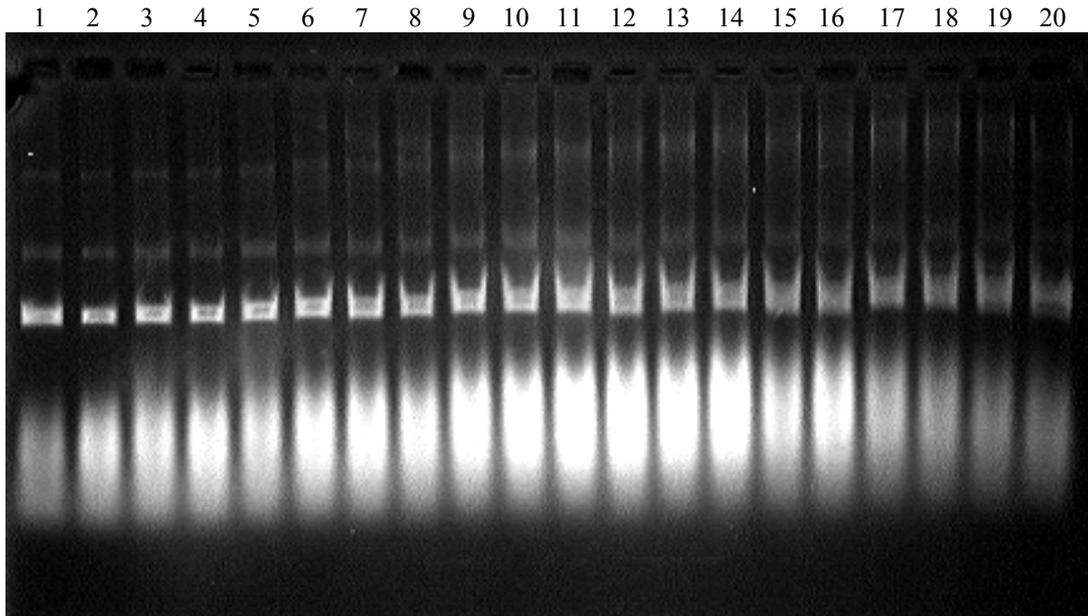
#### ***4.2 Bestimmung der Kapazität der organischen Phase unter Verwendung aufgereinigter Plasmid-DNA***

Im Rahmen der Hinextraktion wurde zudem die Kapazität der inversmizellaren Phase in Abhängigkeit verschiedener Tensidkonzentrationen untersucht. Zu diesem Zweck wurde die maximale Aufnahmefähigkeit der inversmizellaren Phase für pUT649 betrachtet. Zunächst wurde die Kapazität für bereits aufgereinigte Plasmid-DNA bestimmt. Hierzu wurden 600  $\mu\text{L}$  einer wässrigen Phase bestehend aus 1,4  $\text{g L}^{-1}$  pUT649 und 200 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 10 mM Tris-HCl mit unterschiedlichen Volumina einer inversmizellaren Pha-

se gemischt. Nach der Phasentrennung wurde die Konzentration der Plasmid-DNA in der wässrigen Raffinatphase durch UV-Messung bestimmt. Da keine Trübung an der Phasengrenzfläche beobachtet wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass sich die Plasmid-DNA komplett in der organischen Phase befindet, wenn diese nicht in der wässrigen Phase nachgewiesen wurde. Erst bei einer Übersättigung der inversmizellaren Phase konnte die Plasmid-DNA nicht vollständig extrahiert werden, und die Kapazität (Aufnahmefähigkeit) war überschritten. Unter Verwendung einer organischen Phase bestehend aus 40 mM TOMAC und 0,1 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan liegt die Kapazität für pDNA bei 3 mg pro mL inversmizellare Phase. Bei einer geringeren Tensidkonzentration von 10 mM sinkt sie auf 1,3 mg pro mL inversmizellare Phase. Die geringere spezifische Kapazität von 0,075 g pro mmol Tensid bei Verwendung von 40 mM TOMAC im Gegensatz zu 0,13 g pro mmol Tensid bei Verwendung von 10 mM TOMAC ist vermutlich auf die unterschiedlichen Strukturen der gebildeten Tensidaggregate bei unterschiedlicher Tensidkonzentration zurückzuführen.

### ***4.3 Extraktion aus bakteriellem Klarlysat***

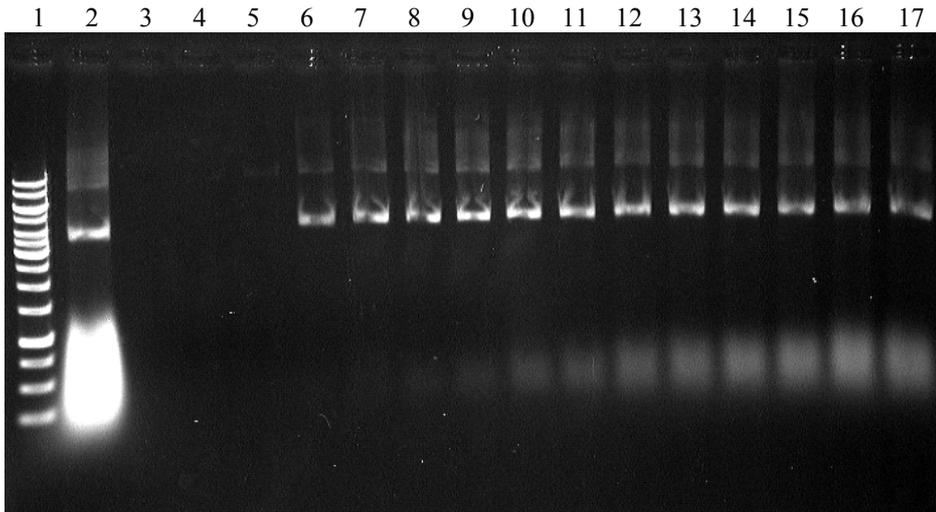
Es war zu erwarten, dass oberflächenaktive Bestandteile des Klarlysats wie Dodecylsulfat und Proteine das Verteilungsverhalten im Extraktionssystem beeinflussen würden. In Abbildung 27 ist die Verteilung von Plasmid-DNA und RNA aus einem bakteriellen Klarlysat als Zulaufphase in einem Extraktionssystem in Gegenwart von Lithiumsulfat in verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Abweichung vom Verteilungsverhalten, das mit den reinen Nukleinsäuren als Modellsubstanzen beobachtet wurde. Unter den im Klarlysat vorhandenen Bedingungen verbleiben die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase und werden nicht signifikant in die inversmizellare Phase extrahiert. Eine Kaliumacetatkonzentration von 1000 mM, die im Klarlysat vorhanden ist, hat bei den vorangegangenen Extraktionen mit Modellsubstanzen den Transfer in die organische Phase nicht behindert. Ebenso sind Extraktionen unter dem Einfluss von SDS möglich, wie später in Abbildung 37 gezeigt ist. Dennoch ist unter den gegebenen Bedingungen keine Extraktion aus bakteriellem Klarlysat möglich. Daher ist anzunehmen, dass noch weitere im Lysat vorhandene Komponenten das Extraktionsverhalten beeinflussen bzw. mehrere Faktoren zusammenspielen.



**Abbildung 27** Extraktion eines bakteriellen Klarlysats als Zulaufphase mit einer inversmizellaren Phase aus 40 mM TOMAC und 0,5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan in Gegenwart von Lithiumsulfat. Analyse der wässrigen Phase nach der Extraktion. Spuren 1-20: 80-840 mM Lithiumsulfat in 40 mM Schritten.

Um den Einfluss oberflächenaktiver Substanzen zu minimieren ist eine Konditionierung des bakteriellen Klarlysats notwendig. Zu diesem Zweck wurde das Klarlysats an einer 100 kDa Ultrafiltrationsmembran gegen 10 mM Tris Puffer (pH 7,0) diafiltriert. Neben SDS wurden auch Proteine größtenteils abgereichert. Außerdem konnten mit diesem Schritt optimale Pufferbedingungen eingestellt werden, die die Extraktion der Nukleinsäuren aus diafiltriertem Klarlysats ermöglichen.

Abbildung 28 zeigt Extraktionen aus diafiltriertem Klarlysats mit 40 mM TOMAC und 0,5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan unter dem Einfluss verschiedener Lithiumsulfatkonzentrationen.



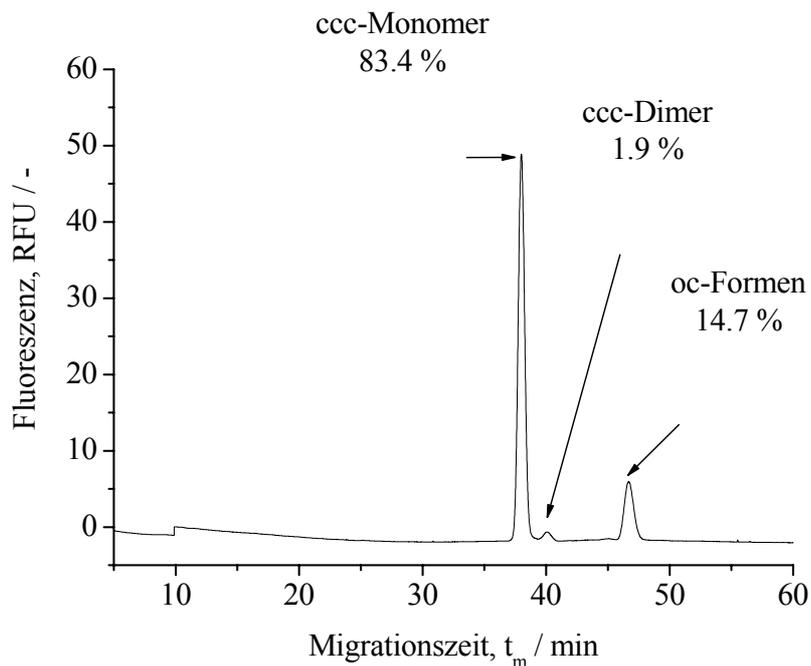
**Abbildung 28** Extraktion eines diafiltrierten Klarlysats in Gegenwart verschiedener Lithiumsulfatkonzentrationen. Spur 1: DNA 1 kb Marker, Spur 2: bakterielles Klarlysats vor der Diafiltration, Spur 3-17: wässrige Raffinatphasen nach der Hinextraktion mit 460-760 mM Lithiumsulfat in 20 mM Schritten (Streitner *et al.*, 2007).

#### ***4.4 Bestimmung der Kapazität der organischen Phase unter Verwendung von bakteriellem Klarlysats***

Da die Kapazität der organischen Phase für Plasmid-DNA bei Extraktionen aus bakteriellem Klarlysats zusätzlich durch die anderen Komponenten im Lysats beeinflusst wird, wurde auch hier eine Kapazitätsbestimmung für die Hinextraktion analog dem in Kapitel 4.2 beschriebenen Verfahren durchgeführt. Hierzu wurde ein diafiltriertes Klarlysats in Gegenwart von 100 mM NaCl mit unterschiedlichen Volumina verschiedener inversemizellarer Phasen extrahiert. Die Plasmidkonzentration in der wässrigen Phase betrug  $0,018 \text{ mg mL}^{-1}$ . Bei einer Tensidkonzentration von 10 mM TOMAC konnten lediglich  $0,047 \text{ mg}$  Plasmid-DNA pro mL organische Phase extrahiert werden. Durch die Verwendung von 40 mM TOMAC im Extraktionssystem konnte die Kapazität auf  $0,141 \text{ mg mL}^{-1}$  gesteigert werden. Der Einsatz von 100 mM TOMAC führte zu einer Kapazität von  $0,28 \text{ mg mL}^{-1}$ . Im Gegensatz zu den Extraktionen mit Modellsubstanzen sind die Kapazitäten für Extraktionen aus bakteriellem Lysats deutlich niedriger anzusetzen.

#### 4.5 Trennung der Plasmidisformen bei Extraktionen mit Modellsustanzen und der Extraktion aus Klarlysate

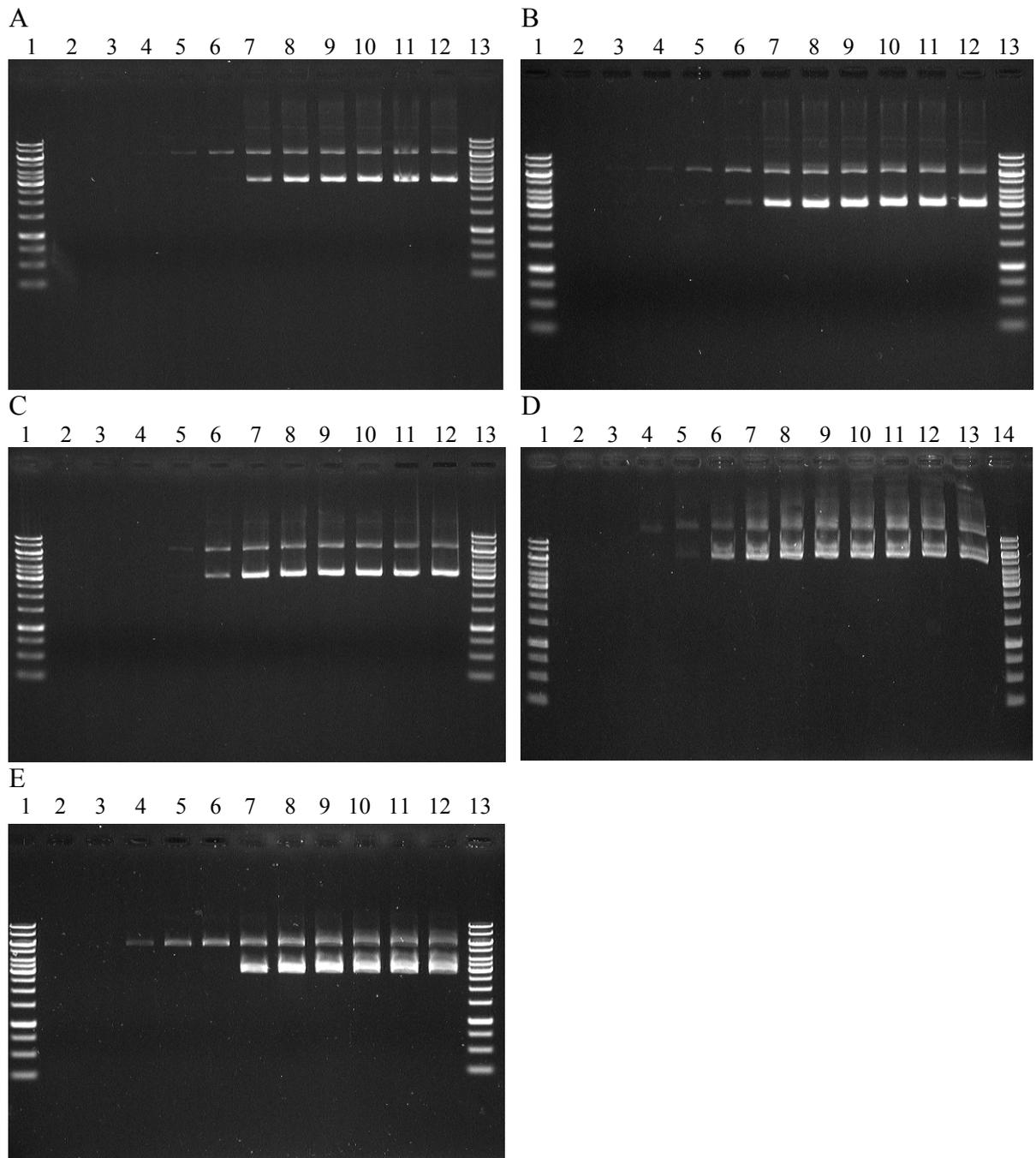
Ein wichtiges Qualitätskriterium bei der Herstellung pharmazeutisch einsetzbarer Plasmid-DNA ist die Verteilung der Plasmidisformen. Ein Aufarbeitungsprozess sollte daher die Möglichkeit bieten, die oc-Form zu entfernen oder zumindest abzureichern. Die Mindestanforderung an einen Prozess besteht darin, die Menge der oc-Form nicht zu erhöhen. Um die in den Agarosegelen vorhandenen Plasmidisformen zu bestimmen und zu quantifizieren, wurde die wässrige Zulaufphase des Extraktionssystems mittels Kapillargelelektrophorese analysiert. Das Elektropherogramm ist in Abbildung 29 dargestellt. Der größte Teil der Plasmid-DNA liegt mit 83,4 % als ccc-Monomer vor, weitere 1,9 % sind ccc-Dimer und die oc-Form macht einen Anteil von 14,7 % aus. Da es sich bei der Kapillargelelektrophorese um eine relativ langwierige Analyse handelt, wurden nach Identifizierung der Formen für die weiteren Untersuchungen Agarosegele genutzt.



**Abbildung 29** Kapillargelelektrophorese des Plasmids pUT649 (Streitner *et al.*, 2007).

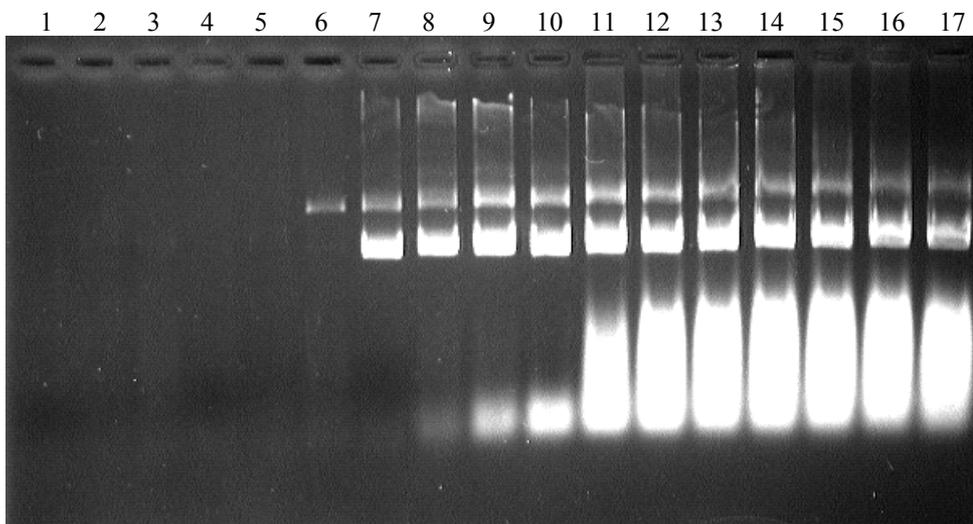
Bei Extraktionen mit Alkalimetallchloriden, Kaliumacetat und Lithiumsulfat konnte eine selektive Extraktion der ccc-Form beobachtet werden wie in Abbildung 30 gezeigt ist. Die Extraktionen wurden zunächst mit aufgereinigter Plasmid-DNA durchgeführt.

Die Konzentration der Plasmid-DNA in der wässrigen Zulaufphase betrug  $25 \text{ mg L}^{-1}$ . Als inversmizellare Phase wurden  $40 \text{ mM}$  TOMAC und  $0,5 \%$  (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan eingesetzt. Bei Konzentrationen von  $220 \text{ mM}$  und  $230 \text{ mM}$  LiCl wurde die ccc-Form aus der wässrigen Phase extrahiert während die oc-Form größtenteils zurückblieb und somit abgereichert werden konnte (Abbildung 30A). Im Fall von NaCl ist eine Abreicherung der oc-Form bei Konzentrationen von  $260$  bis  $270 \text{ mM}$  möglich und bei KCl bei  $280 \text{ mM}$ . Kaliumacetat bietet bei Konzentrationen zwischen  $1170$  und  $1185 \text{ mM}$  die Möglichkeit einer selektiven Abreicherung der oc-Form. Bei den hier gezeigten Extraktionen ist die Abtrennung der oc-Form jedoch nur in einem schmalen Konzentrationsbereich möglich. Eine deutliche Verbesserung der Formtrennung konnte durch den Einsatz von Lithiumsulfat erreicht werden. Wie in Abbildung 30E gezeigt, ist unter Verwendung dieses Extraktionssystems eine Trennung von oc-Form und ccc-Form im Bereich von  $440$ - $520 \text{ mM}$   $\text{Li}_2\text{SO}_4$  möglich.



**Abbildung 30** Agarosegelelektrophorese des Plasmids pUT649 in der wässrigen Raffinatphase nach Extraktion mit 40 mM TOMAC und 0,5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan in Gegenwart von Alkalimetallchloriden (A-C), Kaliumacetat (D) und Lithiumsulfat (E). A: Spuren 1, 13: DNA 1 kb Marker, Spuren 2-12: 190-290 mM LiCl in 10 mM Schritten. B: Spuren 1, 13: DNA 1 kb Marker, Spuren 2-12: 230-330 mM NaCl in 10 mM Schritten. C: Spuren 1, 13: DNA 1 kb Marker, Spuren 2-12: 250-350 mM KCl in 10 mM Schritten. D: Spuren 1, 14: DNA 1 kb Marker, Spuren 2-13: 1140-1305 mM KOAc in 15 mM Schritten. E: Spuren 1, 13: DNA 1 kb Marker, Spuren 2-12: 360-760 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 40 mM Schritten (Streitner *et al.*, 2007).

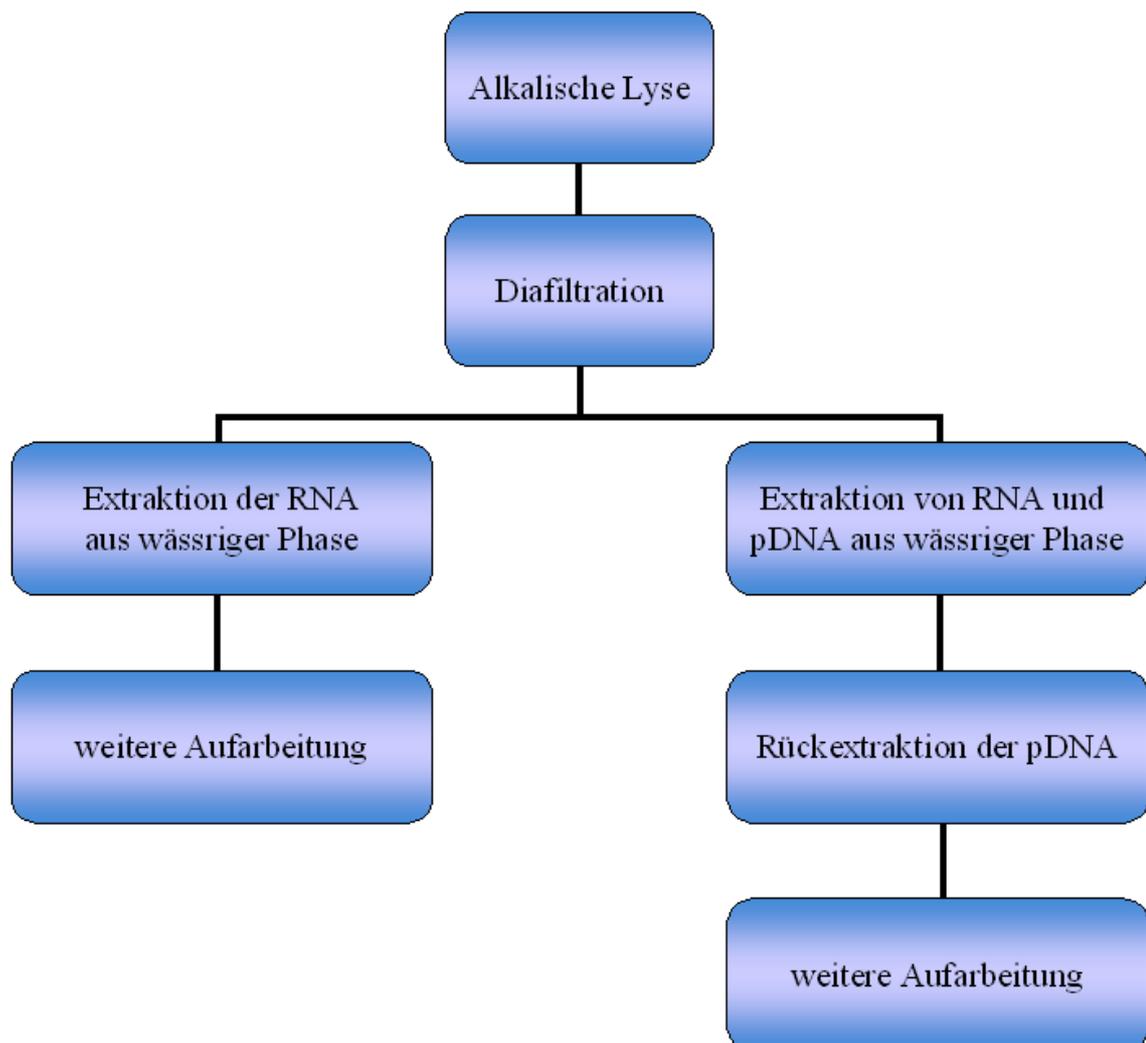
Neben den Extraktionen mit Modellsubstanzen wurde ebenfalls untersucht, ob eine Trennung der Plasmidisoformen auch im diafiltrierten Klarlysat möglich ist. Abbildung 31 zeigt die Extraktion aus diafiltriertem Klarlysat unter verschiedenen Lithiumsulfatkonzentrationen. Lithiumsulfat wies schon bei der Extraktion mit Modellsubstanzen einen großen Bereich sowohl für die Trennung von Plasmid-DNA und RNA als auch für die selektive Extraktion der Plasmidisoformen auf, und wurde daher für die Extraktion aus Klarlysat in Betracht gezogen. Trotzdem ist die Abtrennung der oc-Form nur in einem begrenzten Konzentrationsbereich möglich. Bei einer Maßstabsvergrößerung könnte dies zu Schwierigkeiten führen, da hierzu eine sehr genaue Einstellung der Salzkonzentration in der wässrigen Phase notwendig ist.



**Abbildung 31** Agarosegelelektrophorese der wässrigen Raffinatphasen nach der Extraktion von diafiltriertem Klarlysat mit 40 mM TOMAC und 1,0 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan in Gegenwart verschiedener Lithiumsulfatkonzentrationen. Spuren 1-17: 120-760 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 40 mM Schritten.

Es ergeben sich aus den dargestellten Ergebnissen mehrere Möglichkeiten für die Prozessführung, die in Abbildung 32 dargestellt sind. Einerseits kann während der Extraktion die RNA abgetrennt werden und sowohl die ccc-Form als auch die oc-Form verbleiben in der wässrigen Raffinatphase. Hierdurch kann eine Trennung von Plasmid-DNA und RNA erreicht werden. In diesem Fall ist jedoch keine Ankonzentrierung während des Aufarbeitungsprozesses möglich. Außerdem kann keine Abreicherung anderer Verunreinigungen wie Proteine erreicht werden. Die andere Möglichkeit besteht darin,

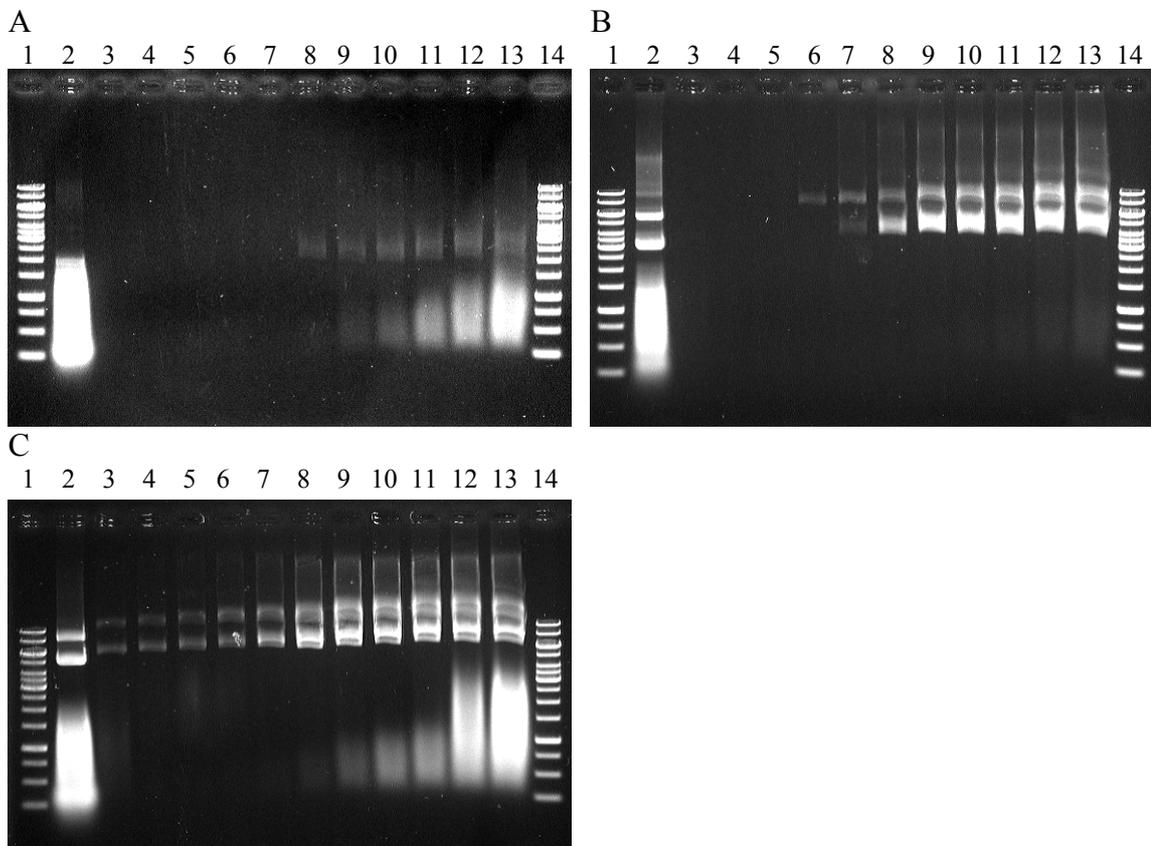
während einer Hinextraktion RNA und die ccc-Form aus der wässrigen Zulaufphase zu extrahieren und somit die oc-Form abzutrennen. Bei der darauf folgenden Rückextraktion wird dann die ccc-Form in eine weitere wässrige Phase extrahiert. In diesem Schritt kann sowohl die RNA abgetrennt werden als auch durch Veränderung der Phasenverhältnisse eine Ankonzentrierung erreicht werden. Da während der Studie nicht die selektive Abtrennung der oc-Form im Vordergrund stand, wurde im Rahmen der folgenden Untersuchungen die gesamte Plasmid-DNA in die inversmizellare Phase extrahiert. Somit konnte für die Hinextraktion ein breiterer Konzentrationsbereich genutzt werden, und es konnte bei den weiteren Untersuchungen mit dem kostengünstigsten Salz, in diesem Fall NaCl, gearbeitet werden.



**Abbildung 32** Möglichkeiten der Prozessführung für die Aufarbeitung von Plasmid-DNA mittels eines inversmizellaren Zweiphasensystems.

#### 4.6 Extraktionen mit unterschiedlichen Plasmiden

Es wurden Extraktionen mit den Plasmiden pUC18 (2,7 kb), pUT649 (4,6 kb) und pUK21CMV $\beta$  (7,6 kb) aus diafiltriertem Klarlysat durchgeführt. In Abbildung 33 ist dargestellt, dass die Extraktionspunkte der Plasmide bei unterschiedlichen Anionenkonzentrationen der wässrigen Phase liegen. Der Extraktionspunkt für pUC18 befindet sich zwischen 520 mM und 560 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , pUT649 wird bei 480 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  extrahiert, und für pUK21CMV $\beta$  kehrt sich das Verteilungsverhalten in einem Bereich von 80 mM bis 120 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  um. Die unterschiedlichen Extraktionspunkte in Abhängigkeit der Plasmidgröße sind mit dem Einfluss der Salzkonzentration der wässrigen Phase auf die Mizellgröße zu begründen.



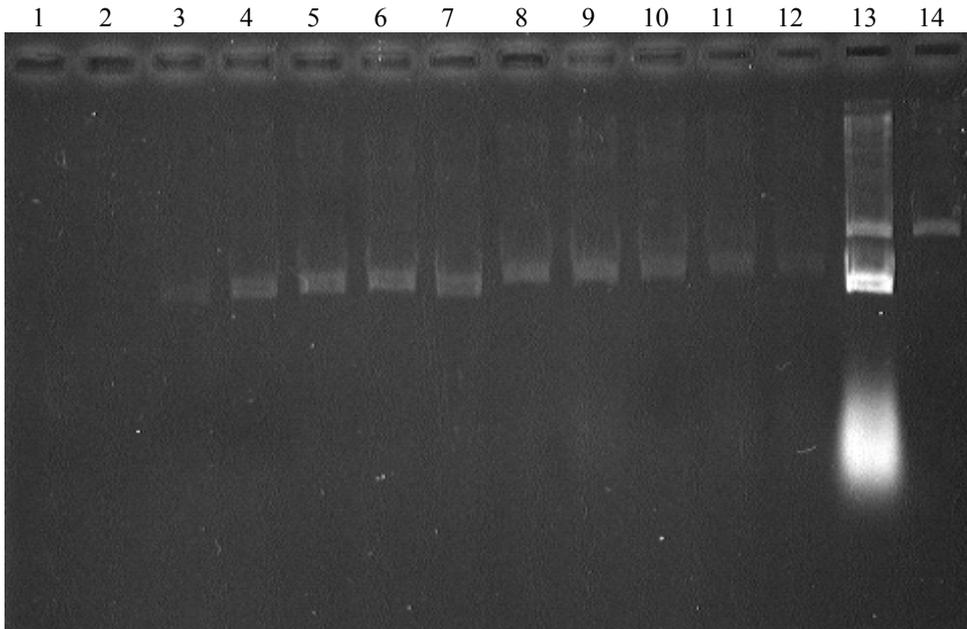
**Abbildung 33** Agarosegelelektrophorese der wässrigen Raffinatphasen nach der Extraktion aus diafiltrierten bakteriellen Klarlysaten mit einer inversmizelaren Phase aus 40 mM TOMAC und 0,5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan. A: pUC18. Spuren 1, 14: DNA 1 kb Marker, Spur 2: diafiltriertes Klarlysat, Spuren 3–13: 360–760 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 40 mM Schritten. B: pUT649. Spuren 1, 14: DNA 1 kb Marker, Spur 2: diafiltriertes Klarlysat, Spuren 3–13: 360–760 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 40 mM Schritten. C: pUK21CMV $\beta$ . Spuren 1, 13: DNA 1 kb Marker, Spur 2: diafiltriertes Klarlysat, Spuren 3–12: 40–760 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 80 mM Schritten.

Die drei verschiedenen Lysate, die hier betrachtet wurden, wiesen bezüglich der RNA-Konzentration deutliche Unterschiede auf. In Abbildung 33B ist die RNA im Agarosegel daher nur sehr schwach erkennbar. Da es sich bei pUC18 um ein kleines Plasmid handelt und eine hohe RNA-Konzentration im Lysat vorhanden ist, kann die Plasmid-DNA kaum von der RNA in Abbildung 33A unterschieden werden. Zudem war die Konzentration von pUC18 in dieser Fermentationscharge relativ gering. Dennoch wird das unterschiedliche Extraktionsverhalten der verschieden großen Plasmide deutlich.

## **4.7 Rückextraktion**

### **4.7.1 Einfluss der Anionenkonzentration**

Im Rahmen der Hinextraktion konnte festgestellt werden, dass die Nukleinsäuren bei geringer Anionenkonzentration aus der wässrigen Phase extrahiert wurden. Wird die Anionenkonzentration der wässrigen Phase über den Extraktionspunkt hinaus erhöht, so verbleibt die komplette Plasmid-DNA bzw. RNA in der wässrigen Phase. Für die Rückextraktion der Plasmid-DNA aus der inversmizellaren Phase in eine neue wässrige Phase könnte daher der gleiche Zusammenhang angenommen werden. Aufgereinigte Plasmid-DNA und RNA wurden für eine Hinextraktion in Gegenwart von 480 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  eingesetzt und mit einer inversmizellaren Phase bestehend aus 40 mM TOMAC und 0,5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan extrahiert. In den Spuren 13 und 14 der Abbildung 34 sind die wässrige Phase vor und nach der Hinextraktion aufgetragen. Im Rahmen der Hinextraktion konnte die oc-Form abgetrennt werden, während ccc-Form und RNA aus der wässrigen Zulaufphase extrahiert wurden. Anschließend wurde die Rückextraktion bei höheren Lithiumsulfatkonzentrationen durchgeführt. Jedoch war es lediglich möglich einen Bruchteil der Plasmid-DNA mit  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen von 520 mM bis 960 mM in eine neue wässrige Phase zu extrahieren (Spur 1-12 Abbildung 34). Auch durch die Verlängerung der Extraktionszeit auf 16 Stunden konnte keine Verbesserung erreicht werden. Somit kann durch alleinige Erhöhung der Anionenkonzentration keine effiziente Rückextraktion der Nukleinsäuren realisiert werden.



**Abbildung 34** Agarosegelelektrophorese der wässrigen Extraktphasen nach der Rückextraktion aus einer inversmizellaren Phase mit 10 mM Tris-Puffer in Gegenwart verschiedener Lithiumsulfatkonzentrationen. Hinextraktion: Die wässrige Zulaufphase bestehend aus  $75 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  RNA und  $480 \text{ mM Li}_2\text{SO}_4$  wurde mit 40 mM TOMAC und 0,5 % (v/v) Ethylhexanol in iso-Octan extrahiert. Spuren 1-12: Wässrige Extraktphase nach Rückextraktion mit 520-960 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 40 mM Schritten, Spur 13: Wässrige Phase vor Hinextraktion, Spur 14: Wässrige Raffinatphase nach Hinextraktion.

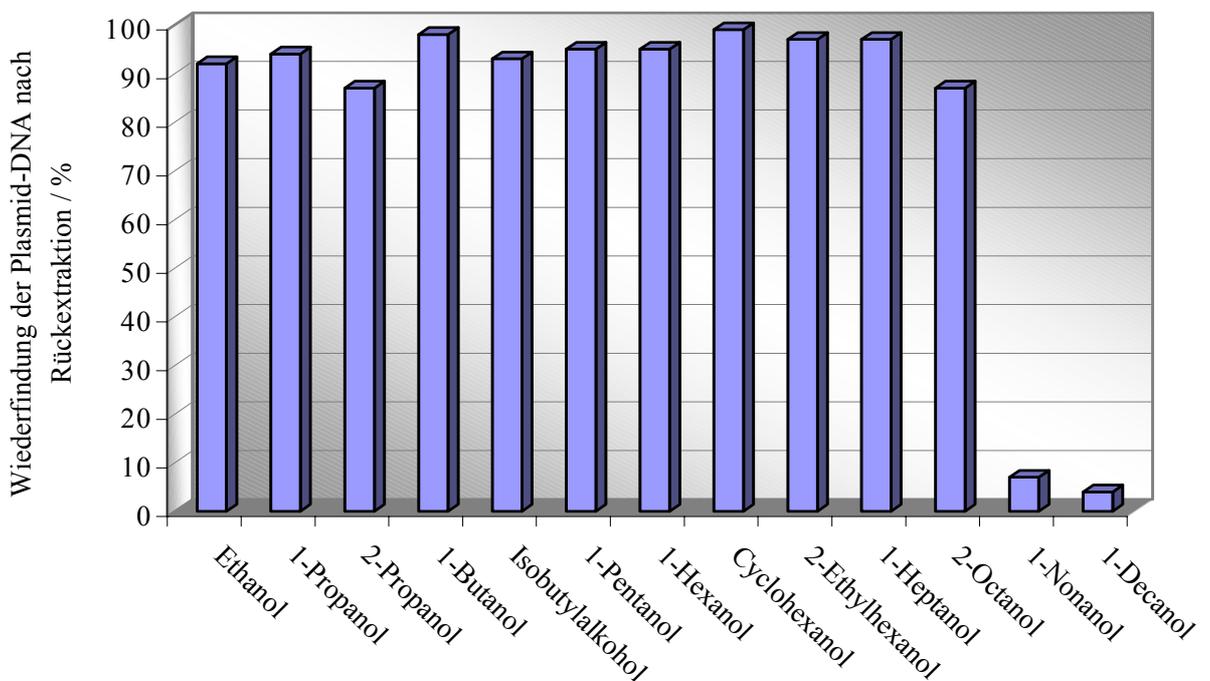
Die mangelnde Rückextraktion durch Erhöhung der Salzkonzentration in der wässrigen Extraktphase, obwohl sowohl die Salzkonzentration als auch die Kontaktzeit der Phasen ausreichend waren, ist zunächst nicht verständlich. Allerdings wurde dieser Effekt schon mehrmals in der Literatur beschrieben. Sowohl für die Extraktion von Proteinen als auch für die Extraktion von Nukleinsäuren wurden Probleme bei der Rückextraktion durch alleinige Erhöhung der Salzkonzentration beobachtet (vgl. Kapitel 2.4.3.3).

#### ***4.7.2 Einfluss der Kettenlänge des Alkohols und der Alkoholkonzentration***

Um die Wiederfindung der Plasmid-DNA im Rahmen der Rückextraktion zu steigern, mussten neben der Ionenstärke weitere Variablen, die den Transfer der Nukleinsäuren beeinflussen, betrachtet werden. Hierzu zählt der Einfluss des verwendeten Alkohols.

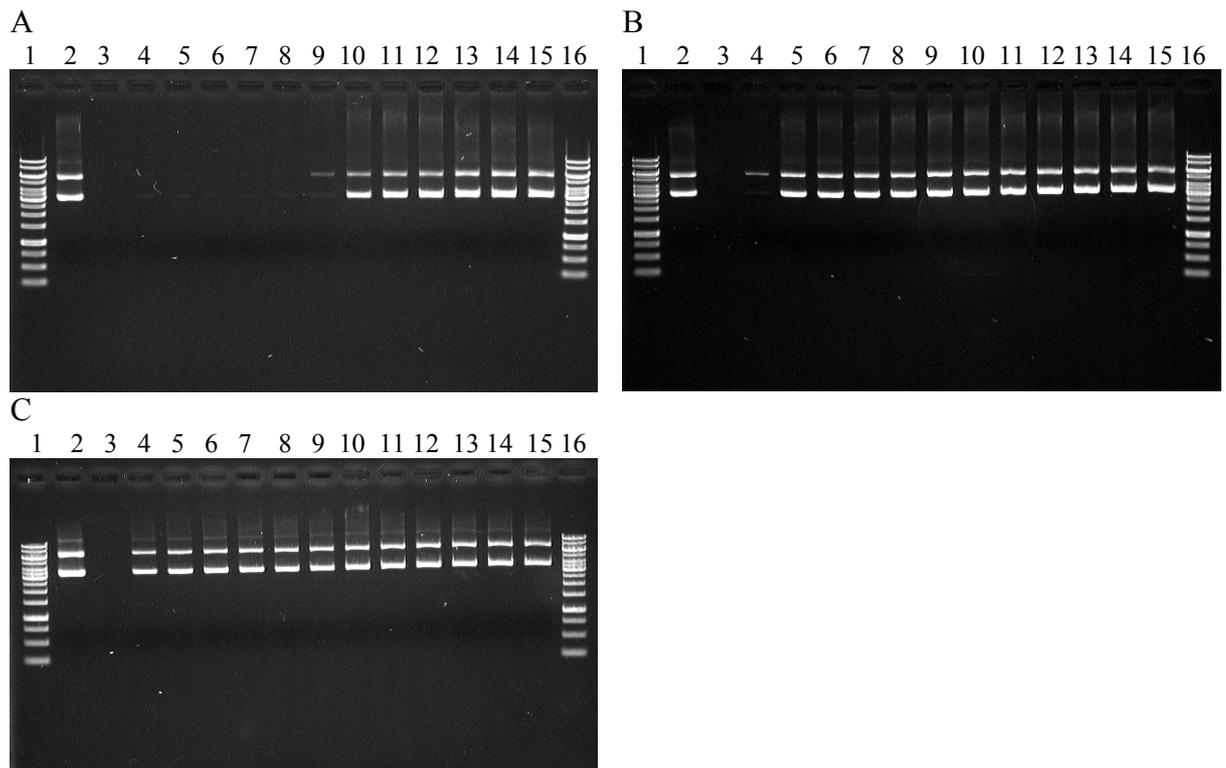
Durch die Erhöhung des Volumenanteils des Alkohols bei der Rückextraktion konnte die Wiederfindung der Plasmid-DNA wesentlich gesteigert werden.

Abbildung 35 zeigt die Wiederfindung aufgereinigter Plasmid-DNA mit einem Volumenanteil von 10 % (v/v) verschiedener Alkohole bezogen auf die wässrige Phase bei der Rückextraktion in Gegenwart von 1 M NaCl. Für die Hinextraktion wurde eine wässrige Phase bestehend aus  $25 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649, 100 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl mit einer inversmizellaren Phase aus 40 mM TOMAC in iso-Octan extrahiert. Zum Lösen von TOMAC wurden die minimal notwendigen Konzentrationen der verwendeten Alkohole eingesetzt (vgl. Tabelle 11). In den meisten Fällen liegt die Wiederfindung nach der Rückextraktion über 90 %. Nur bei Extraktionen mit 1-Nonanol und 1-Decanol wurde mit unter 10 % eine wesentlich geringere Wiederfindung in der wässrigen Extraktphase erreicht. Die unzureichende Rückextraktion mit 1-Nonanol und 1-Decanol beruht darauf, dass diese Alkohole nicht hydrophil sind. Daher gliedern sie sich nicht in die Struktur der inversen Mizellen ein, sondern befinden sich in dem organischen Lösungsmittel. Neben der Verwendung von Alkohol bei der Rückextraktion kann die Wiederfindung der Plasmid-DNA außerdem durch die Zugabe eines anionischen Komplexbildners zusätzlich gesteigert werden.



**Abbildung 35** Wiederfindung der Plasmid-DNA nach der Rückextraktion unter Verwendung verschiedener Alkohole.

Nicht nur die Alkoholkonzentration, sondern auch die Struktur des jeweiligen Alkohols beeinflusst die Rückextraktion von Nukleinsäuren. Somit ist die Anionenkonzentration, bei der sich das Verteilungsverhalten von Plasmid-DNA bei der Rückextraktion umkehrt, durch die Struktur des verwendeten Alkohols bedingt. Dieser Zusammenhang ist am Beispiel von drei verschiedenen Alkoholen (2-Propanol, 1-Pentanol, 1-Heptanol) in Abbildung 36 dargestellt.



**Abbildung 36** Veränderung des Verteilungsverhaltens von Plasmid-DNA unter dem Einfluss von je 5 % (v/v) verschiedener Alkohole in der wässrigen Phase der Rückextraktion. A: Extraktion unter Verwendung von 2-Propanol. B: Extraktion in Gegenwart von 1-Pentanol. C: Extraktion unter Verwendung von 1-Heptanol. Spuren 1, 16: DNA 1 kb Marker, Spur 2: Wässrige Zulaufphase vor Hinextraktion, Spur 3: Wässrige Raffinatphase nach Hinextraktion, Spuren 4-15: Wässrige Extraktphasen nach der Rückextraktion in Gegenwart von 40-480 mM NaCl in 40 mM Schritten.

Die für die Hinextraktion eingesetzte wässrige Zulaufphase enthielt 100 mM NaCl und  $50 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 in 10 mM Tris-Puffer und wurde mit 40 mM TOMAC und 0,05 % (v/v) 2-Propanol (A), 0,05 % (v/v) 1-Pentanol (B) oder 0,04 % (v/v) 1-Heptanol (C) in iso-Octan extrahiert. Die inversmizellare Phase wurde anschließend mit einer

wässrigen Phase unter Verwendung verschiedener NaCl-Konzentrationen und einem Volumenanteil von 5 % (v/v) des zur Hinextraktion eingesetzten Alkohols in eine neue wässrige Extraktphase rückextrahiert. Im Fall von 2-Propanol liegt der Extraktionspunkt bei 280 mM NaCl und für 1-Pentanol bei 80 mM, während sich unter dem Einfluss von 1-Heptanol das Verteilungsverhalten schon bei NaCl-Konzentrationen unter 40 mM NaCl umkehrt. Tendenziell lässt sich sagen, dass bei der Rückextraktion mit kürzerkettigen Alkoholen eine höhere Anionenkonzentration in der wässrigen Extraktphase notwendig ist, um einen Transfer der Plasmid-DNA zu erreichen.

Alkohole haben offensichtlich einen positiven Einfluss auf die Rückextraktion, da diese an der Grenzfläche mit den inversen Mizellen wechselwirken, da sich der hydrophobe Teil des Alkohols zum organischen Lösungsmittel hin ausrichten kann. Dadurch wäre eine Aufweitung zwischen den hydrophoben Resten der Tensidmoleküle möglich und zusätzlich eine Beeinflussung der Mizellstruktur durch die Salzkonzentration in der wässrigen Extraktphase. Die Extraktionspunktverschiebung durch die Verwendung verschiedener Alkohole ist mit deren Struktur und Positionierung in der inversen Mizelle zu begründen. Längerkettige Alkohole bewirken wahrscheinlich durch die Anordnung der Alkylkette zwischen den Tensidmolekülen und der Wechselwirkung mit den hydrophoben Resten des Tensids eine Verkleinerung des Mizellkerns durch eine Steigerung der Krümmung der Oberfläche der inversen Mizelle. Dieser Effekt nimmt mit Kettenlänge und Verzweigungsgrad des Alkohols zu.

#### ***4.7.3 Einflussfaktoren auf die Wiederfindung der RNA nach Rückextraktion***

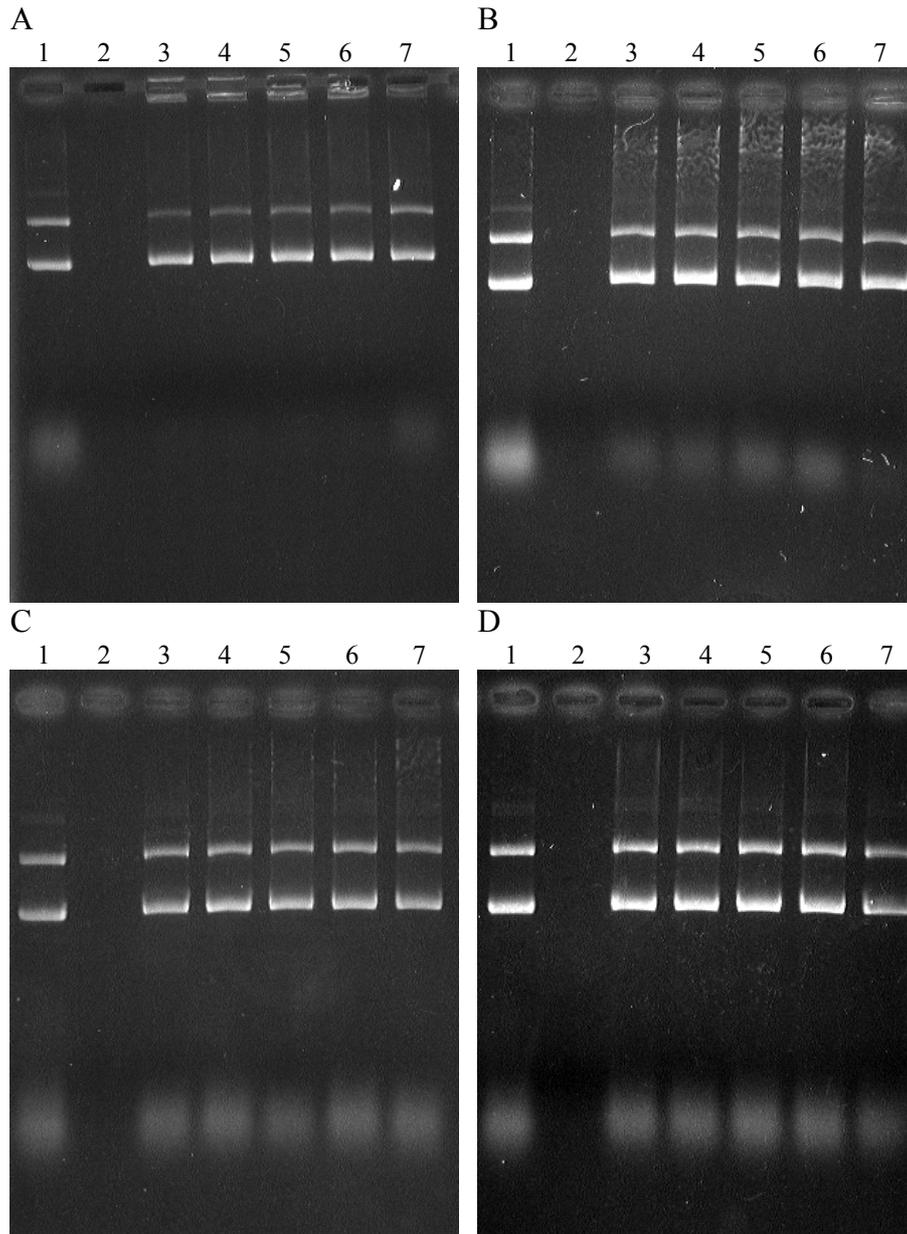
Neben der Wiederfindung der Plasmid-DNA bei der Rückextraktion, ist die Entfernung der RNA während Hin- und Rückextraktion von besonderer Bedeutung im Aufarbeitungsprozess. Die Abreicherung der RNA wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst.

#### ***4.7.4 Einfluss von SDS auf die Abreicherung der RNA während der Extraktion***

Wie schon erwähnt wird angenommen, dass SDS einen Einfluss auf das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren im Extraktionssystem hat. Um dies zu bestätigen, wurden Extraktionen mit verschiedenen SDS-Konzentrationen in der wässrigen Zulaufphase

durchgeführt. Für die Hinextraktion wurden aufgereinigte Plasmid-DNA und RNA in Gegenwart von 100 mM NaCl mit 40 mM TOMAC und 0,05 % (v/v) 2-Propanol in iso-Octan aus der wässrigen Phase extrahiert. Zusätzlich wurden 0 %, 0,1 % (3,5 mM), 0,25 % (8,7 mM) und 0,5 % (17,3 mM) SDS in der wässrigen Phase eingesetzt. Anschließend wurde für die Rückextraktion eine neue wässrige Phase mit 500 mM NaCl und 10 % (v/v) 2-Propanol in 10 mM Tris-Puffer verwendet. In Abbildung 37 ist die Auswertung der wässrigen Extraktphasen mittels Agarosegelelektrophorese dargestellt. Es wird deutlich, dass mit steigender SDS-Konzentration der Transfer der RNA im Extraktionssystem zunimmt. Daher empfiehlt es sich vor der Extraktion SDS durch eine Diafiltration an einer 100 kDa Membran zu entfernen. Soll auf diesen Schritt verzichtet werden, kann die geringe Menge RNA, die nach der Rückextraktion noch vorhanden ist, auch durch weitere Aufarbeitung abgetrennt werden. Auf diese Möglichkeit wird später in Kapitel 4.9.1 eingegangen.

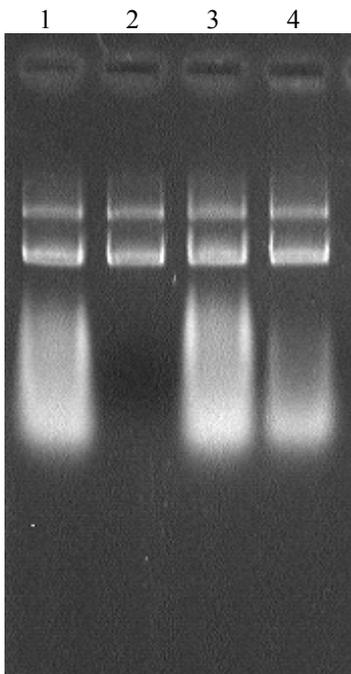
Der Einfluss von SDS auf die Extraktion der RNA ist mit der Interaktion des anionischen Tensids mit der inversen Mizelle zu begründen. Jarudilokkul *et al.* (1999) beschreiben den Einfluss von TOMAC auf AOT inverse Mizellen. In diesem Fall bewirkt die Zugabe von TOMAC die Auflösung der inversen Mizellen, da die gegensätzlich geladenen Tenside Komplexe im Verhältnis 1:1 bilden, die aufgrund der ausladenden Alkylketten hydrophob sind, und als Ionenpaar in die inversmizellare Phase extrahiert werden. Der genaue Einfluss von SDS auf die durch TOMAC gebildeten inversen Mizellen ist bislang nicht geklärt. Durch die geladene Kopfgruppe von SDS findet ebenfalls eine elektrostatische Wechselwirkung mit TOMAC statt. Da SDS jedoch nur eine Alkylkette besitzt, könnte das Tensid in die Struktur der inversen Mizelle integriert werden. Dadurch würde ein ähnlicher Effekt wie durch das Vorhandensein von höheren Salzkonzentrationen (Kapitel 4.7.6) oder länger-kettigen und verzweigten Alkoholen (Kapitel 4.7.5) bei der Hinextraktion hervorgerufen und somit die Struktur der inversen Mizellen beeinflusst werden.



**Abbildung 37** Einfluss von SDS auf die Trennung von Plasmid-DNA und RNA. A: Extraktion ohne Zugabe von SDS zur wässrigen Zulaufphase. B: Extraktion mit 0,1 % SDS. C: Extraktion mit 0,25 % SDS. D: Extraktion mit 0,5 % SDS. Spur 1: Wässrige Zulaufphase vor Hinextraktion, Spur 2: Wässrige Raffinatphase nach Hinextraktion, Spur 3-6: Wässrige Extraktphasen der Rückextraktion.

#### 4.7.5 Einfluss des Alkohols bei der Hinextraktion auf das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren bei der Rückextraktion

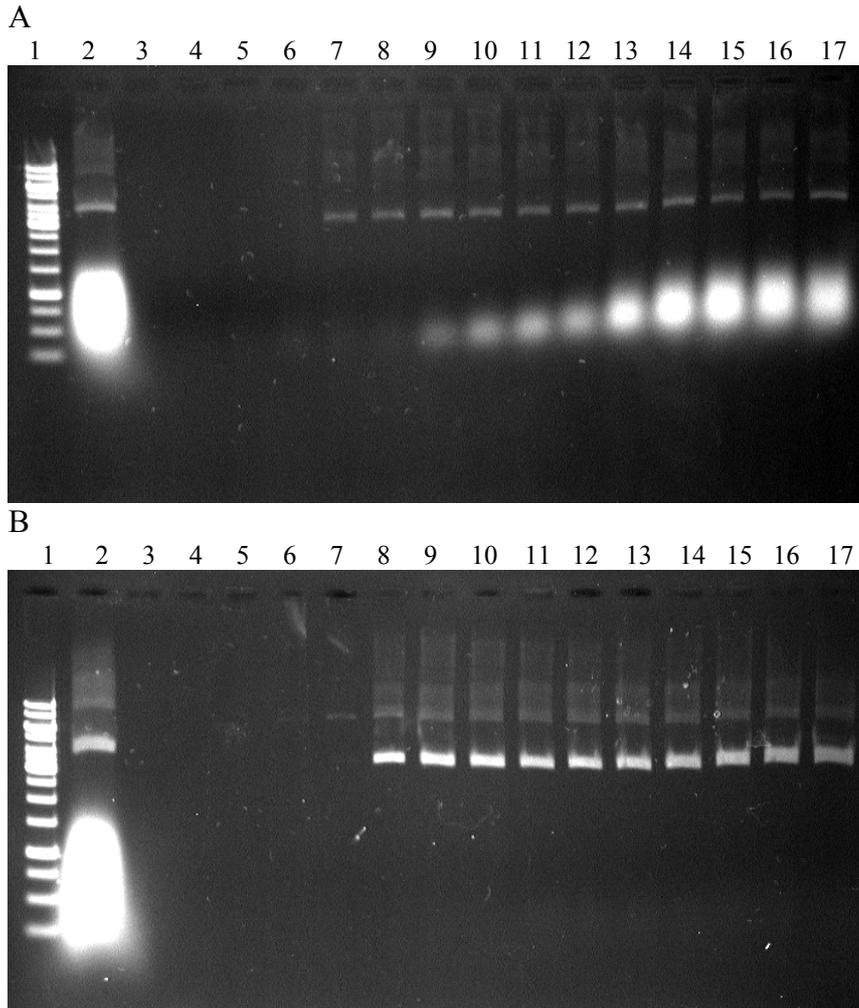
Eine sehr wichtige Rolle spielen neben der Alkoholkonzentration bei der Rückextraktion auch die Struktur des verwendeten Alkohols sowie die Alkoholkonzentration während der Hinextraktion. Um den Einfluss der Alkoholkonzentration bei der Hinextraktion auf den Transfer der RNA während Hin- und Rückextraktion zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Extraktionssysteme gewählt. Bei der ersten Extraktion wurden die Nukleinsäuren mit einer inversmizellaren Phase, die 0,1 % (v/v) Ethylhexanol als Lösungsvermittler enthielt, aus einem diafiltrierten Klarlysat extrahiert. Die zweite inversmizellare Phase enthielt 0,5 % (v/v) Ethylhexanol. Beide Extraktionen fanden in Gegenwart von 200 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  statt. Anschließend wurde für die Rückextraktion 200 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 10 mM Tris-Puffer mit 5 % (v/v) 1-Butanol eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt.



**Abbildung 38** Einfluss der Alkoholkonzentration während der Hinextraktion auf den Transfer der RNA während der Extraktion. Spur 1, 3: Wässrige Zulaufphase vor Hinextraktion, Spur 2: Wässrige Extraktphase nach Rückextraktion unter Verwendung von 0,1 % (v/v) Ethylhexanol in der inversmizellaren Phase während der Hinextraktion, Spur 4: Wässrige Extraktphase nach Rückextraktion unter Verwendung von 0,5 % (v/v) Ethylhexanol in der inversmizellaren Phase während der Hinextraktion.

Es wurde beobachtet, dass die Hinextraktion mit 0,5 % (v/v) Ethylhexanol einen wesentlich höheren Anteil RNA nach der Rückextraktion zufolge hatte als die Hinextraktion mit weniger Ethylhexanol.

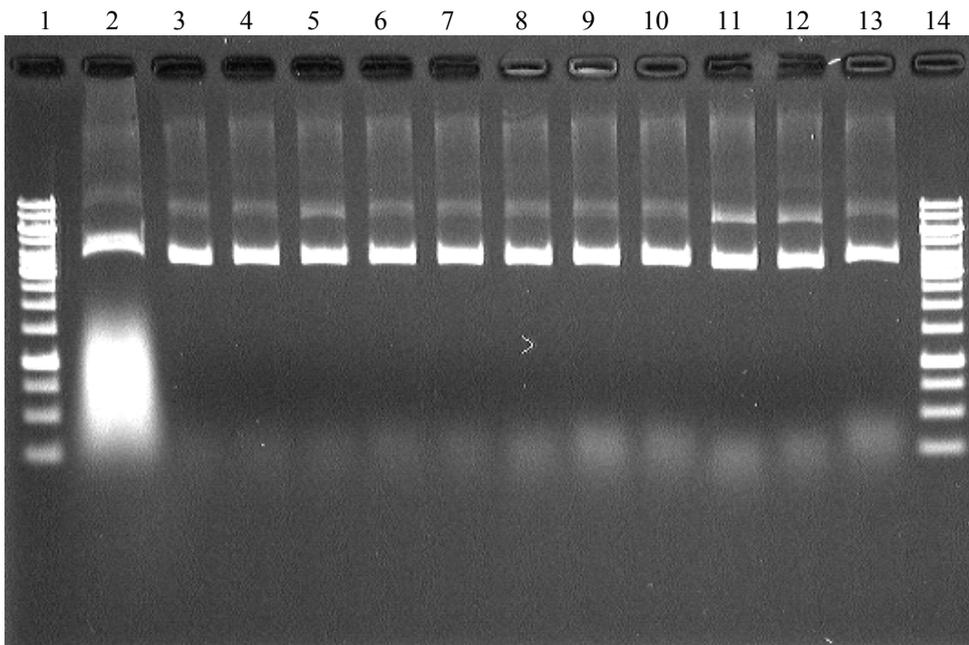
Neben der Alkoholkonzentration hat auch die Struktur des bei der Hinextraktion verwendeten Alkohols einen wesentlichen Einfluss auf die Extraktion der RNA. Es wurden sowohl Extraktionen mit 0,5 % (v/v) Ethylhexanol als Lösungsvermittler in der organischen Phase der Hinextraktion durchgeführt, als auch mit 0,5 % (v/v) 1-Butanol. Die anschließende Rückextraktion bei beiden Extraktionssystemen fand unter dem Einfluss verschiedener Lithiumsulfatkonzentrationen in Gegenwart von 4 % (v/v) Butanol statt. Abbildung 39 zeigt, dass der Einsatz von Ethylhexanol in der organischen Phase der Hinextraktion eine hohe Wiederfindung der RNA nach der Rückextraktion bewirkt, die jedoch unerwünscht ist, da RNA aus dem Produktstrom abgetrennt werden soll. Bei der Extraktion mit Butanol hingegen konnte die RNA während der Extraktion vollständig abgereichert werden. Da nach der Hinextraktion keine RNA in der wässrigen Raffinatphase detektiert und eine Trübung an der Phasengrenzfläche beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass die RNA dort präzipitiert. Die Trübung wird jedoch zusätzlich durch die Präzipitation von Proteinen aus dem Klarlysat hervorgerufen.



**Abbildung 39** Trennung von Plasmid-DNA und RNA in Gegenwart verschiedener Alkohole während der Hinextraktion. A: 0,5 % (v/v) Ethylhexanol. B: 0,5 % (v/v) Butanol. Spur 1: DNA 1 kb Marker, Spur 2: Wässrige Zulaufphase vor Hinextraktion, Spuren 3-17: Extraktphasen nach der Rückextraktion in Gegenwart von 4 % (v/v) Butanol und 120-400 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  in 20 mM Schritten.

Neben Extraktionen mit Ethylhexanol und 1-Butanol wurde zusätzlich der Einfluss weiterer Alkohole auf den Transfer der RNA untersucht. Hierzu wurde für die Hinextraktion ein mit dem selben Volumen 10 mM Tris-Puffer verdünntes Klarlysat eingesetzt. Die Rückextraktion fand in Gegenwart von 500 mM NaCl in 10 mM Tris-Puffer und 10 % (v/v) des bei der Hinextraktion verwendeten Alkohols statt. Vorangegangene Versuche zeigten, dass für die Rückextraktion mit Butanol eine Konzentration von 4 % (v/v) bezogen auf die wässrige Phase für den vollständigen Transfer der Plasmid-DNA ausreichend war. Um jedoch die notwendige Konzentration nicht für jeden Alkohol

bestimmen zu müssen, wurden im folgenden für die Rückextraktion 10 % (v/v) des jeweiligen Alkohols eingesetzt. In Abbildung 40 wird deutlich, dass die Verwendung von länger-kettigen Alkoholen bei der Hinextraktion zu einer vermehrten Rückextraktion der RNA führt. Für die Hinextraktion wurde die minimal als Lösungsvermittler benötigte Alkoholmenge eingesetzt, daher sind die Unterschiede nicht so deutlich wie in Abbildung 39 zu sehen.



**Abbildung 40** Agarosegelelektrophorese der wässrigen Extraktphasen nach der Rückextraktion mit verschiedenen Alkoholen. Spuren 1, 14: DNA 1 kb Marker, Spur 2: Wässrige Zulaufphase vor der Hinextraktion, Spuren 3-13: Wässrige Extraktphasen der Rückextraktion, Spur 3: 1-Propanol, Spur 4: 2-Propanol, Spur 5: 1-Butanol, Spur 6: Isobutylalkohol, Spur 7: 1-Pentanol, Spur 8: 1-Hexanol, Spur 9: 1-Heptanol, Spur 10: 2-Octanol, Spur 11: 1-Nonanol, Spur 12: 1-Decanol.

Generell lässt sich also sagen, dass mit steigender Kettenlänge bzw. Verzweigung des Alkohols und mit steigender Alkoholkonzentration bei der Hinextraktion mehr RNA nach der Rückextraktion detektiert werden kann. Dies könnte mit dem Einfluss der Alkoholstruktur auf die Krümmung der Mizelloberfläche erklärt werden. Sowohl höhere Kettenlängen als auch die Verzweigung des Alkohols könnten eine verstärkte Oberflächenkrümmung bewirken. Daher wäre es möglich, dass sich die einseitig durch Tensid-anlagerungen abgeschirmte RNA durch Krümmung des TOMAC-RNA-Komplexes zu

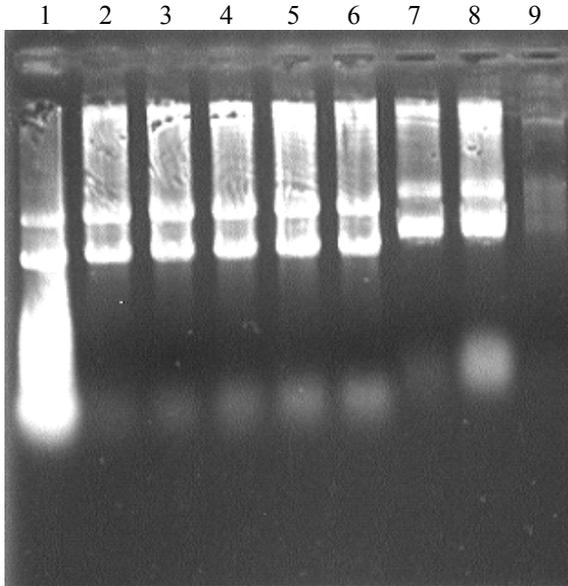
einer nach außen hydrophoben Struktur anordnen könnte und somit in die organische Phase übergeht.

#### ***4.7.6 Einfluss der Anionenkonzentration bei der Hinextraktion auf den Transfer der RNA***

Neben dem bei der Hinextraktion verwendeten Alkohol hat auch die Anionenkonzentration in der wässrigen Phase der Hinextraktion einen Einfluss auf die Wiederfindung der RNA nach der Rückextraktion. Zur Untersuchung des Einflusses der Anionenkonzentration wurden Hinextraktionen aus diafiltriertem Klarlysat in Gegenwart verschiedener Natriumchlorid- und Calciumchloridkonzentrationen durchgeführt. Als Lösungsvermittler in der organischen Phase dienten 0,05 % (v/v) Ethanol. Für die Rückextraktion wurden eine wässrige Phase bestehend aus 500 mM NaCl und 10 % (v/v) Ethanol in 10 mM Tris-Puffer eingesetzt. Um auch geringe RNA-Mengen im Agarosegel detektieren zu können, fand bei der Rückextraktion durch Variation des Volumenverhältnisses von wässriger zu organischer Phase im Verhältnis 1:5 eine Ankonzentrierung statt. Die unterschiedlichen Volumenverhältnisse der Extraktionsphasen werden in den folgenden Kapiteln sowohl während der Hinextraktion als auch bei der Rückextraktion genutzt, um durch die daraus resultierende Ankonzentrierung geringe Mengen der RNA im Agarosegel nachweisen zu können. Dabei wirken sich die Phasenverhältnisse jedoch nicht auf die vollständige Wiederfindung der Plasmid-DNA nach dem Extraktionsprozess aus. Eine Überladung der Agarosegele mit pDNA wird bewusst in Kauf genommen. Auf quantitative Daten bezüglich der Wiederfindung der Plasmid-DNA wurde an dieser Stelle verzichtet, da die vollständige Wiederfindung wiederholt auch bei Variation der Phasenverhältnisse bestätigt wurde und der Fokus bei diesen Versuchen auf der Untersuchung der RNA-Abreicherung während des Extraktionsprozesses lag.

Im Fall von NaCl ist nur ein geringer Einfluss der Anionenkonzentration auf die Extraktion der RNA zu erkennen wie in Abbildung 41 in den Spuren 2-6 zu sehen ist. Im Fall von Calciumchlorid scheint die Konzentration während der Hinextraktion einen wesentlich größeren Einfluss zu haben. Bei einer CaCl<sub>2</sub>-Konzentration von 50 mM (100 mM Chlorid) wird deutlich mehr RNA nach der Rückextraktion wiedergefunden als bei der Extraktion mit 25 mM CaCl<sub>2</sub> (Abbildung 41 Spuren 7-8). Wurden mehr als 50 mM

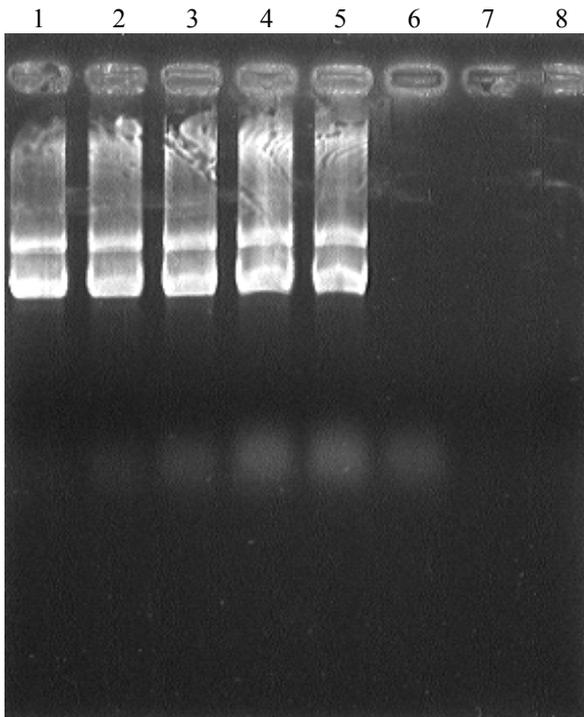
CaCl<sub>2</sub> für die Hinextraktion eingesetzt, wurde der Extraktionspunkt der Hinextraktion überschritten, was zu einer unvollständigen Extraktion führte.



**Abbildung 41** Analyse des Einflusses unterschiedlicher Salzkonzentrationen bei der Hinextraktion auf das Extraktionsverhalten der RNA. Spur 1: Wässrige Zulaufphase vor Hinextraktion, Spur 2-9: wässrige Extraktphasen nach der Rückextraktion, Spur 2: Hinextraktion mit 50 mM NaCl, Spur 3: Hinextraktion mit 100 mM NaCl, Spur 4: Hinextraktion mit 150 mM NaCl, Spur 5: Hinextraktion mit 200 mM NaCl, Spur 6: Hinextraktion mit 240 mM NaCl, Spur 7: Hinextraktion mit 25 mM CaCl<sub>2</sub>, Spur 8: Hinextraktion mit 50 mM CaCl<sub>2</sub>, Spur 9: Hinextraktion mit 75 mM CaCl<sub>2</sub>.

Neben dem Einfluss von Natriumchlorid und Calciumchlorid wurde ebenfalls der Einfluss verschiedener Kaliumacetatkonzentrationen auf das Extraktionsverhalten der RNA untersucht. Es wurden KOAc-Konzentrationen von 100 mM bis 1000 mM in Verbindung mit 100 mM NaCl bei der Hinextraktion eingesetzt. Wie in Abbildung 42 gezeigt, ist auch für Kaliumacetat die gleiche Tendenz zu erkennen. Je höher die Salz- bzw. Anionenkonzentration bei der Hinextraktion ist, desto mehr RNA wird nach der Rückextraktion wiedergefunden. Dieses Ergebnis ist vor allem für die Durchführung der Diafiltration eines bakteriellen Klarlysates vor der Extraktion von Bedeutung. Wird bei der Diafiltration die Kaliumacetatkonzentration des Lysates nicht ausreichend herabgesetzt, kann es durchaus zu einer unvollständigen Abtrennung der RNA während des Extraktionsprozesses kommen. Offensichtlich hat neben dem bei der Hinextraktion verwend-

ten Alkohol auch das eingesetzte Salz einen Einfluss auf die Mizellstruktur und somit auf die Extraktion der RNA. Durch die Erhöhung der Anionenkonzentration wird die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Tensidkopfgruppen abgeschwächt. Dadurch könnte bezüglich der RNA eine ähnliche Auswirkung wie durch Alkohol hervorgerufen werden bzw. der Effekt, der aus der Struktur des Alkohols resultiert, verstärkt werden.

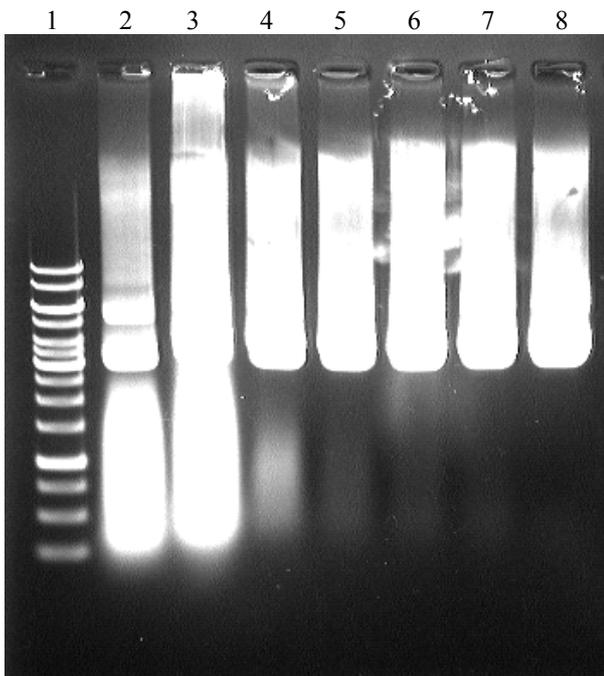


**Abbildung 42** Agarosegelelektrophorese der wässrigen Extraktphasen der Rückextraktion unter Verwendung unterschiedlicher Kaliumacetatkonzentrationen während der Hinextraktion. Spur 1: Hinextraktion mit 100 mM NaCl, Spur 2: Hinextraktion mit 100 mM NaCl und 100 mM KOAc, Spur 3: Hinextraktion mit 100 mM NaCl und 200 mM KOAc, Spur 4: Hinextraktion mit 100 mM NaCl und 300 mM KOAc, Spur 5: Hinextraktion mit 100 mM NaCl und 400 mM KOAc, Spur 6: Hinextraktion mit 100 mM NaCl und 500 mM KOAc, Spur 7: Hinextraktion mit 100 mM NaCl und 600 mM KOAc, Spur 8: Hinextraktion mit 100 mM NaCl und 1000 mM KOAc.

#### ***4.7.7 Einfluss der Phasentrennung nach der Extraktion***

Ein weiterer wichtiger Parameter bezüglich der RNA-Abtrennung während der Extraktion ist die Phasentrennung nach der Hinextraktion. Zur Betrachtung dieser Einflussgröße wurde auf eine direkte Zentrifugation des Extraktionssystems nach der Hinextraktion

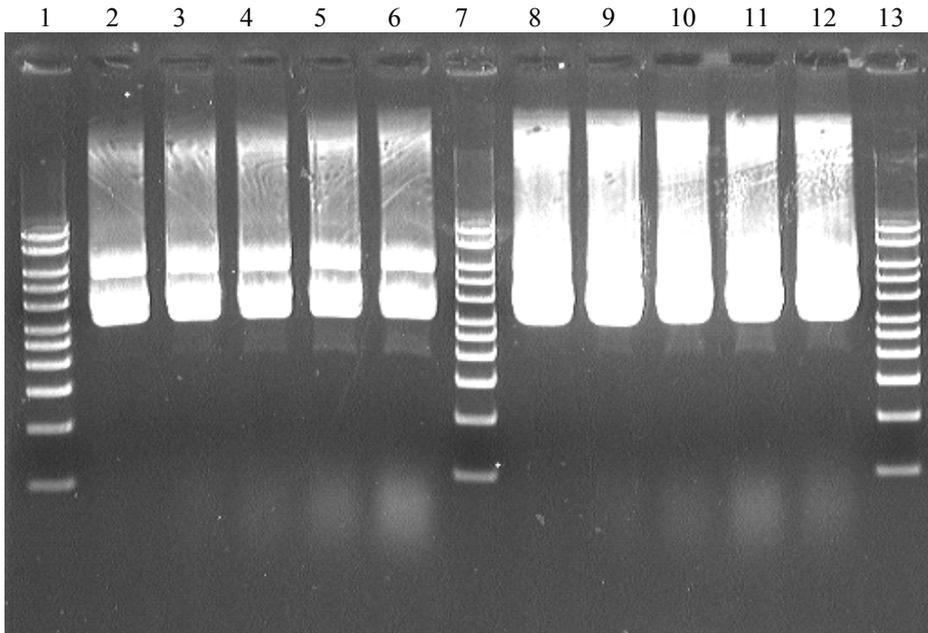
verzichtet. In Intervallen von 1 min, 15 min, 30 min, 45 min und 60 min wurden Proben der inversmizellaren Phase entnommen und zur Rückextraktion eingesetzt. Zusätzlich wurde das Extraktionssystem nach der Hinextraktion zentrifugiert (5 min bei  $5000 \text{ min}^{-1}$ , Rotor 12169) und anschließend die Rückextraktion durchgeführt. Für die Hinextraktion wurde diafiltriertes Klarlysat mit einer NaCl-Konzentration von 100 mM eingesetzt. Als inversmizellare Phase wurden 40 mM TOMAC und 0,05 % (v/v) 2-Propanol in iso-Octan verwendet. Für die Rückextraktion wurden 500 mM NaCl in 10 mM Tris-Puffer eingesetzt, und es fand eine 5fache Ankonzentrierung durch Veränderung des Phasenverhältnisses von wässriger zu organischer Phase (1:5) statt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 dargestellt. Um eine Abtrennung der RNA bei der Hinextraktion zu erreichen, ist die Zentrifugation des Extraktionssystems erforderlich. Diese Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass RNA bevorzugt an der Phasengrenze des Extraktionssystems zu finden ist. In der wässrigen Raffinatphase konnten nach der Hinextraktion keine Nukleinsäuren nachgewiesen werden.



**Abbildung 43** Analyse der wässrigen Extraktphasen nach der Rückextraktion unter dem Einfluss unterschiedlich langer Phasentrennung nach der Hinextraktion. Spur 1: DNA 1 kb Marker, Spur 2: wässrige Zulaufphase vor Hinextraktion, Spur 3-8: wässrige Extraktphasen, Spur 3: Phasentrennung 1 Minute, Spur 4: Phasentrennung 15 Minuten, Spur 5: Phasentrennung 30 Minuten, Spur 6: Phasentrennung 45 Minuten, Spur 7: Phasentrennung 60 Minuten, Spur 8: Zentrifugation nach Hinextraktion.

#### ***4.7.8 Einfluss der Lysatkonzentration auf den Transfer der RNA***

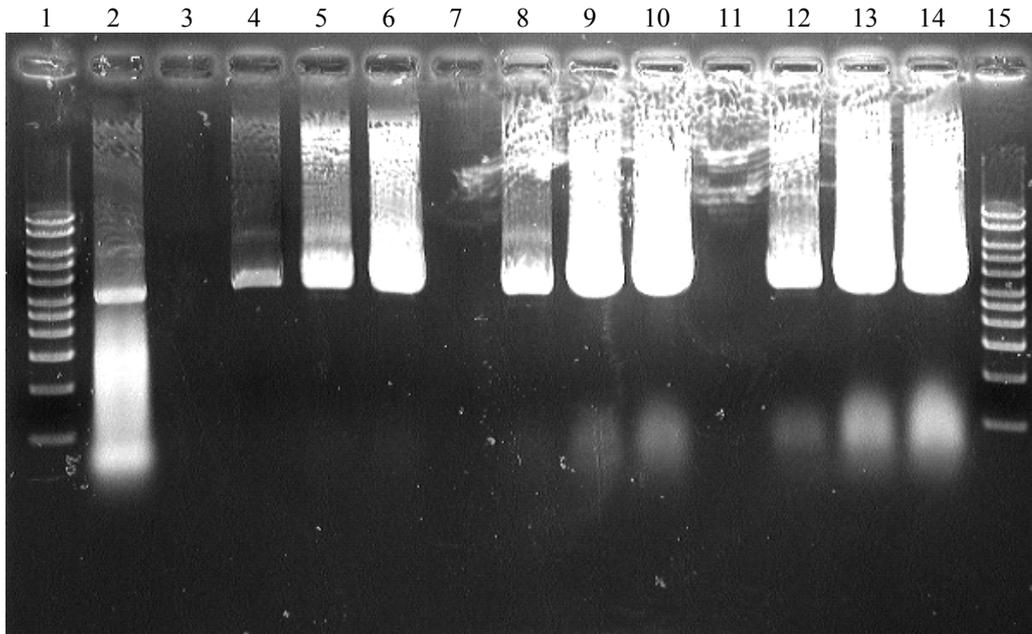
Um das Extraktionsverhalten der Nukleinsäuren genauer zu untersuchen, wurde der Einfluss des Konzentrationsverhältnisses von RNA und Plasmid-DNA in der wässrigen Zulaufphase betrachtet. Zunächst wurden zu diesem Zweck bereits aufgearbeitete Plasmid-DNA und RNA für die Untersuchung eingesetzt. Die Konzentration des Plasmids pUT649 wurde mit  $50 \text{ mg L}^{-1}$  bzw.  $100 \text{ mg L}^{-1}$  in der wässrigen Phase konstant gehalten. Die RNA-Konzentration hingegen wurde variiert. Es wurden Konzentrationen von  $250 \text{ mg L}^{-1}$  bis  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  eingesetzt. Die Nukleinsäuren wurden in Gegenwart von  $50 \text{ mM NaCl}$  in  $10 \text{ mM Tris-Puffer}$  mit  $40 \text{ mM TOMAC}$  und  $0,05 \%$  (v/v) 2-Propanol in iso-Octan extrahiert. Das Phasenverhältnis von wässriger Phase zu inversemizellarer Phase betrug bei der Hinextraktion 1:1 und bei der Rückextraktion 1:5, um durch die Ankonzentrierung auch geringe RNA-Mengen im Agarosegel nachweisen zu können. Zur Rückextraktion wurden  $500 \text{ mM NaCl}$  und  $10 \%$  (v/v) 2-Propanol in  $10 \text{ mM Tris-Puffer}$  eingesetzt. Abbildung 44 zeigt die wässrigen Extraktphasen nach der Rückextraktion. Ab einer eingesetzten RNA-Konzentration von  $500 \text{ mg L}^{-1}$  ist die RNA schwach im Agarosegel zu erkennen. Zu beachten ist, dass auch bei der Extraktion einer wesentlich höheren RNA-Konzentration von  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  nicht deutlich mehr RNA im Agarosegel nachzuweisen ist.



**Abbildung 44** Einfluss unterschiedlicher RNA-Konzentrationen in der wässrigen Phase der Hinextraktion auf die Wiederfindung der RNA nach Rückextraktion. Spur 1, 7, 13: DNA 1 kb Marker, Spur 2: Hinextraktion mit  $50 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 und  $250 \text{ mg L}^{-1}$  RNA, Spur 3:  $50 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 und  $500 \text{ mg L}^{-1}$  RNA, Spur 4:  $50 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 und  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  RNA, Spur 5:  $50 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 und  $1500 \text{ mg L}^{-1}$  RNA, Spur 6:  $50 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 und  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  RNA, Spur 8:  $100 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 und  $250 \text{ mg L}^{-1}$  RNA, Spur 9:  $100 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 und  $500 \text{ mg L}^{-1}$  RNA, Spur 10:  $100 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 und  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  RNA, Spur 11:  $100 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 und  $1500 \text{ mg L}^{-1}$  RNA, Spur 12:  $100 \text{ mg L}^{-1}$  pUT649 und  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  RNA.

Der Einfluss der Nukleinsäurekonzentration bei der Hinextraktion wurde anschließend an Extraktionen mit diafiltriertem Klarlysat weiter untersucht. Hierzu wurden die Phasenverhältnisse von wässriger und inversmizellarer Phase sowohl während der Hinextraktion als auch bei der Rückextraktion variiert. Die Extraktionsbedingungen bezüglich Anionenkonzentration und Alkoholkonzentration wurden analog den Bedingungen mit Modellsubstanzen gewählt. Abbildung 45 zeigt die Analyse der wässrigen Extraktphasen nach der Rückextraktion mittels Agarosegelelektrophorese. Im Fall eines gleichbleibenden Phasenverhältnisses bei der Hinextraktion ist auch bei einer starken Ankonzentrierung von 1:10 bei der Rückextraktion und Überladung des Agarosegels bezüglich der Plasmid-DNA keine RNA nachweisbar. Wird jedoch das Volumenverhältnis schon während der Hinextraktion verändert, so wird die RNA während des Extraktionsprozesses nicht vollständig abgereichert. Die Nukleinsäurekonzentration in der

wässrigen Zulaufphase beeinflusst demnach wesentlich die Effektivität des Aufarbeitungsprozesses bezüglich der RNA-Abreicherung. Dies ist insbesondere für die Durchführung der Diafiltration vor der Extraktion von Bedeutung, da somit keine oder nur eine geringe Ankonzentrierung des bakteriellen Klarlysats möglich ist.



**Abbildung 45** Einfluss der Ankonzentrierung des Lysats während Hin- und Rückextraktion auf die Wiederfindung der RNA nach Rückextraktion. Spur 1, 15: DNA 1 kb Marker, Spur 2: diafiltriertes Klarlysats vor Hinextraktion, Spur 3, 7, 11: wässrige Raffinatphasen der Hinextraktion, Spur 4-6: Phasenverhältnis bei der Hinextraktion 1:1, Spur 8-10: Phasenverhältnis wässrige Phase zu organische Phase bei der Hinextraktion 5:1, Spur 12-14: Phasenverhältnis wässrige Phase zu organische Phase bei der Hinextraktion 10:1, Spur 4, 8, 12: Phasenverhältnis bei der Rückextraktion 1:1, Spur 5, 9, 13: Phasenverhältnis wässrige Phase zu organische Phase bei der Rückextraktion 1:5, Spur 6, 10, 14: Phasenverhältnis wässrige Phase zu organische Phase bei der Rückextraktion 1:10.

Obwohl die Bedingungen bezüglich des verwendeten Alkohols und Salzes bei der Hinextraktion optimiert wurden, geht die RNA bei höheren Konzentrationen in die organische Phase über. Möglicherweise wird die Struktur des RNA-TOMAC-Komplexes zusätzlich durch die hohe Molekülkonzentration an der Phasengrenze beeinflusst. Um hierzu genauere Aussagen treffen zu können, müsste das Verhalten an der Phasengrenzfläche der im Extraktionssystem vorhandenen Moleküle genauer untersucht werden.

Als Qualitätskriterium bezüglich der RNA wird gefordert, dass im Agarosegel keine RNA mehr detektiert werden darf. Die untere Nachweisgrenze von RNA im Agarosegel liegt bei 2 ng pro Bande. Dieses Kriterium wurde bislang nicht auf die aufgetragene Plasmid-Menge bezogen. Da es jedoch einen wesentlichen Unterschied macht, ob RNA in Gegenwart einer schwachen pDNA-Bande oder in einem überladenen Agarosegel nicht mehr nachweisbar ist, sollte über ein konkreteres Qualitätskriterium nachgedacht werden.

#### ***4.8 Abreicherung von Verunreinigungen während der Extraktion***

In den bisher beschriebenen Versuchen wurden verschiedene Variablen untersucht, die den Extraktionsprozess beeinflussen. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Wiederfindung der Plasmid-DNA und die Abreicherung der RNA gerichtet.

Ziel des Extraktionsprozesses ist es, unerwünschte Komponenten aus dem bakteriellen Klarlysat zu entfernen, um somit die Qualitätsanforderungen für pharmazeutisch einsetzbare Plasmid-DNA zu erfüllen. Hierzu zählen RNA, chromosomale DNA, Proteine und Endotoxine. Wie in Kapitel 4.7.8 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, RNA durch die Extraktion vollständig zu entfernen. Im folgenden wird auf die Möglichkeit zur Abreicherung der übrigen Komponenten genauer eingegangen.

##### ***4.8.1 Chromosomale DNA***

Um die Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen zu isolieren, wurde eine alkalische Lyse durchgeführt. Im folgenden wurde die Auswirkung verschiedener Lysebedingungen auf den Gehalt der chromosomalen DNA im Lysat untersucht. Neben der herkömmlichen Methode des scherkraftarmen Invertierens während der Lyse, wurden verschiedene Systeme getestet, welche deutliche Differenzen bezüglich ihrer Scherkraftintensität aufweisen. Es wurden zwei Aufschlüsse unter Verwendung eines Intermig-Rührers im 3 L-Maßstab bei einer Drehfrequenz von 200 min<sup>-1</sup> und 600 min<sup>-1</sup> durchgeführt, ein Aufschluß mit 400 min<sup>-1</sup> im 1 L-Maßstab unter Verwendung eines Magnetrührkerns, sowie ein weiterer Aufschluss der Biomasse unter Verwendung einer Flotationssäule. Die erhaltenen Lysate wurden dann um den Faktor 2 verdünnt und zur Extraktion eingesetzt. Anschließend wurde die Abreicherung der chromosomalen DNA durch das Extraktions-

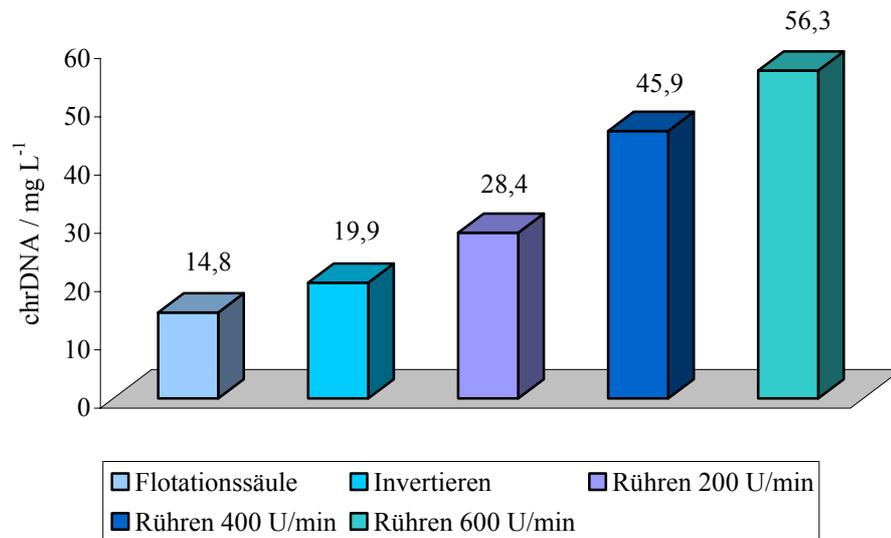
system mittels Q-PCR quantifiziert. Um ein zu hohes Hintergrundsignal während der PCR durch die Bindung von SYBR Green an die Plasmid-DNA zu vermeiden, wurde zur Analyse des Extraktionsverhaltens der chromosomalen DNA ein plasmidfreier Bakterienstamm (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) für die alkalische Lyse eingesetzt.

#### ***4.8.1.1 Einfluss verschiedener Lysebedingungen auf die Konzentration der chromosomalen DNA im Lysat***

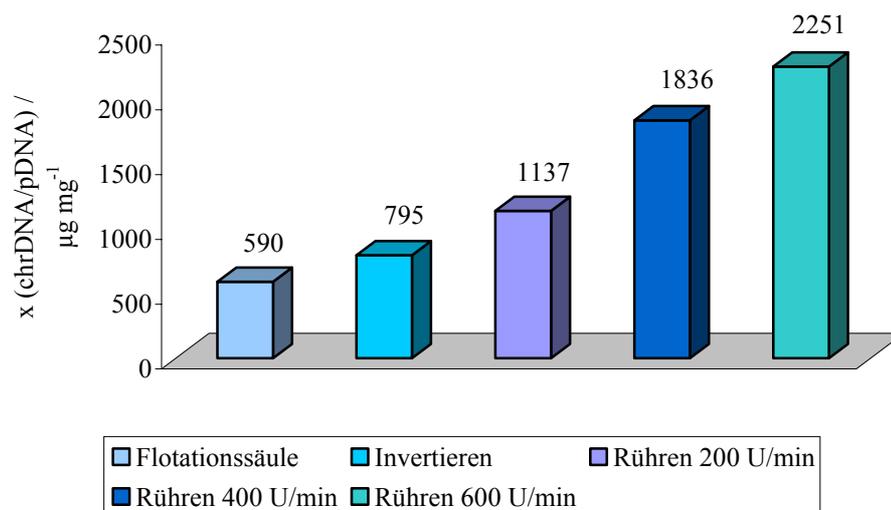
Bei Betrachtung der im Lysat gemessenen Konzentrationen der chromosomalen DNA wird eine Abhängigkeit zwischen freigesetzter chrDNA und Lyseart erkennbar. Wie in Abbildung 46 dargestellt, werden im Lysat chrDNA-Konzentrationen im Bereich von 14,8 mg L<sup>-1</sup> bis 56,3 mg L<sup>-1</sup> abhängig von der Höhe der Scherkraft bei der Lyse gemessen. Demnach wurde bestätigt, dass eine scherkraftarme Lyse bei der Produktion von Plasmid-DNA zu empfehlen ist, um die Verunreinigung mit chrDNA im Produkt möglichst gering zu halten. Gescherte chromosomale DNA konnte in bisherigen Aufarbeitungsprozessen, die für die pDNA-Produktion eingesetzt werden, aufgrund ihrer Fragmentinhomogenität und sehr ähnlichen physikalischen Eigenschaften zur pDNA nur schwer von dieser abgetrennt werden. Dies ist jedoch für den Einsatz von Plasmid-DNA im pharmazeutischen Bereich unbedingt notwendig. Bei den durchgeführten Versuchen mussten aufgrund des messtechnisch notwendigen Einsatzes eines plasmidfreien Stammes bezüglich der Analyse der chromosomalen DNA im Lysat diverse Annahmen getroffen werden, um Aussagen bezüglich der chrDNA pro definierter Plasmidmenge machen zu können. Bei den Berechnungen der chrDNA pro Menge Plasmid wurde angenommen, dass bei allen verwendeten Lysaten, unabhängig von der Art der Lyse, eine Plasmid-DNA-Konzentration von 25 mg L<sup>-1</sup> im Lysat vorliegen würde. Diese Annahmen bedingen eine relativ hohe Unsicherheit der in Abbildung 46B dargestellten Ergebnisse. Des Weiteren ist eine Messunsicherheit aufgrund des PCR-Analyseverfahrens zu erwarten, da lediglich geringe Konzentrationen gemessen wurden. Aufgrund der eingesetzten geringen Volumina, der hohen Verdünnungsstufen und der notwendigen Konzentrationsschätzung, handelt sich bei den vorliegenden Angaben bezüglich der chrDNA pro mg Plasmid-DNA anstelle exakter Werte eher um ungefähre Angaben, welche jedoch auch bei mehrmaliger Wiederholung der Versuche bestätigt werden konnten.

Im Rahmen der Lyse mittels Flotationsäule wurde exemplarisch die Plasmidkonzentration ermittelt. Die gemessene Plasmidkonzentration ist mit etwa  $50 \text{ mg L}^{-1}$  um den Faktor 2 im Vergleich der zur Auswertung getroffenen Annahme von  $25 \text{ mg L}^{-1}$  höher. Diese Differenz kann auf Unterschiede bezüglich der Biomassequalität zurückgeführt werden. Da jedoch zwei unterschiedliche Fermentationen aufgrund der Wahl eines plasmidfreien zur chrDNA-Konzentrationsbestimmung und eines plasmidhaltigen Stammes zur pDNA-Konzentrationsbestimmung notwendig waren, ist kein expliziter Vergleich möglich. Es ist jedoch zu beachten, dass bei Erhöhung der Plasmidkonzentration im Extraktionssystem bei gleichbleibender chrDNA-Konzentration, die Menge der chrDNA pro Menge Plasmid verringert würde. Anhand der in Abbildung 46B dargestellten Ergebnisse ist ein deutlicher Trend bezüglich der chrDNA pro Plasmid in Abhängigkeit des Lyseverfahrens zu beobachten. Ein scherkraftintensiver Aufschluss unter Verwendung eines Intermig-Rührers bei einer Drehfrequenz von  $600 \text{ min}^{-1}$  im 3 L-Maßstab für die Lysatproduktion führte zu einer hohen Konzentration chromosomaler DNA von  $2251 \text{ } \mu\text{g}$  pro  $\text{mg}$  pDNA. Auch bei einer etwas geringeren Rührgeschwindigkeit von  $400 \text{ min}^{-1}$  wurde die Plasmid-DNA durch  $1836 \text{ } \mu\text{g}$  chrDNA pro  $\text{mg}$  pDNA verunreinigt. Erst eine deutliche Reduktion der Rührfrequenz auf  $200 \text{ min}^{-1}$  erzeugte bei Verwendung des Intermig-Rührers schonendere Lysebedingungen. Hieraus resultierte ein Konzentrationsverhältnis von  $1137 \text{ } \mu\text{g}$  chrDNA pro  $\text{mg}$  pDNA. Der Grad der Verunreinigung konnte durch manuelles Invertieren der Lyselösung noch verringert werden. Unter diesen schonenden Bedingungen wurde eine chrDNA-Konzentration von  $795 \text{ } \mu\text{g}$  chrDNA pro  $\text{mg}$  Plasmid verzeichnet. Diese Konzentration konnte durch eine weitere schonendere Verfahrensweise minimiert werden. Bei Verwendung der Flotationssäule konnte die Menge an chrDNA weiter auf  $590 \text{ } \mu\text{g}$  pro  $\text{mg}$  pDNA reduziert werden.

A



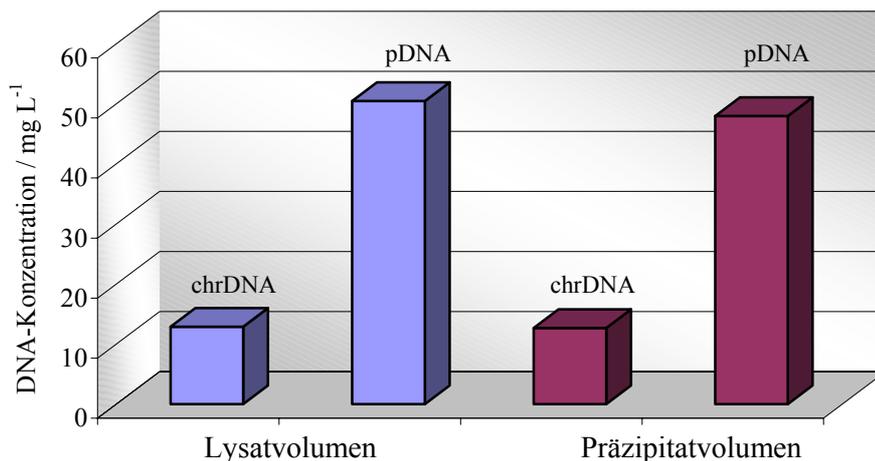
B



**Abbildung 46** Quantitative Analyse der chromosomalen DNA im Lysat unter dem Einfluss verschiedener Scherkräfte während der alkalischen Lyse. A: Konzentration der chromosomalen DNA im Lysat. B: Verhältnis chrDNA / pDNA.

Auch in der Struktur des sich bildenden Lysats sind deutliche Unterschiede zu beobachten. Während sich bei der schonenden, scherkraftarmen Lyse durch eine Flotationssäule ein hochviskoses, zusammenhängendes Präzipitat ausbildete, war das Präzipitat während der scherkraftintensiven Lyse bei hoher Rührgeschwindigkeit im gesamten Lysat

verteilt und bildete eine Vielzahl kleiner Flocken. Die Verwendung der Flotationssäule bietet prozesstechnische Vorteile. Durch die hohe Viskosität des Präzipitats wird bei der Flotationssäule eine definierte Trennung des klaren Lysats und des Präzipitats erreicht. Dieses ermöglichte den direkten Einsatzes des Lysats, während bei den anderen Lyseverfahren eine Zentrifugation des Lysats und anschließende Filtration notwendig waren. Dieses reduziert den apparativen Aufwand der Lyse und birgt zudem eine Zeitersparnis, so dass die Flotationssäule neben einer geringen chrDNA-Konzentration des Lysats weitere prozesstechnisch interessante Eigenschaften zur pDNA-Produktion im größeren Maßstab aufweist. Nachteilig ist, dass sich noch ein relativ großes Flüssigkeitsvolumen im Präzipitat befindet, das Plasmid-DNA enthält. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Plasmidausbeute durch Waschen des Präzipitats, wodurch das Flüssigkeitsvolumen aus dem Präzipitat verdrängt wurde, wesentlich gesteigert werden kann. Hierzu wurde das Präzipitat durch einen 70-Lochaufsatz möglichst scherarm mit 10 mM Tris-Puffer berieselt. Der Puffer wurde anschließend bezüglich der pDNA-Konzentration analysiert. Um eine durch das Waschen ansteigende Verunreinigung mit chrDNA auszuschließen, wurde dieses Verfahren mit plasmidfreier Biomasse wiederholt und mittels Q-PCR quantifiziert. Wie in Abbildung 47 dargestellt, konnte nachgewiesen werden, dass durch das Waschen des Präzipitats eine im Vergleich zur Lyse nahezu identische Plasmid-DNA-Konzentration im Puffer erhalten wurde.



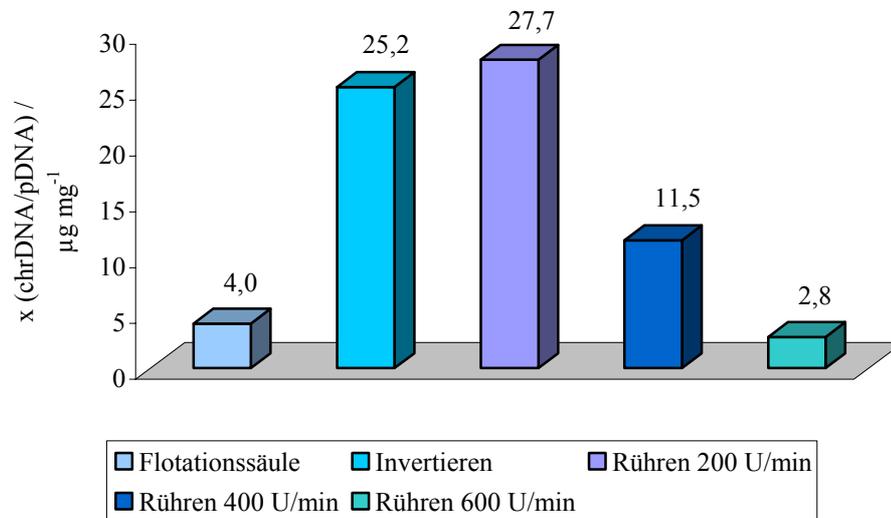
**Abbildung 47** Quantifizierung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA nach alkalischer Lyse mittels Flotationssäule.

Zudem ist durch den Waschschrift keine höhere Konzentration an chrDNA im Vergleich zum Lysat zu verzeichnen. Somit konnte die Plasmidausbeute pro eingesetzter Biomasse erheblich gesteigert werden, ohne eine zusätzliche Erhöhung der chrDNA zu bewirken.

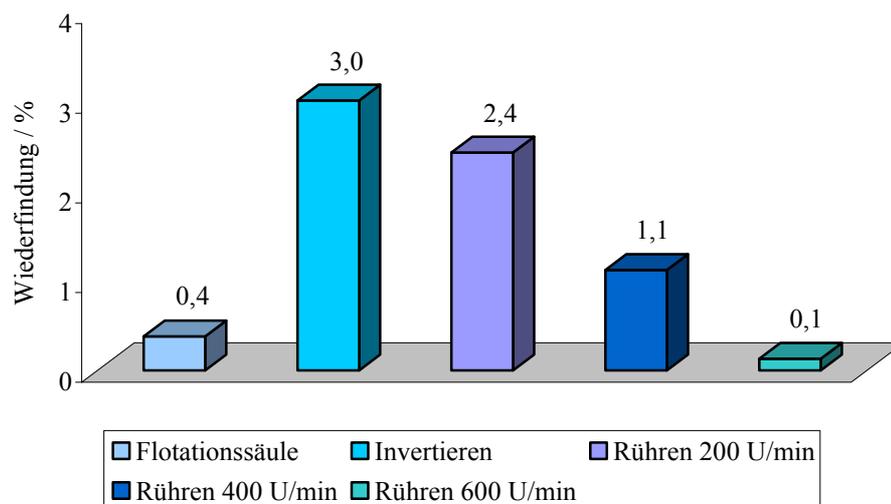
#### ***4.8.1.2 Möglichkeit zur Abreicherung chromosomaler DNA durch Extraktion***

Die unter den verschiedenen Bedingungen hergestellten Lysate wurden mit einer inversemizellaren Phase bestehend aus 40 mM TOMAC und 0,05 % (v/v) 2-Propanol in iso-Octan extrahiert. Anschließend fand eine Rückextraktion in Gegenwart von 1 M NaCl und 10 % (v/v) 2-Propanol in 10 mM Tris-Puffer statt. Bei Annahme einer vollständigen Wiederfindung der Plasmide nach der Extraktion bei einer pDNA-Konzentration von  $25 \text{ mg L}^{-1}$  im unverdünnten Lysat, konnte die Konzentration der chromosomalen DNA auf 2,8-27,7  $\mu\text{g chrDNA pro mg pDNA}$  verringert werden, wie in Abbildung 48A gezeigt ist. Die Ergebnisse zeigen, dass die Effektivität der Extraktion in einem gewissen Maß vom angewendeten Lyseverfahren abhängt. Es ist jedoch festzuhalten, dass sowohl während der scherkraftarmen Lyse mittels Flotationssäule, wie auch der scherkraftintensiven Lyse durch hochfrequentes Rühren die chromosomale DNA erfolgreich abgereichert werden konnte. Mögliche Ursachen der unterschiedlichen Extraktionseffektivität könnten lysebedingte strukturelle Unterschiede der chromosomalen DNA sein. So ist anzunehmen, dass während des intensiven Rührens während der Lyse eine Vielzahl kleiner Fragmente entstehen, die sich aufgrund ihrer Größe ähnlich der RNA verhalten und durch den Extraktionsprozess abgereichert wurden. Diese Argumentation wird jedoch durch die Annahme großer Fragmentgrößen der chrDNA in der Flotationssäule geschwächt. Auch in diesem Fall konnte eine sehr gut Abtrennung der chromosomalen DNA erreicht werden, obwohl aufgrund der schonenden kontinuierlichen Lyse in Kombination mit der Flotation keine vollständige Fragmentierung der chrDNA zu erwarten ist. Es könnte vermutet werden, dass diese großen DNA-Fragmente aufgrund ihrer hohen Molmasse, sterisch nicht zur Extraktion geeignet sind, und es hierdurch zu einer geringen Wiederfindung der chrDNA nach der Rückextraktion kommt.

A



B



**Abbildung 48** Abreicherung der chromosomalen DNA durch den Extraktionsprozess. A: Verhältnis chrDNA / pDNA nach der Rückextraktion. B: Wiederfindung der chromosomalen DNA nach der Rückextraktion.

Eine fehlerhafte Messung der Konzentration der chrDNA im hochfragmentierten Zustand im gerührten Lysat aufgrund von mangelnder Primerbindungsfähigkeit an dem chrDNA-Fragment ist auszuschließen. In diesem Fall müsste eine nahezu vollständige Fragmentierung der gesamten chrDNA erfolgen, um auszuschließen, dass die etwa 100 bp große Detektionssequenz der Pyruvatkinase nicht mehr intakt ist. Um diese Theorie

zu belegen, müssten an dieser Stelle weitere Versuche durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollten die Struktur und Größenverteilung der chromosomalen DNA näher untersucht werden.

Anhand der Daten in Abbildung 48B kann jedoch festgehalten werden, dass mit dem gewählten Extraktionssystem eine erfolgreiche Abreicherung der chrDNA erreicht werden konnte. In den durchgeführten Versuchen wurde mindestens eine Abreicherung von 95 % erzielt. Da auch nach einer scherkraftintensiven Lyse eine sehr gute Abreicherung der chromosomalen DNA erreicht werden konnte, ermöglicht dies neue Ansätze für eine großtechnische Produktion von Plasmiden. Bei der Verwendung eines Extraktionssystems kann auf eine scherkraftarme alkalische Lyse und vorsichtiges Entfernen des Präzipitats verzichtet werden. Dies vereinfacht die Prozessführung im großen Maßstab. Es könnten alternative, skalierbare, industriell interessante, kontinuierliche Prozesse zum Zellaufschluss eingesetzt werden, da eine Methode der effektiven chrDNA-Abreicherung unter Erhalt der gewünschten pDNA vorliegt.

#### **4.8.2 Proteine**

Die Abreicherung der Proteine im Extraktionssystem wurde sowohl im Rahmen einer Extraktion mit diafiltriertem Klarlysat als auch bei Einsatz eines verdünnten Klarlysats für die Hinextraktion untersucht. Die Verwendung von verdünntem Klarlysat hat den Vorteil, dass auf die Diafiltration vor der Extraktion verzichtet werden kann. Jedoch kann durch dieses Verfahren keine vollständige Abreicherung der RNA erreicht werden. Eine Möglichkeit für die weitere Aufarbeitung der Plasmid-DNA nach der Extraktion aus verdünntem Lysat ist in Kapitel 4.9.1 dargestellt.

Für die beiden hier untersuchten Extraktionen wurde eine inversmizellare Phase bestehend aus 40 mM TOMAC und 0,05 % (v/v) 2-Propanol in iso-Octan eingesetzt. Im Falle des diafiltrierten Klarlysates (100 kDa Hydrosart) wurde eine NaCl-Konzentration von 50 mM in der wässrigen Zulaufphase eingestellt. Für die andere Extraktionsvariante wurde das bakterielle Klarlysat lediglich im Verhältnis 1:1 mit 10 mM Tris-Puffer verdünnt und zur Extraktion eingesetzt. Die Rückextraktion war bei beiden Extraktionen identisch. Es wurden 500 mM NaCl und 10 % (v/v) 2-Propanol in 10 mM Tris-Puffer als neue wässrige Phase verwendet. Anschließend wurden die wässrigen Phasen mittels Diafiltration an einer 100 kDa Polyethersulfonmembran weiter aufgearbeitet und an-

konzentriert. Die Ergebnisse bezüglich der Proteinanreicherung beider Aufarbeitungsvarianten sind in Tabelle 12 dargestellt. Durch die Diafiltration an einer 100 kDa Hydrosart-Membran wurde schon vor der Extraktion ein großer Teil der Proteine angereichert. Obwohl der Proteingehalt im verdünnten Klarlysate wesentlich höher war, konnten bei beiden Extraktionsverfahren die Proteine vollständig aus dem Produkt entfernt werden. Während des Extraktionsprozesses verbleibt ein Großteil der Proteine in der wässrigen Raffinatphase der Hinextraktion. Zusätzlich findet eine Präzipitation an der Grenzfläche zwischen wässriger und organischer Phase statt.

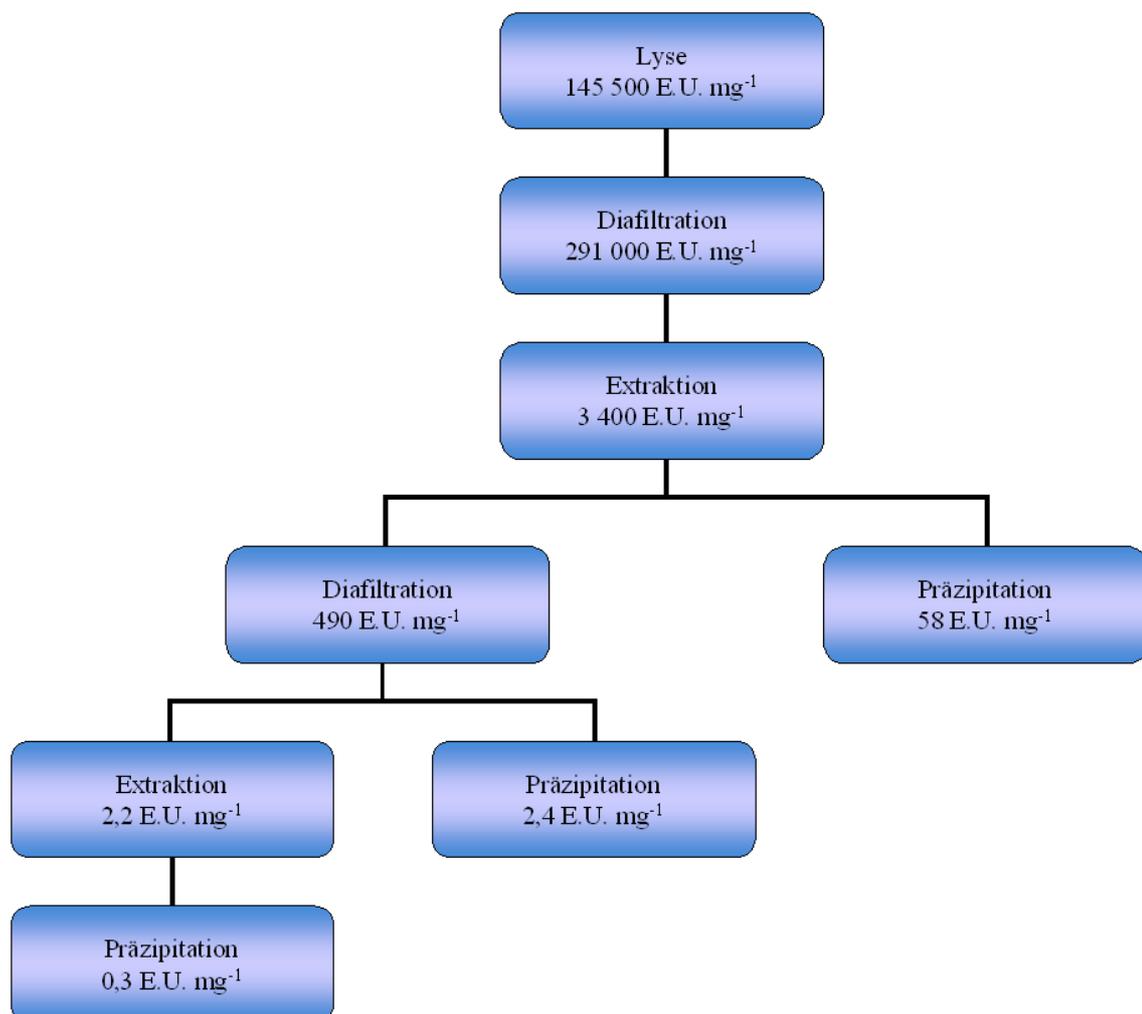
**Tabelle 12** Anreicherung der Proteine während der Extraktion aus diafiltriertem Klarlysate und aus verdünntem Klarlysate.

	Extraktion mit diafiltriertem Klarlysate $x$ (Proteine/pDNA) / $\text{mg g}^{-1}$	Extraktion mit verdünntem Klarlysate $x$ (Proteine/pDNA) / $\text{mg g}^{-1}$
Lysate	15360	15360
wässrige Phase vor Hinextraktion	478	7680
Wässrige Phase nach Rückextraktion	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
Diafiltrat	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar

### 4.8.3 Endotoxine

Die Fähigkeit zur Anreicherung der Endotoxine durch das Extraktionsverfahren wurde mit Hilfe des LAL-Tests analysiert. Um äußere Kontaminationen zu vermeiden, wurden während des Aufarbeitungsprozesses sterile, endotoxinfreie Einmalartikel verwendet. Die für die Extraktion eingesetzten Puffer wurden zuvor durch eine 5 kDa Polyethersulfonmembran filtriert, um Endotoxine abzureichern. Die zur Extraktion eingesetzte organische Phase (40 mM TOMAC, 0,05 % (v/v) 2-Propanol in iso-Octan), sowie das zur Extraktion und Fällung verwendete 2-Propanol wurden als endotoxinfrei angenommen und direkt verwendet. Für die Extraktion wurde ankonzentriertes, diafiltriertes Klarlysate in Gegenwart von 100 mM NaCl eingesetzt. Für die Rückextraktion wurden 1 M NaCl

und 10 % (v/v) 2-Propanol in 10 mM Tris-Puffer verwendet. Durch den Extraktionsprozess konnte eine signifikante Abreicherung der Endotoxine erreicht werden. Die Wiederfindung der Endotoxine nach der Rückextraktion lag bei 1 %. Aufgrund des Ausgangswertes von 291 000 Endotoxineinheiten pro mg Plasmid in der wässrigen Zulaufphase lag jedoch nach der Rückextraktion immer noch ein Endotoxinwert von etwa 3400 E.U.  $\text{mg}^{-1}$  Plasmid vor, der den geforderten Grenzwert von 10 E.U.  $\text{mg}^{-1}$  um ein Vielfaches überschreitet. Um den Endotoxingehalt nach der Extraktion weiter zu reduzieren, gibt es mehrere Möglichkeiten, die in Abbildung 49 zusammengefasst sind.



**Abbildung 49** Verfahrensoptionen für die Abreicherung von Endotoxinen.

Nach der Extraktion kann eine Fällung mit 2-Propanol zur Konzentrierung der Plasmid-DNA und gleichzeitigen Abreicherung der Endotoxine durchgeführt werden. Durch diese Methode konnte die Endotoxinkonzentration auf 58 E.U. pro mg Plasmid redu-

ziert werden. Aufgrund der Möglichkeit zur Ankonzentrierung der Plasmid-DNA bereits während der Rückextraktion, kann das Volumen, das zur Fällung eingesetzt wird, schon vorher deutlich reduziert werden. Daher ist die Präzipitation mit 2-Propanol durchaus eine Option für Konzentrierung und Pufferaustausch für die Plasmid-DNA-Produktion im Milligramm- bis Grammbereich. Der Endotoxingehalt wurde bei dieser Verfahrensvariante zwar deutlich abgereichert, jedoch konnte der geforderte Grenzwert von 10 E.U. pro mg Plasmid nicht eingehalten werden.

Neben der Präzipitation mit 2-Propanol wurden weitere Verfahren zur Minimierung der Endotoxinkonzentration nach der Extraktion untersucht, die auch bei einer Maßstabsvergrößerung durchgeführt werden können. Eine Möglichkeit stellt eine zweite Extraktion dar. Um eine weitere Extraktion im Anschluss an die erste realisieren zu können, mussten sowohl die Salz- als auch die Alkoholkonzentration in der wässrigen Phase nach der ersten Rückextraktion herabgesetzt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Diafiltration an einer 100 kDa Polyethersulfonmembran durchgeführt. Hierbei konnte nicht nur die Umpufferung der Lösung erreicht werden, sondern auch eine weitere Ankonzentrierung der plasmidhaltigen Fraktion. Um während der Diafiltration ein endotoxinfreies Membransystem zur Verfügung zu haben, wurde die Ultrafiltrationsmembran zunächst mit einem Triton-X114-haltigen Tris-Puffer (10 mM Tris, 0,15 % Triton-X114, pH 7,0) gespült. Das nicht-ionische Detergenz fördert die Auflösung der mizellaren Strukturen und Aggregate der Endotoxinmoleküle. Die entstehenden Endotoxinmonomere können aufgrund ihrer geringen Molmasse (ca. 10 kDa) abgereichert werden (Petsch und Anspach, 2000). Während der Diafiltration der plasmidhaltigen Fraktion ist eine weitere Abreicherung der Endotoxine zu verzeichnen. Im Diafiltrat wurde ein Wert von 490 E.U. pro mg pDNA gemessen. Diese Abreicherung beruht auf der Entfernung der Endotoxinmonomere, während höhermolekulare Aggregate in der plasmidhaltigen Lösung verweilen. Somit ist eine theoretische Senkung der LPS-Wiederfindung während einer Diafiltration bei Anwesenheit von Triton-X114 zu erwarten. Aufgrund der negativen Eigenschaften dieses Detergenzes auf das inversmizellare Extraktionssystem wurde von dieser Behandlung abgesehen. Es ist jedoch eine Diafiltration unter Verwendung von Triton-X114 der wässrigen Phasen nach Rückextraktion denkbar. Nach der Diafiltration konnte der geforderte Grenzwert zwar noch nicht erreicht werden, jedoch stellt dieses Verfahren durchaus eine gute Möglichkeit zur Produktion von Plasmid-

DNA dar, die für die Forschung oder präklinische Studien eingesetzt werden könnte. Eine zweite Extraktion im Anschluss an die Diafiltration reduziert wie erwartet den Endotoxingehalt um weitere 99 % auf einen Wert von 2,2 E.U. pro mg pDNA. Eine Alternative zur zweiten Extraktion stellt die Präzipitation des Diafiltrates mit 2-Propanol dar. Hierdurch wurde eine Endotoxinkonzentration von 2,4 E.U. pro mg Plasmid-DNA erreicht. Durch beide Varianten kann also der Grenzwert von 10 E.U.  $\text{mg}^{-1}$  eingehalten werden. Zusätzlich wurde eine Fällung der wässrigen Phase nach der zweiten Rückextraktion durchgeführt, wodurch die Endotoxinkonzentration nochmals auf einen Wert von 0,3 E.U. pro mg Plasmid-DNA gesenkt werden konnte.

Eine weitere Aufarbeitung der wässrigen Phase nach der ersten Extraktion durch Anionenaustauschchromatographie wäre ebenfalls möglich. Diese Verfahrensoption wurde an dieser Stelle jedoch nicht weiter untersucht. Eine effektive Abreicherung der Endotoxine mit dieser Methode wurde bereits von Lemmens *et al.* (2002) beschrieben.

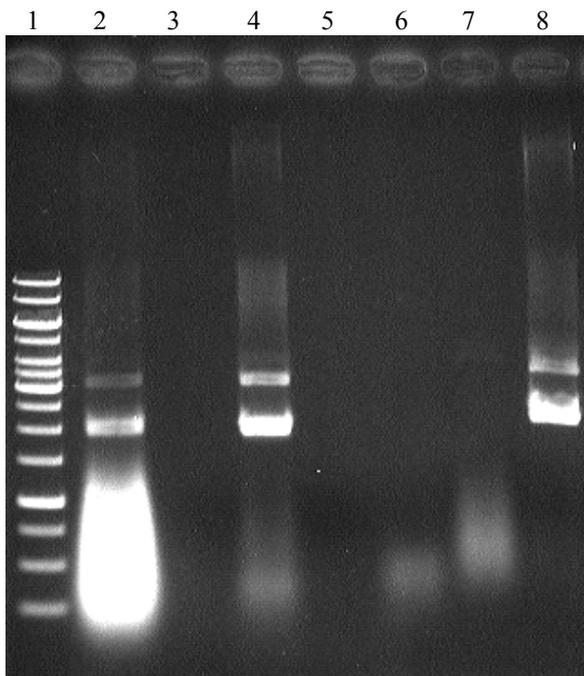
#### ***4.9 Integration des Extraktionsverfahrens in verschiedene Aufarbeitungsprozesse***

Neben den bereits beschriebenen Verfahren besteht ebenfalls die Möglichkeit anstelle eines diafiltrierten Klarlysats lediglich ein verdünntes Klarlysat einzusetzen. Eine weitere Prozessoption besteht in der Verwendung von Ammoniumsulfat für die Rückextraktion, wodurch eine chromatographische Aufarbeitung zur selektiven Plasmidformtrennung angeschlossen werden kann. Beide Verfahrensoptionen werden im folgenden beschrieben.

##### ***4.9.1 Extraktion aus verdünntem Klarlysats mit anschließender Aufarbeitung mittels Anionenaustauschchromatographie***

Die erfolgreiche Extraktion mit diafiltriertem Klarlysats wurde bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben. Als Alternative hierzu ist auch die Extraktion aus verdünntem bakteriellen Klarlysats möglich, wenn vor der Extraktion auf eine Diafiltration verzichtet werden soll. Um die hohe Acetatkonzentration und den Einfluss von oberflächenaktiven Substanzen zu verringern, wurde das Lysats mit dem gleichen Volumen Wasser oder Tris-Puffer verdünnt und dann zur Extraktion eingesetzt. Abbildung 50

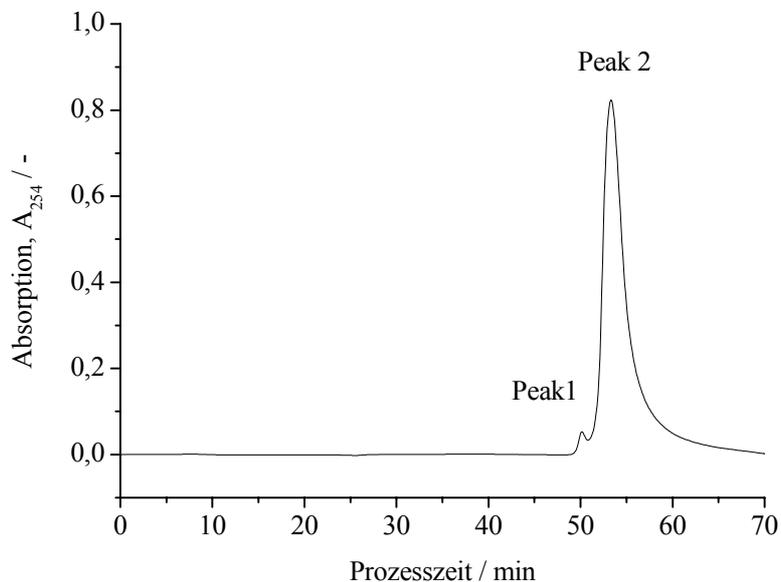
zeigt die mittels Agarosegelelektrophorese analysierten wässrigen Phasen während des Aufarbeitungsprozesses. Nach der Rückextraktion in eine neue wässrige Phase konnte die RNA nicht vollständig abgetrennt werden (Spur 4, Abbildung 50). Die RNA-Kontamination ist jedoch nur noch minimal und kann gut durch eine anschließende Anionenaustauschchromatographie entfernt werden. In den Spuren 6-8 sind die eluierten Fraktionen aufgetragen. Neben der Abreicherung der RNA ist mit dieser Prozessalternative ebenfalls die vollständige Abtrennung von Proteinen möglich, wie schon in Kapitel 4.8.2 dargestellt wurde. Zwar wurde dieses Verfahren nicht auf die Möglichkeit der Endotoxinanreicherung hin untersucht, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Endotoxinkonzentration durch die Chromatographie deutlich herabgesetzt wird. Um den chromatographischen Schritt zusätzlich zu verbessern, kann dem Chromatographiepuffer Triton-X114 zugefügt werden. Dies führt zur Zerstörung der Endotoxinaggregate, die dann durch Waschen der Säule entfernt werden können.



**Abbildung 50** Analyse einer Extraktion aus verdünntem Klarlysat mit anschließender Aufarbeitung mittels Anionenaustauschchromatographie. Spur 1: DNA 1 kb Marker, Spur 2: verdünntes Klarlysat, Spur 3: wässrige Raffinatphase nach der Hinextraktion, Spur 4: wässrige Extraktphase der Rückextraktion, Spur 5: Durchlauf Fractogel DEAE, Spur 6, 7: Elution der RNA, Spur 8: Elution der Plasmid-DNA (Streitner *et al.*, 2008).

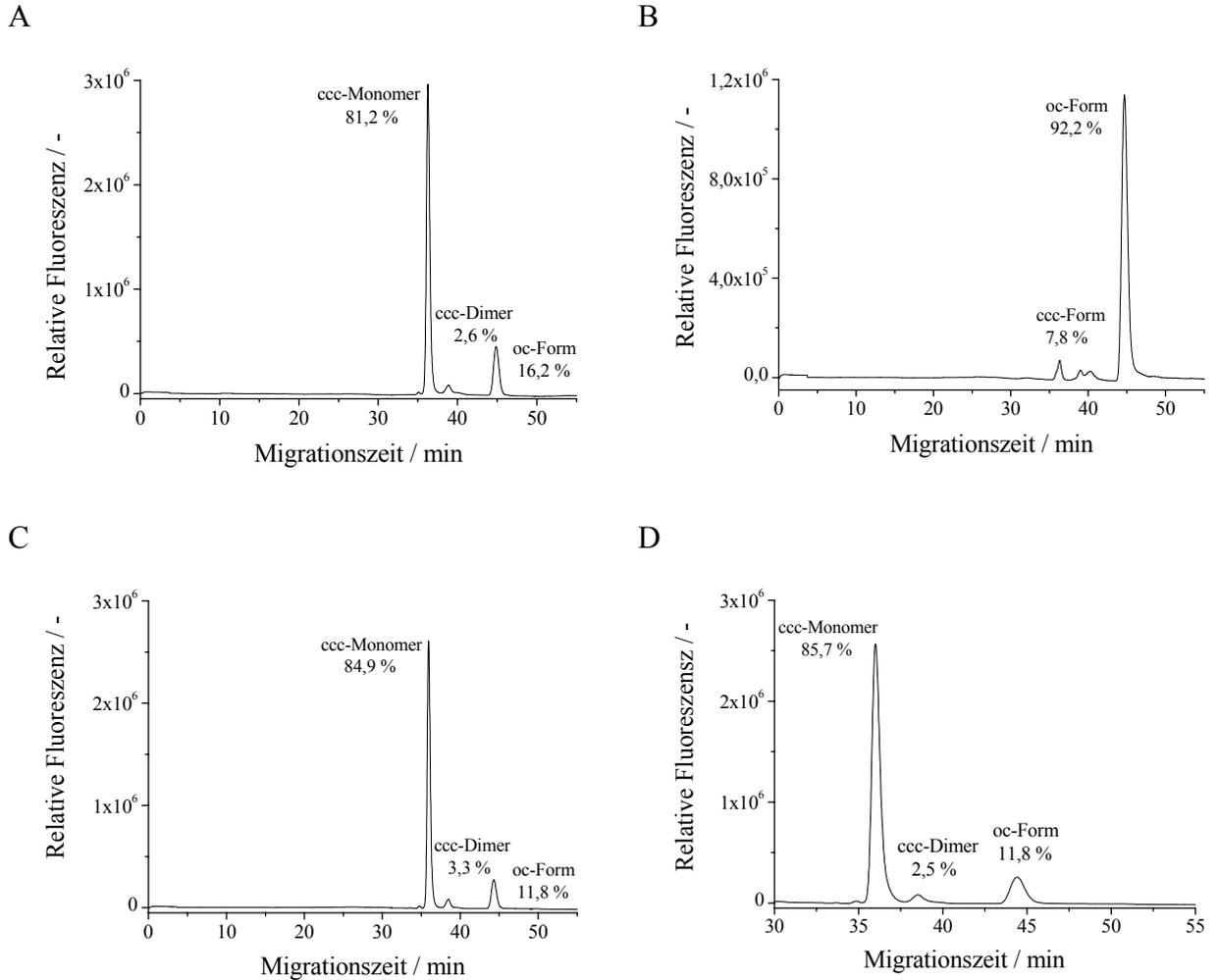
#### 4.9.2 Rückextraktion mit Ammoniumsulfat und anschließende Aufarbeitung mit Plasmid Select

In Kapitel 4.5 wurde gezeigt, dass es während des Extraktionsprozesses durchaus möglich ist eine Anreicherung der ccc-Form der Plasmid-DNA zu erreichen. Bei der Extraktion mit bereits aufgearbeiteten Modellsubstanzen war ein genügend großer Bereich für die selektive Extraktion der Plasmidformen gegeben. Im Fall von Extraktionen aus Lysozym stellte sich dies jedoch aufgrund des schmalen Konzentrationsbereichs, in dem die Möglichkeit der oc-Form-Abtrennung besteht, als schwierig heraus. Daher wird hier eine Prozessalternative dargestellt. Bei der Rückextraktion der Plasmid-DNA aus der organischen Phase wurde statt des NaCl-Puffers 2,5 M Ammoniumsulfatpuffer verwendet. Diese Phase wurde anschließend für eine chromatographische Aufarbeitung mit Plasmid Select (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) eingesetzt. Es wurde eine hohe Salzkonzentration gewählt, um sowohl ccc-Form als auch oc-Form an der Säule zu binden, da eine selektive Bindung der ccc-Form nur durch Einstellung einer bestimmten Ionenstärke realisiert werden kann. Anschließend wurde über 11 Säulenvolumina gegen Wasser eluiert und dadurch eine getrennte Elution der Plasmidformen erreicht. In Abbildung 51 wird die Abtrennung der oc-Form (Peak 1) während der Elution gezeigt.



**Abbildung 51** Chromatographische Aufarbeitung einer Extraktphase mit 2,5 M Ammoniumsulfat mittels Plasmid Select. Zur Elution wurde ein linearer Gradient über 11 Säulenvolumina gegen Wasser verwendet.

Die Analyse mittels Kapillargelelektrophorese zeigt die Abreicherung der oc-Form während des Aufarbeitungsprozesses. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 A-D dargestellt.



**Abbildung 52** CGE Analyse der wässrigen Extraktphase nach Rückextraktion (A) und der Elutionssignale bei der Aufarbeitung mit Plasmid Select. Abbildung B zeigt das Elektropherogramm des ersten Elutionssignals. Die Untersuchung des zweiten Elutionssignals ist in Abbildung C dargestellt. Abbildung D zeigt das Elektropherogramm des bei einer anschließenden Aufarbeitung mit Fractogel DEAE erhaltenen Eluats.

Es konnte zwar eine Anreicherung der ccc-Form erreicht werden, allerdings werden dennoch nicht die Qualitätsanforderungen bezüglich der Plasmidformenverteilung erfüllt. Eine Verbesserung ist möglich, indem von vornherein Ausgangsmaterial mit einem höheren Anteil an ccc-Form eingesetzt wird, oder indem die chromatographische Aufarbeitung mit Plasmid Select verbessert wird. Das hier dargestellte Verfahren basiert

auf dem von Lemmens *et al.* (2003) beschriebenen Verfahren zur Aufarbeitung von Plasmid-DNA. Der sehr zeitaufwändige Schritt der Gelfiltration zur Trennung von Plasmid-DNA und RNA wurde durch die inversmizellare Extraktion ersetzt, wodurch zusätzlich das Volumen reduziert werden konnte.

#### ***4.10 Beurteilung des Extraktionsprozesses hinsichtlich der Qualitätsanforderungen für die Produktion von Plasmid-DNA***

Durch die Extraktion in einem inversmizellaren Zweiphasensystem ist es möglich sowohl RNA als auch chromosomale DNA und Proteine unterhalb der geforderten Grenzwerte abzureichern. Lediglich die Endotoxinkonzentration liegt oberhalb des Grenzwertes. Eine weitere Abtrennung ist jedoch durch die in Kapitel 4.8.3 beschriebenen Verfahren möglich. Die Abreicherung der im Lysat vorhandenen Verunreinigungen durch den Extraktionsprozess ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13** Abreicherung von unerwünschten Komponenten während des Extraktionsprozesses.

	$X_{(\text{Protein/pDNA})} / \text{mg g}^{-1}$	$X_{(\text{LPS/pDNA})} / \text{E.U. mg}^{-1}$	$X_{(\text{chrDNA/pDNA})} / \text{mg g}^{-1}$
Lysat	15 360	145 500	590
Wässrige Zulaufphase	478	291 000	469
Wässrige Extraktphase	nicht nachweisbar	3 400	4

#### ***Tensidnachweis***

Die Tensidkonzentration in der wässrigen Phase nach der Rückextraktion wurde durch ein Titrationsverfahren bestimmt. Die nachgewiesene Menge war mit  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  sehr gering. Für die Herstellung von pharmazeutisch einsetzbarer Plasmid-DNA sollte jedoch TOMAC vollständig abgereichert werden. Durch eine an den Extraktionsprozess angeschlossene Diafiltration wurde eine vollständige Entfernung des Tensids erzielt.

Eine Fällung mit 2-Propanol nach der Rückextraktion sollte ebenfalls zur Abreicherung des Tensids führen.

#### ***4.11 Extraktion im 4 L-Maßstab***

Nachdem ein geeignetes Extraktionssystem für die Aufarbeitung von Plasmid-DNA gefunden wurde, konnte die Extraktion in einem größeren Maßstab unter Verwendung einer 5 L-Schottflasche durchgeführt werden. Hierfür wurden 2 L diafiltriertes Klarlysat in Gegenwart von 50 mM NaCl mit 2 L inversmizellarer Phase bestehend aus 40 mM TOMAC und 0,05 % (v/v) 2-Propanol in iso-Octan extrahiert. Die meisten der vorangegangenen Extraktionen zur Untersuchung der Einflussgrößen wurden mit 400 µL wässriger und inversmizellarer Phase durchgeführt. Somit wurde eine Vergrößerung des Maßstabs um den Faktor 5000 erreicht. Die Rückextraktion fand in Gegenwart von 0,5 M NaCl und 10 % (v/v) 2-Propanol in 10 mM Tris-Puffer statt. Das Phasenverhältnis von wässriger Phase zu inversmizellarer Phase bei der Rückextraktion betrug 1:4. Auch hier wurde eine komplette Wiederfindung der Plasmid-DNA nachgewiesen, während Proteine, RNA und chromosomale DNA abgereichert wurden. Die Daten sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die Wiederfindung der Plasmid-DNA in der wässrigen Extraktphase nach der Rückextraktion betrug 103 %. Dieser Wert ist auf das Verteilungsverhalten des Alkohols zwischen der wässrigen Extraktphase und der inversmizellaren Phase zurückzuführen, da für die Berechnung davon ausgegangen wurde, dass sich der gesamte Alkohol in der wässrigen Phase befindet. Da sich ein kleiner Anteil des Alkohols jedoch in der inversmizellaren Phase befindet relativiert sich dieser Wert. Die Entfernung von Endotoxinen wurde in diesem Maßstab nicht betrachtet. Aufgrund der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass sich das Extraktionsverhalten in Abhängigkeit des Maßstabes nicht verändert. Somit ist eine Maßstabsvergrößerung des extraktiven Aufarbeitungsprozesses von Plasmid-DNA problemlos möglich.

**Tabelle 14** Daten der Extraktion im 4 L-Maßstab.

	pDNA / mg L <sup>-1</sup>	X <sub>(Protein/pDNA)</sub> / mg g <sup>-1</sup>	RNA
Wässrige Zulaufphase	43,2	490	n.a.
Wässrige Extraktphase	177,6	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar

Für den Extraktionsprozess können verschiedene Extraktoren eingesetzt werden. Hierzu gehören Mischer-Scheider, Zentrifugalextraktoren und Membranextraktoren. Für die inversmizellare Extraktion sind Mischer-Scheider und Zentrifugalextraktoren am besten geeignet (Cabral und Aires-Barros, 1993). Kommt es bei der Extraktion zu einer Emulsionsbildung, die durch das Tensid stabilisiert wird, sollten Zentrifugalextraktoren verwendet werden, um die Zeit für die Trennung der Phasen zu verkürzen. Für die Extraktion von Proteinen wurden außerdem Systeme mit inversmizellaren Flüssigmembranen beschrieben, die sowohl Hin- als auch Rückextraktion unter Verwendung eines Membranmoduls ermöglichen (Luisi *et al.*, 1979). Cardoso *et al.* (1999) beschreiben die Extraktion von Phenylalanin mit Hilfe von Hohlfasermodulen und mittels einer Diffusionszelle (Cardoso *et al.*, 2000). Die Wahl des Extraktors hängt von der jeweiligen Anwendung ab. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Verwendung von Membranextraktoren oder Hohlfasermodulen zu einer langsameren Einstellung des Extraktionsgleichgewichts führt und somit mit längeren Prozesszeiten zu rechnen wäre. Für die Aufarbeitung von Plasmid-DNA im Grammbereich mit dem hier beschriebenen Extraktionssystem ist sicherlich ein Zentrifugalextraktor einsetzbar. Mischer-Scheider können ebenfalls verwendet werden. Ist die Phasentrennung jedoch nicht vollständig, könnte sich noch RNA im Produkt befinden. In diesem Fall wäre eine weitere chromatographische Aufarbeitung oder zweite Extraktion möglich.

Unter ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten ist die Wiederverwendung der organischen Phase für den Extraktionsprozess wünschenswert. Um iso-Octan von dem verwendeten Alkohol und TOMAC zu trennen, kann eine Destillation durchgeführt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte von iso-Octan und den eingesetz-

ten Alkoholen ist eine Trennung möglich. Lediglich die Abtrennung von 1-Propanol ist wegen des geringen Temperaturunterschieds nicht möglich. Eine Übersicht über die verschiedenen Siedepunkte ist in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 15** Siedepunkte von iso-Octan und verschiedenen Alkoholen.

<i>Komponente</i>	<i>Siedepunkt / °C</i>
iso-Octan	99,0
Ethanol	78,4
1-Propanol	97,2
2-Propanol	82,3
1-Butanol	117,7
Isobutylalkohol	107,9
1-Pentanol	128,0
1-Hexanol	157,1
2-Ethylhexanol	182,0
1-Heptanol	176,2
2-Octanol	178,5
1-Nonanol	206,0
1-Decanol	228,0

Eine weitere Möglichkeit zur Rückgewinnung von iso-Octan bietet die Adsorption eines Tensidkomplexes an Montmorillonit. Dieses Verfahren wurde von Jarudilokkul *et al.* (1999) beschrieben. Hierbei kann AOT als anionisches Tensid zugegeben werden und bildet mit TOMAC einen Komplex im Verhältnis 1:1 im organischen Lösungsmittel. Dieser hydrophobe Komplex kann durch Adsorption an Montmorillonit entfernt werden, und das Lösungsmittel kann somit wiederverwendet werden. Im Fall des hier verwendeten Extraktionssystems für Plasmid-DNA müsste jedoch zusätzlich der für die Rückextraktion zugegebene Alkohol entfernt werden, um eine effektive Hinextraktion zu ermöglichen.

#### ***4.12 Vergleich von Extraktionssystemen zur Aufreinigung von Plasmid-DNA***

Wird die Extraktion mittels eines inversmizellaren Zweiphasensystems mit anderen Extraktionssystemen verglichen wie in Tabelle 16 dargestellt, so wird deutlich, dass das System bezüglich der Wiederfindung der Plasmid-DNA den anderen Systemen überlegen ist. Die RNA wird vollständig entfernt und kann auch bei der Auftragung großer pDNA-Mengen im Agarosegel nicht mehr nachgewiesen werden. Eine komplette Abreicherung der Proteine wurde neben der inversmizellaren Extraktion nur mit einem PEG-600/Phosphat-System (Tabelle 16) erzielt. Jedoch sind in der Literatur nicht die Werte aller Qualitätsparameter angegeben. Bezüglich der chromosomalen DNA geben Ribero *et al.* einen ähnlich guten Wert wie bei der Abreicherung mit dem TOMAC/iso-Octan/Wasser-System an. Für die Abreicherung der Endotoxine wird lediglich ein Wert von Trindade *et al.* (2005) angegeben, der sich im gleichen Größenbereich wie der mit inversmizellarer Extraktion erreichte Wert bewegt.

**Tabelle 16 Vergleich von Extraktionsprozessen.**

Extraktionssystem	Wiederfindung der Plasmid-DNA / %	RNA-Abreicherung / %	x(Protein/pDNA) / mg g <sup>-1</sup>	x(chrDNA/pDNA) / mg g <sup>-1</sup>	x(LPS/pDNA) / E.U. mg <sup>-1</sup>	Referenz
PEG-600/Phosphat	42	100	n.d.	5 <sup>3</sup>	n.a.	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2002)
PEG-600/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	75	100	395	n.a.	3 646 (n.d. <sup>4</sup> )	(Trindade <i>et al.</i> , 2005)
PEG-800/Phosphat	60 – 75	89	n.a.	n.a.	n.a.	(Frerix <i>et al.</i> , 2005)
EO <sub>50</sub> PO <sub>50</sub> /dextran	n.a.	80	6 522	n.a.	n.a.	(Kepka <i>et al.</i> , 2004b)
TOMAC/iso-Octan/H <sub>2</sub> O	100	100	n.d.	4,0	3 400 (2.4 <sup>5</sup> )	diese Studie

<sup>3</sup> Wert durch Southern Blot ermittelt

<sup>4</sup> Nach Aufarbeitung durch HIC

<sup>5</sup> Nach Diafiltration und Fällung mit 2-Propanol

## ***5 Zusammenfassung und Ausblick***

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss verschiedener Salze und Salzkonzentrationen auf das Extraktionssystem bestehend aus TOMAC, iso-Octan und Wasser untersucht. Hierzu wurden Modellsubstanzen in Form von aufgereinigter Plasmid-DNA und RNA eingesetzt und das Verteilungsverhalten der Nukleinsäuren betrachtet. Durch Erhöhung der Salzkonzentration wurden die Wechselwirkungen zwischen den Tensidkopfgruppen abgeschwächt, wodurch die Größe der inversen Mizellen verringert wurde. Zusätzlich wurde die Anziehung zwischen dem Tensid und dem Zielmolekül abgeschwächt. Durch die Variation der Salzkonzentration konnte schon bei der Hinextraktion eine Trennung von Plasmid-DNA und RNA erreicht werden. Darüber hinaus konnte bei bestimmten Salzkonzentrationen eine Abreicherung der oc-Form durch selektive Extraktion von ccc-Form und RNA aus der wässrigen Phase erzielt werden.

Neben dem Salz hat die Verwendung unterschiedlicher Alkohole und Alkoholkonzentrationen im Extraktionssystem einen wesentlichen Einfluss. Mit steigender Alkoholkonzentration verschiebt sich der Extraktionspunkt bei der Hinextraktion zu geringeren Ionenstärken. Dies deutet auf eine Verringerung der Mizellgröße mit steigender Alkoholkonzentration hin.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte RNA mittels eines zweistufigen Extraktionsprozesses bestehend aus einer Hinextraktion in die inversmizellare Phase und Rückextraktion in eine neue wässrige Phase aus einem diafiltrierten bakteriellen Klarlysat entfernt werden, während eine vollständige Wiederfindung der Plasmid-DNA erzielt werden konnte. In diesem Rahmen spielen die bei der Hinextraktion verwendeten Salz- und Alkoholkonzentrationen als auch die Alkoholstruktur eine wichtige Rolle bezüglich der RNA-Abreicherung während des Extraktionsprozesses. Hierbei wirkte sich der Einsatz geringer Konzentrationen kurzkettiger, nicht verzweigter Alkohole in Gegenwart niedriger Salzkonzentrationen positiv auf die Abtrennung der RNA aus. Durch Steigerung der Alkoholkonzentration bei der Rückextraktion konnte schließlich eine vollständige Wiederfindung der Plasmid-DNA nach der Rückextraktion erzielt werden.

Ferner wurde die Abreicherung anderer Verunreinigungen durch die inversmizellare Extraktion betrachtet. Proteine konnten sowohl bei Verwendung von diafiltriertem Klar-

lysat als auch verdünntem Klarlysat erfolgreich aus dem Produktstrom entfernt werden. Bezüglich der chromosomalen DNA wurde zunächst der Einfluss unterschiedlicher Scherkräfte während des Zellaufschlusses auf die Konzentration im Lysat untersucht. Anschließend konnten auch große Mengen chromosomaler DNA resultierend aus einer scherkraftintensiven Lyse hervorragend abgetrennt werden. Lediglich bezüglich der Endotoxine konnte der geforderte Grenzwert nach der Rückextraktion nicht eingehalten werden. Zur weiteren Abreicherung ist eine zweite Extraktion oder zusätzliche Aufarbeitung durch chromatographische oder membrangebundene Verfahren notwendig.

Die inversmizellare Extraktion mit einem TOMAC/iso-Octan-System ermöglicht somit eine effiziente und gut skalierbare Aufarbeitung von Plasmid-DNA aus bakteriellem Klarlysat. Im Vergleich zu anderen Extraktionssystemen ist das inversmizellare Zweiphasensystem im Hinblick auf die Einhaltung der Qualitätskriterien mindestens gleich effizient oder überlegen. Ein weiterer Vorteil beispielsweise gegenüber chromatographischen Verfahren liegt in der kurzen Prozesszeit. Für eine vollständige Verteilung der Biomoleküle im Extraktionssystem sind nur wenige Minuten erforderlich. Zusätzlich bietet der Prozess die Möglichkeit einer starken Ankonzentrierung des Produkts.

Weitere Untersuchungen bezüglich der strukturellen Eigenschaften inverser Mizellen und Parametern die diese Strukturen im Rahmen des Extraktionsprozesses beeinflussen sind von besonderem Interesse. Eine genaue Betrachtung des Verteilungsverhaltens von Biomolekülen in inversmizellaren Systemen in Verbindung mit Strukturanalysen ermöglicht eine selektive Steuerung des Aufarbeitungsprozesses. Weiterführende Analysen sind sowohl für die Verbesserung bestehender Extraktionsprozesse als auch für die Übertragung auf weitere interessante Produkte und andere Tensidsysteme von Bedeutung.

---

## 6 Literatur

- Albertsson, P. A., 1956. Chromatography and Partition of Cells and Cell Fragments. *Acta Chem Scand* **10**: 148-148.
- Albertsson, P. A., 1958a. Particle Fractionation in Liquid 2-Phase Systems - the Composition of Some Phase Systems and the Behaviour of Some Model Particles in Them Application to the Isolation of Cell Walls from Microorganisms. *Biochim Biophys Acta* **27**: 378-395.
- Albertsson, P. A., 1958b. Partition of Proteins in Liquid Polymer-Polymer 2-Phase Systems. *Nature* **182**: 709-711.
- Albertsson, P. A., 1965. Partition Studies on Nucleic Acids. I. Influence of Electrolytes, Polymer Concentration and Nucleic Acid Conformation of the Partition in the Dextran-Polyethylene Glycol System. *Biochim Biophys Acta* **103**: 1-12.
- Albertsson, P. A. und Nyns, E. J., 1959. Counter-Current Distribution of Proteins in Aqueous Polymer Phase Systems. *Nature* **184**: 1465-1468.
- Arvidsson, P., Plieva, F. M., Savina, I. N., Lozinsky, V. I., Fexby, S., Bulow, L., Galaev, I. Y. und Mattiasson, B., 2002. Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *J Chromatogr A* **977**: 27-38.
- Balan, S., Murphy, J., Galaev, I., Kumar, A., Fox, G. E., Mattiasson, B. und Willson, R. C., 2003. Metal chelate affinity precipitation of RNA and purification of plasmid DNA. *Biotechnol Lett* **25**: 1111-6.
- Birnboim, H. C. und Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-23.
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y. W., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A. und Anderson, W. F., 1995. T-Lymphocyte-Directed Gene-Therapy for Ada(-) Scid - Initial Trial Results after 4 Years. *Science* **270**: 475-480.

- 
- Branovic, K., Forcic, D., Ivancic, J., Strancar, A., Barut, M., Kosutic Gulija, T., Zgorelec, R. und Mazuran, R., 2004. Application of short monolithic columns for fast purification of plasmid DNA. *J Chromatogr B* **801**: 331-7.
- Briggs, J. und Panfili, P. R., 1991. Quantitation of DNA and Protein Impurities in Biopharmaceuticals. *Anal Chem* **63**: 850-859.
- Budker, V. G., Slattum, P. M., Monahan, S. D. und Wolff, J. A., 2002. Entrapment and condensation of DNA in neutral reverse micelles. *Biophys J* **82**: 1570-9.
- Cabral, J. M. S. und Aires-Barros, M. R., 1993. Reverse Micelles in Liquid-Liquid Extraction. In: J. F. Kennedy und M. S. Cabral, Recovery Processes for Biological Materials, Wiley, Chichester.
- Cardoso, M. M., Viegas, R. M. C. und Crespo, J. P. S. G., 1999. Extraction and re-extraction of phenylalanine by cationic reversed micelles in hollow fibre contactors. *J Membrane Sci* **156**: 303-319.
- Cardoso, M. M., Viegas, R. M. C. und Crespo, J. P. S. G., 2000. Kinetics of phenylalanine extraction and reextraction by cationic reversed micelles using a diffusion cell. *Chem Eng Sci* **55**: 2835-2847.
- Carlson, A. und Nagarajan, R., 1992. Release and recovery of porcine pepsin and bovine chymosin from reverse micelles: a new technique based on isopropyl alcohol addition. *Biotechnol Prog* **8**: 85-90.
- Carnes, A. E., Hodgson, C. P. und Williams, J. A., 2006. Inducible *Escherichia coli* fermentation for increased plasmid DNA production. *Biotechnol Appl Biochem* **45**: 155-66.
- Check, E., 2002. A tragic setback. *Nature* **420**: 116-8.
- Chen, W. C. und Huang, L., 2005. Non-viral vector as vaccine carrier. *Adv Genet* **54**: 315-37.
- Chmiel, H., 2006. Bioprozesstechnik. Spektrum Akad. Verl., München.
- Clemson, M. und Kelly, W. J., 2003. Optimizing alkaline lysis for DNA plasmid recovery. *Biotechnol Appl Biochem* **37**: 235-44.

- 
- Cole, K. D., 1991. Purification of Plasmid and High Molecular Mass DNA Using Peg-Salt 2-Phase Extraction. *Biotechniques* **11**: 18-&.
- Colote, S., Ferraz, C. und Liautard, J. P., 1986. Analysis and Purification of Plasmid DNA by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography. *Anal Biochem* **154**: 15-20.
- Colpan, M. und Riesner, D., 1984. High-Performance Liquid-Chromatography of High-Molecular-Weight Nucleic-Acids on the Macroporous Ion-Exchanger, Nucleogen. *J Chromatogr* **296**: 339-353.
- Cooke, G. D., Cranenburgh, R. M., Hanak, J. A. J., Dunnill, P., Thatcher, D. R. und Ward, J. M., 2001. Purification of essentially RNA free plasmid DNA using a modified *Escherichia coli* host strain expressing ribonuclease A. *J Biotechnol* **85**: 297-304.
- Costa, S. M., Freire, M. S. und Alves, A. M. B., 2006. DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine* **24**: 4562-4564.
- Costioli, M. D., Fisch, I., Garret-Flaudy, F., Hilbrig, F. und Freitag, R., 2003. DNA purification by triple-helix affinity precipitation. *Biotechnol Bioeng* **81**: 535-45.
- Dainiak, M. B., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Hatti-Kaul, R. und Mattiasson, B., 2005. Cell chromatography: separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous monolithic columns. *Biotechnol Prog* **21**: 644-9.
- Dekker, M., Van't Riet, K., Baltussen, J. W. A., Bijsterbosch, B. H., Laane, C. und Hilhorst, R., 1987. *Biocatalysis in Organic Media*. Elsevier, Amsterdam.
- Dekker, M., Vantriet, K., Vanderpol, J. J., Baltussen, J. W. A., Hilhorst, R. und Bijsterbosch, B. H., 1991. Effect of Temperature on the Reversed Micellar Extraction of Enzymes. *Chem Eng J Bioch Eng* **46**: B69-B74.
- Dekker, M., Vantriet, K., Weijers, S. R., Baltussen, J. W. A., Laane, C. und Bijsterbosch, B. H., 1986. Enzyme Recovery by Liquid-Liquid-Extraction Using Reversed Micelles. *Chem Eng J Bioch Eng* **33**: B27-B33.

- Diogo, M. M., Queiroz, J. A. und Prazeres, D. M., 2001a. Studies on the retention of plasmid DNA and *Escherichia coli* nucleic acids by hydrophobic interaction chromatography. *Bioseparation* **10**: 211-20.
- Diogo, M. M., Queiroz, J. A. und Prazeres, D. M., 2005. Chromatography of plasmid DNA. *J Chromatogr A* **1069**: 3-22.
- Diogo, M. M., Ribeiro, S. C., Queiroz, J. A., Monteiro, G. A., Tordo, N., Perrin, P. und Prazeres, D. M., 2001b. Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. *J Gene Med* **3**: 577-84.
- Duenas-Carrera, S., Vina, A., Martinez, R., Alvarez-Lajonchere, L., Alvarez-Obregon, J. C., Marante, J., Perez, A., Mosqueda, O., Martinez, G. und Morales, J., 2004. Immunization with a DNA vaccine encoding the hepatitis-C-virus structural antigens elicits a specific immune response against the capsid and envelope proteins in rabbits and *Macaca irus* (crab-eating macaque monkeys). *Biotechnol Appl Biochem* **39**: 249-55.
- Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J. und Edelstein, R. M., 2004. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004 - an overview. *J Gene Med* **6**: 597-602.
- EMEA, 2001. Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products. *CPMP/410/01 rev 1, London*
- Eon-Duval, A. und Burke, G., 2004. Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *J Chromatogr B* **804**: 327-35.
- Eon-Duval, A., Gumbs, K. und Ellett, C., 2003a. Precipitation of RNA impurities with high salt in a plasmid DNA purification process: use of experimental design to determine reaction conditions. *Biotechnol Bioeng* **83**: 544-53.
- Eon-Duval, A., MacDuff, R. H., Fisher, C. A., Harris, M. J. und Brook, C., 2003b. Removal of RNA impurities by tangential flow filtration in an RNase-free plasmid DNA purification process. *Anal Biochem* **316**: 66-73.
- Erbacher, P., Bettinger, T., Brion, E., Coll, J. L., Plank, C., Behr, J. P. und Remy, J. S., 2004. Genuine DNA/polyethylenimine (PEI) complexes improve transfection properties and cell survival. *J Drug Target* **12**: 223-236.

- Ferreira, G. N., Cabral, J. M. und Prazeres, D. M., 1998. Purification of supercoiled plasmid DNA using chromatographic processes. *J Mol Recognit* **11**: 250-1.
- Ferreira, G. N., Cabral, J. M. und Prazeres, D. M., 1999. Development of process flow sheets for the purification of supercoiled plasmids for gene therapy applications. *Biotechnol Prog* **15**: 725-31.
- Ferreira, G. N., Cabral, J. M. und Prazeres, D. M., 2000. Studies on the batch adsorption of plasmid DNA onto anion-exchange chromatographic supports. *Biotechnol Prog* **16**: 416-24.
- Ferreira, G. N. M., Prazeres, D. M. F. und Cabral, J. M. S., 2001. Plasmid Manufacturing - An Overview. In: M. Schlee, Plasmids for Therapy and Vaccination, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Frerix, A., Geilenkirchen, P., Muller, M., Kula, M. R. und Hubbuch, J., 2007. Separation of genomic DNA, RNA, and open circular plasmid DNA from supercoiled plasmid DNA by combining denaturation, selective renaturation and aqueous two-phase extraction. *Biotechnol Bioeng* **96**: 57-66.
- Frerix, A., Muller, M., Kula, M. R. und Hubbuch, J., 2005. Scalable recovery of plasmid DNA based on aqueous two-phase separation. *Biotechnol Appl Bioc* **42**: 57-66.
- Ghose, S., Forde, G. M. und Slater, N. K., 2004. Affinity adsorption of plasmid DNA. *Biotechnol Prog* **20**: 841-50.
- Göklen, K. E. und Hatton, T. A., 1985. Protein Extraction Using Reverse Micelles. *Biotechnol Progr* **1**: 69-74.
- Göklen, K. E. und Hatton, T. A., 1987. Liquid-Liquid-Extraction of Low-Molecular-Weight Proteins by Selective Solubilization in Reversed Micelles. *Separ Sci Technol* **22**: 831-841.
- Goto, M., Ishikawa, Y., Ono, T., Nakashio, F. und Hatton, T. A., 1998. Extraction and activity of chymotrypsin using AOT-DOLPA mixed reversed micellar systems. *Biotechnol Prog* **14**: 729-34.
- Goto, M., Momota, A. und Tsutomu, O., 2004. DNA extraction by cationic reverse micelles. *J Chem Eng Jpn* **37**: 662-668.
- Goto, M., Ono, T., Horiuchi, A. und Furusaki, S., 1999. Extraction of DNA by reversed micelles. *J Chem Eng Jpn* **32**: 123-125.

- Gupta, R. B., Han, C. J. und Johnston, K. P., 1994. Recovery of Proteins and Amino-Acids from Reverse Micelles by Dehydration with Molecular-Sieves. *Biotechnol Bioeng* **44**: 830-836.
- Gustavsson, P. E., Lemmens, R., Nyhammar, T., Busson, P. und Larsson, P. O., 2004. Purification of plasmid DNA with a new type of anion-exchange beads having a non-charged surface. *J Chromatogr A* **1038**: 131-140.
- Häring, G., Luisi, P. L. und Meussdoerffer, F., 1985. Solubilization of bacterial cells in organic solvents via reverse micelles. *Biochem Biophys Res Commun* **127**: 911-915.
- Hasche, A. und Voß, C., 2005. Immobilisation of a repressor protein for binding of plasmid DNA. *J Chromatogr A* **1080**: 76-82.
- Hatton, T. A., 1989. Reversed Micellar Extraction of Proteins. In: J. F. Scamehorn und J. H. Harwell, Surfactant-based Separation Processes, Marcel Dekker Inc., New York.
- Hebel, H., Attra, H., Khan, A. und Draghia-Akli, R., 2006. Successful parallel development and integration of a plasmid-based biologic, container/closure system and electrokinetic delivery device. *Vaccine* **24**: 4607-14.
- Hentsch, M., Menoud, P., Flaschel, E. und Renken, A., 1992a. The effect of temperature on the kinetics of a reverse micellar protein extraction process. *Biotechnol Tech* **6**: 423-428.
- Hentsch, M., Menoud, P., Steiner, L., Flaschel, E. und Renken, A., 1992b. Optimization of the surfactant (AOT) concentration in a reverse micellar extraction process. *Biotechnol Tech* **6**: 359-364.
- Hentsch, M., Warnery, P., Renken, A. und Flaschel, E., 1996. Study of the simultaneous partitioning of proteins and surfactant in reverse micellar two-phase systems - Potential impact upon purification efficiency. *Bioseparation* **6**: 67-76.
- Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B. und Lindmann, B., 2004. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution. Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Holmes, D. S. und Quigley, M., 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-7.

- 
- Huang, S. Y. und Chang, H. L., 1995. Enhancement of Enzyme Recovery through Temperature Alternation in Reverse Micellar Extraction. *Bioseparation* **5**: 225-234.
- Huber, C. G., 1998. Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA. *J Chromatogr A* **806**: 3-30.
- Imre, V. E. und Luisi, P. L., 1982. Solubilization and condensed packaging of nucleic acids in reversed micelles. *Biochem Biophys Res Commun* **107**: 538-45.
- Ito, T., Smith, C. L. und Cantor, C. R., 1992. Sequence-specific DNA purification by triplex affinity capture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 495-8.
- Jarudilokkul, S., Poppenborg, L. H. und Stuckey, D. C., 1999. Backward extraction of reverse micellar encapsulated proteins using a counterionic surfactant. *Biotechnol Bioeng* **62**: 593-601.
- Jia, H. P., 2006. Gene therapy finds welcoming environment in China. *Nat Med* **12**: 263-264.
- Jolival, C., Minier, M. und Renon, H., 1990. Extraction of Alpha-Chymotrypsin Using Reversed Micelles. *J Colloid Interf Sci* **135**: 85-96.
- Kahlweit, M. und Strey, R., 1986. Phase-Behavior of Quinary Systems H<sub>2</sub>O-Oil Nonionic Amphiphile Ionic Amphiphile Electrolyte - the Tricritical Line. *J Phys Chem-Us* **90**: 5239-5244.
- Kepka, C., Lemmens, R., Vasi, J., Nyhammar, T. und Gustavsson, P. E., 2004a. Integrated process for purification of plasmid DNA using aqueous two-phase systems combined with membrane filtration and lid bead chromatography. *J Chromatogr A* **1057**: 115-124.
- Kepka, C., Rhodin, J., Lemmens, R., Tjerneld, F. und Gustavsson, P. E., 2004b. Extraction of plasmid DNA from *Escherichia coli* cell lysate in a thermoseparating aqueous two-phase system. *J Chromatogr A* **1024**: 95-104.
- Kloekner, J., Prasmickaite, L., Hogset, A., Berg, K. und Wagner, E., 2004. Photochemically enhanced gene delivery of EGF receptor-targeted DNA polyplexes. *J Drug Target* **12**: 205-213.
- Kong, W. P., Xu, L., Stadler, K., Ulmer, J. B., Abrignani, S., Rappuoli, R. und Nabel, G. J., 2005. Modulation of the immune response to the severe acute respiratory syndrome spike glycoprotein by gene-based and inactivated virus immunization. *J Virol* **79**: 13915-13923.

- Kosswig, K. und Stache, H., 1993. Die Tenside. Carl Hanser Verlag, München.
- Kramberger, P., Petrovic, N., Strancar, A. und Ravnikar, M., 2004. Concentration of plant viruses using monolithic chromatographic supports. *J Virol Methods* **120**: 51-7.
- Krei, G. A. und Hustedt, H., 1992. Extraction of Enzymes by Reverse Micelles. *Chem Eng Sci* **47**: 99-111.
- Kreuzer, K. N. und Cozzarelli, N. R., 1980. Formation and Resolution of DNA Catenanes by DNA Gyrase. *Cell* **20**: 245-254.
- Krishna, S. H., Srinivas, N. D., Raghavarao, K. S. und Karanth, N. G., 2002. Reverse micellar extraction for downstream processing of proteins/enzymes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **75**: 119-83.
- Kumar, A., Galaev, I. und Mattiasson, B., 1999. Purification of Lac repressor protein using polymer displacement and immobilization of the protein. *Bioseparation* **8**: 307-16.
- Kusano, K., Nakayama, K. und Nakayama, H., 1989. Plasmid-Mediated Lethality and Plasmid Multimer Formation in an *Escherichia coli* Recbc Sbcbc Mutant - Involvement of Recf Recombination Pathway Genes. *J Mol Biol* **209**: 623-634.
- Lahijani, R., Hulley, G., Soriano, G., Horn, N. A. und Marquet, M., 1996. High-yield production of pBR322-derived plasmids intended for human gene therapy by employing a temperature-controllable point mutation. *Hum Gene Ther* **7**: 1971-80.
- Lander, R. J., Winters, M. A., Meacle, F. J., Buckland, B. C. und Lee, A. L., 2002. Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB. *Biotechnol Bioeng* **79**: 776-784.
- Lang, J., Jada, A. und Malliaris, A., 1988. Structure and Dynamics of Water-in-Oil Droplets Stabilized by Sodium Bis(2-Ethylhexyl) Sulfosuccinate. *J Phys Chem-Us* **92**: 1946-1953.
- Lemmens, R., Olsson, U., Nyhammar, T. und Stadler, J., 2003. Supercoiled plasmid DNA: selective purification by thiophilic/aromatic adsorption. *J Chromatogr B* **784**: 291-300.
- Leser, M. E. und Luisi, P. L., 1990. Application of Reverse Micelles for the Extraction of Amino-Acids and Proteins. *Chimia* **44**: 270-282.

- 
- Leser, M. E., Mrkoci, K. und Luisi, P. L., 1993. Reverse micelles in protein separation: The use of silica for the back-transfer process. *Biotechnol Bioeng* **41**: 489-492.
- Leser, M. E., Wei, G., Luisi, P. L. und Maestro, M., 1986. Application of reverse micelles for the extraction of proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **135**: 629-635.
- Levy, M. S., O'Kennedy, R. D., Ayazi-Shamlou, P. und Dunnill, P., 2000. Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends Biotechnol* **18**: 296-305.
- Ljunglöf, A., Bergvall, P., Bhikhabhai, R. und Hjorth, R., 1999. Direct visualisation of plasmid DNA in individual chromatography adsorbent particles by confocal scanning laser microscopy. *J Chromatogr A* **844**: 129-35.
- Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H. und Mattiasson, B., 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends Biotechnol* **21**: 445-51.
- Luisi, P. L., Bonner, F. J., Kaeckle, H. und Pande, H., 1983. Topics in Pharmaceutical Sciences. Elsevier, Amsterdam.
- Luisi, P. L., Bonner, F. J., Pellegrini, A., Wiget, P. und Wolf, R., 1979. Micellar Solubilization of Proteins in Aprotic-Solvents and Their Spectroscopic Characterization. *Helv Chim Acta* **62**: 740-753.
- Lundeberg, J., Wahlberg, J. und Uhlen, M., 1990. Affinity purification of specific DNA fragments using a lac repressor fusion protein. *Genet Anal Tech Appl* **7**: 47-52.
- Lyddiatt, A. und O'Sullivan, D. A., 1998. Biochemical recovery and purification of gene therapy vectors. *Curr Opin Biotech* **9**: 177-185.
- Maitra, A., 1984. Determination of Size Parameters of Water Aerosol Oil Reverse Micelles from Their Nuclear Magnetic-Resonance Data. *J Phys Chem-US* **88**: 5122-5125.
- Marcozzi, G., Correa, N., Luisi, P. L. und Caselli, M., 1991. Protein Extraction by Reverse Micelles - a Study of the Factors Affecting the Forward and Backward Transfer of Alpha-Chymotrypsin and Its Activity. *Biotechnol Bioeng* **38**: 1239-1246.

- Martin, R., 1996. Gel electrophoresis: Nucleic Acids. Bios Scientific, London.
- Mathew, D. S. und Juang, R.-S., 2005. Improved back extraction of papain from AOT reverse micelles using alcohols and a counter-ionic surfactant. *Biochem Eng J* **25**: 219-225.
- Misiorow, R. I. und Wells, M. A., 1974. Activity of Phospholipase A2 in Reversed Micelles of Phosphatidylcholine in Diethyl-Ether - Effect of Water and Cations. *Biochemistry* **13**: 4921-4927.
- Mountain, A., 2000. Gene therapy: the first decade. *Trends in Biotechnol* **18**: 119-128.
- Murphy, J. C., Jewell, D. L., White, K. I., Fox, G. E. und Willson, R. C., 2003. Nucleic acid separations utilizing immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnol Prog* **19**: 982-6.
- Murphy, J. C., Wibbenmeyer, J. A., Fox, G. E. und Willson, R. C., 1999. Purification of plasmid DNA using selective precipitation by compaction agents - A scaleable method for the liquid-phase separation of plasmid DNA from RNA. *Nat Biotechnol* **17**: 822-823.
- Muul, L. M., Tuschong, L. M., Soenen, S. L., Jagadeesh, G. J., Ramsey, W. J., Long, Z. F., Carter, C. S., Garabedian, E. K., Alleyne, M., Brown, M., Bernstein, W., Schurman, S. H., Fleisher, T. A., Leitman, S. F., Dunbar, C. E., Blaese, R. M. und Candotti, F., 2003. Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* **101**: 2563-2569.
- Nabel, G. J., 2003. Vaccine for AIDS and Ebola virus infection. *Virus Res* **92**: 213-217.
- Ohlsson, R., Hentschel, C. C. und Williams, J. G., 1978. A rapid method for the isolation of circular DNA using an aqueous two-phase partition system. *Nucleic Acids Res* **5**: 583-90.
- O'Mahony, K., Freitag, R., Hilbrig, F., Muller, P. und Schumacher, I., 2005. Proposal for a better integration of bacterial lysis into the production of plasmid DNA at large scale. *J Biotechnol* **119**: 118-32.
- Onishi, Y., Azuma, Y. und Kizaki, H., 1993. An Assay-Method for DNA Topoisomerase Activity Based on Separation of Relaxed DNA from Supercoiled DNA Using High-Performance Liquid-Chromatography. *Anal Biochem* **210**: 63-68.

- 
- Pearson, F. C. und Weary, M., 1980. The Limulus Amebocyte Lysate Test for Endotoxin. *Bioscience* **30**: 461-464.
- Pietrini, A. V. und Luisi, P. L., 2002. Circular dichroic properties and average dimensions of DNA-containing reverse micellar aggregates. *Biochim Biophys Acta* **1562**: 57-62.
- Poppenborg, L. und Flaschel, E., 1994. Affinity Extraction of Proteins by Means of Reverse Micellar Phases Containing a Metal-Chelating Surfactant. *Biotechnol Tech* **8**: 307-312.
- Poppenborg, L., Friehs, K. und Flaschel, E., 1997. The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring. *J Biotechnol* **58**: 79-88.
- Powell, K., 2004. DNA vaccines - back in the saddle again? *Nat Biotechnol* **22**: 799-801.
- Prazeres, D. M., Ferreira, G. N., Monteiro, G. A., Cooney, C. L. und Cabral, J. M., 1999. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends Biotechnol* **17**: 169-74.
- Prazeres, D. M. F., Schluep, T. und Cooney, C., 1998. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *J Chromatogr A* **806**: 31-45.
- Prud'homme, G. J., 2005. DNA vaccination against tumors. *J Gene Med* **7**: 3-17.
- Ribeiro, S. C., Monteiro, G. A., Cabral, J. M. und Prazeres, D. M., 2002. Isolation of plasmid DNA from cell lysates by aqueous two-phase systems. *Biotechnol Bioeng* **78**: 376-84.
- Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., Karson, E. M., Lotze, M. T., Yang, J. C., Topalian, S. L., Merino, M. J., Culver, K., Miller, A. D., Blaese, R. M. und Anderson, W. F., 1990. Gene-Transfer into Humans - Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. *New Engl J Med* **323**: 570-578.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press,
- Schluep, T. und Cooney, C. L., 1998. Purification of plasmids by triplex affinity interaction. *Nucleic Acids Res* **26**: 4524-8.

- Schlupe, T. und Cooney, C. L., 1999. Immobilization of oligonucleotides on a large pore support for plasmid purification by triplex affinity interaction. *Bioseparation* **7**: 317-26.
- Schmidt, T., 1998. Produktion und Analytik von Plasmid-DNA für die Gentherapie. *PhD Thesis*, Bielefeld University, Faculty of Technology.
- Schmidt, T., Friehs, K., Schleef, M., Voss, C. und Flaschel, E., 1999. Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis. *Anal Biochem* **274**: 235-40.
- Schorr, J., Moritz, P., Seddon, T. und Schleef, M., 1995. Plasmid DNA for human gene therapy and DNA vaccines. Production and quality assurance. *Ann N Y Acad Sci* **772**: 271-3.
- See, R. H., Zakhartchouk, A. N., Petric, M., Lawrence, D. J., Mok, C. P. Y., Hogan, R. J., Rowe, T., Zitzow, L. A., Karunakaran, K. P., Hitt, M. M., Graham, F. L., Prevec, L., Mahony, J. B., Sharon, C., Auperin, T. C., Rini, J. M., Tingle, A. J., Scheifele, D. W., Skowronski, D. M., Patrick, D. M., Voss, T. G., Babiuk, L. A., Gauldie, J., Roper, R. L., Brunham, R. C. und Finlay, B. B., 2006. Comparative evaluation of two severe acute respiratory syndrome (SARS) vaccine candidates in mice challenged with SARS coronavirus. *J Gen Virol* **87**: 641-650.
- Sonti, S. V., Griffor, M. C., Sano, T., Narayanswami, S., Bose, A., Cantor, C. R. und Kausch, A. P., 1995. Large-Scale Isolation of Expression Vector Cassette by Magnetic Triple-Helix Affinity Capture. *Nucleic Acids Res* **23**: 3995-3996.
- Stadler, J., Lemmens, R. und Nyhammar, T., 2004. Plasmid DNA purification. *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S54-66.
- Stolberg, S. G., 1999. The biotech death of Jesse Gelsinger. *N Y Times Mag.* 136-140, 149-150.
- Stowers, D. J., Keim, J. M. B., Paul, P. S., Lyoo, Y. S., Merion, M. und Benbow, R. M., 1988. High-Resolution Chromatography of Nucleic-Acids on the Gen-Pak Fax Column. *J Chromatogr* **444**: 47-65.
- Strancar, A., Podgornik, A., Barut, M. und Necina, R., 2002. Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **76**: 49-85.
- Streitner, N., Voß, C. und Flaschel, E., 2008. Isolierung von Plasmid-DNA durch inversmizellare Zweiphasensysteme - Optimierung der Rückextraktion. *Chem Ing Tech* **80**: 831-837.

- Streitner, N., Voss, C. und Flaschel, E., 2007. Reverse micellar extraction systems for the purification of pharmaceutical grade plasmid DNA. *J Biotechnol* **131**: 188-196.
- Summers, D. K., 1996. The Biology of Plasmids. Blackwell Science Ltd, Cambridge.
- Thwaites, E., Burton, S. C. und Lyddiatt, A., 2002. Impact of the physical and topographical characteristics of adsorbent solid-phases upon the fluidised bed recovery of plasmid DNA from *Escherichia coli* lysates. *J Chromatogr A* **943**: 77-90.
- Trindade, I. P., Diogo, M. M., Prazeres, D. M. und Marcos, J. C., 2005. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A* **1082**: 176-84.
- Tseng, W. C. und Ho, F. L., 2003. Enhanced purification of plasmid DNA using Q-Sepharose by modulation of alcohol concentrations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **791**: 263-272.
- Tseng, W. C., Ho, F. L., Fang, T. Y. und Suen, S. Y., 2004. Effect of alcohol on purification of plasmid DNA using ion-exchange membrane. *J Membrane Sci* **233**: 161-167.
- Urthaler, J., Ascher, C., Wohrer, H. und Necina, R., 2007. Automated alkaline lysis for industrial scale cGMP production of pharmaceutical grade plasmid-DNA. *J Biotechnol* **128**: 132-49.
- Urthaler, J., Schlegl, R., Podgornik, A., Strancar, A., Jungbauer, A. und Necina, R., 2005. Application of monoliths for plasmid DNA purification development and transfer to production. *J Chromatogr A* **1065**: 93-106.
- Varley, D. L., Hitchcock, A. G., Weiss, A. M. E., Horler, W. A., Cowell, R., Peddie, L., Sharpe, G. S., Thatcher, D. R. und Hanak, J. A. J., 1998. Production of plasmid DNA for human gene therapy using modified alkaline cell lysis and expanded bed anion exchange chromatography. *Bioseparation* **8**: 209-217.
- Viklund, C., Svec, F., Frechet, J. M. und Irgum, K., 1997. Fast ion-exchange HPLC of proteins using porous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monoliths grafted with poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid). *Biotechnol Prog* **13**: 597-600.

- Viklund, C., Svec, F., Frechet, J. M. J. und Irgum, K., 1996. Monolithic, "Molded", Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties during Polymerization. *Chem Mater* **8**: 744-750.
- Voß, C., 2007. Production of plasmid DNA for pharmaceutical use. *Biotechnol Annu Rev* **13C**: 201-222.
- Voß, C., 2008. Aufarbeitung von Plasmid-DNA für Gentherapie und genetische Impfung. *Chem Ing Tech* **80**: 795-802.
- Voss, C., Lindau, D. und Flaschel, E., 2006. Production of recombinant RNase Ba and its application in downstream processing of plasmid DNA for pharmaceutical use. *Biotechnol Prog* **22**: 737-44.
- Voß, C., Schmidt, T. und Schleef, M., 2005. From bulk to delivery: Plasmid manufacturing and storage. In: M. Schleef, DNA-Pharmaceuticals, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Voss, C., Schmidt, T., Schleef, M., Friehs, K. und Flaschel, E., 2003. Production of supercoiled multimeric plasmid DNA for biopharmaceutical application. *J. Biotechnol.* **105**: 205-213.
- Voss, C., Schmidt, T., Schleef, M., Friehs, K. und Flaschel, E., 2004. Effect of ammonium chloride on plasmid DNA production in high cell density batch culture for biopharmaceutical use. *J Chem Technol Biotechnol* **79**: 57-62.
- Wahlund, P. O., Gustavsson, P. E., Izumrudov, V. A., Larsson, P. O. und Galaev, I. Y., 2004. Polyelectrolyte complexes as a tool for purification of plasmid DNA. Background and development. *J Chromatogr B* **807**: 121-7.
- Wang, Z. J., Yuan, Z. H., Matsumoto, M., Hengge, U. R. und Chang, Y. F., 2005. Immune responses with DNA vaccines encoded different gene fragments of severe acute respiratory syndrome coronavirus in BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun* **327**: 130-135.
- Wickbold, R., 1976. Die Analytik der Tenside. Chem. Werke Huels AG, Marl.
- Wils, P., Escriou, V., Warnery, A., Lacroix, F., Lagneaux, D., Ollivier, M., Crouzet, J., Mayaux, J. F. und Scherman, D., 1997. Efficient purification of plasmid DNA for gene transfer using triple-helix affinity chromatography. *Gene Ther* **4**: 323-30.

- 
- Wolbert, R. B. G., Hilhorst, R., Voskuilen, G., Nachtegaal, H., Dekker, M., Vantriet, K. und Bijsterbosch, B. H., 1989. Protein Transfer from an Aqueous Phase into Reversed Micelles - the Effect of Protein Size and Charge-Distribution. *Eur J Biochem* **184**: 627-633.
- Wolff, J. A. und Budker, V., 2005. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* **54**: 3-20.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. und Felgner, P. L., 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**: 1465-8.
- Woll, J. M., Dillon, A. S., Rahaman, R. S. und Hatton, T. A., 1987. Protein Purification. Alan R. Liss, New York.
- Woll, J. M., Hatton, T. A. und Yarmush, M. L., 1989. Bioaffinity Separations Using Reversed Micellar Extraction. *Biotechnol Progr* **5**: 57-62.
- Woodgate, J., Palfrey, D., Nagel, D. A., Hine, A. V. und Slater, N. K., 2002. Protein-mediated isolation of plasmid DNA by a zinc finger-glutathione S-transferase affinity linker. *Biotechnol Bioeng* **79**: 450-6.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-19.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

ADA-SCID	Adenosindeaminase-Immundefektsyndrom
AEC	Anionenaustauschchromatographie
AGE	Agarosegelelektrophorese
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
BSA	Bovine Serum Albumin
ccc	covalently closed circular
CGE	Kapillargelelektrophorese
chrDNA	chromosomale DNA
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
CPP	kritischer Packungsparameter
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMA	European Medicines Agency
EO	Ethylenoxid
E.U.	Endotoxin Units
FDA	Food and Drug Administration
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HSG	halbsynthetisches Glycerinmedium
kb	Kilobasenpaare
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
LIF	Laser induzierte Fluoreszenz
LPS	Lipopolysaccharid
n.a.	nicht verfügbar
n.d.	nicht detektierbar
oc	open circular
p.A.	zur Analyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDNA	Plasmid-DNA

---

PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Hydroniumionkonzentration
PO	Propylenoxid
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RNA	Ribonukleinsäure
Q-PCR	Quantitative PCR
TOMAC	Methyltrioctylammoniumchlorid
UV	Ultraviolett
YOYO	1,1'-(4,4,7,7-Tetramethyl-4,7-diazadecamethylen)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazol)-2-methyliden]-chinolinium-tetraiodid

## 7.2 *Symbole*

A	Oberfläche des Moleküls
$A_m$	Mizellfläche
a	Querschnittsfläche eines Tensidmoleküls
$c_E$	Konzentration des Extraktstoffes im Extrakt
$c_R$	Konzentration des Extraktstoffes im Raffinat
k	Boltzmann-Konstante
$K_E$	Verteilungskoeffizient
$l_{max}$	Länge der ausgetreckten Alkylkette
N	Aggregationszahl
T	absolute Temperatur
$V_m$	Volumen des Mizellkerns
v	Volumen der hydrophoben Gruppe
$\lambda$	Summe der molmassenunabhängigen Wechselwirkungen

### 7.3 Chemikalien

Gewöhnliche Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Sigma-Aldrich, Roth, VWR und Riedel-de Haën bezogen und waren vom Reinheitsgrad p.A. Weitere verwendete Chemikalien sind in der folgenden Liste aufgeführt.

Agarose	Roth
Ampicillin	Fluka
TOMAC	Sigma-Aldrich
BCA <sup>TM</sup> Protein Reagent A	Thermo Scientific
Bromphenolblau	Roth
BSA	Roth
Didecyldimethylammoniumbromid	Fluka
Didodecyldimethylammoniumbromid	Fluka
Dihexadecyldimethylammoniumbromid	Fluka
Dimethylditetradecylammoniumbromid	Fluka
Dimethyldioctadecylammoniumchlorid	Fluka
EDTA	Roth
Ethidiumbromid	Roth
1 kB Gene Ruler	Fermentas
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	Deutsche Hefewerke GmbH
Hydroxypropylmethylcellulose	Sigma-Aldrich
iso-Octan	Riedel-de Häen
RNase	Roth
SDS	Roth
Sojapepton	UD Chemie GmbH
Tetraphenylborat	Fluka
Tris	Roth
Tris-HCl	Roth
Triton X-114	Fluka
YOYO	Invitrogen

#### 7.4 *Chromatographiematerialien*

Fractogel DEAE	Merck
Plasmid Select	GE Healthcare
Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare

#### 7.5 *Primer*

Primer Pyruvatkinase (Invitrogen)

Primer pyka fwd  
GCGTCAGCTAAACCGAGCGGTAATCAC

Primer pyka rev  
GGCGTTTGCTACGTCCATGACTTCTGC

#### 7.6 *Verwendete Kit-Systeme*

Limulus Amebocyte Lysate Kinetic-QCL	Cambrex
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega

#### 7.7 *Geräte*

Biophotometer	Eppendorf
Bioreaktor 30 L	MBR
Druckmesseinheit	WIKA
Druckregelventil	Badger Meter Europa GmbH
Durchflussmesser	Krohne Messtechnik GmbH
Flotationssäule	
Glasrohr	Quickfit
Ständer	Eigenbau Universität Bielefeld
Geldokumentationssystem E.A.S.Y	Herolab.
GradiFrac FPLC-System	Pharmacia
Hydrosart Sartoconmembran	Sartorius
Intermig-Rührer	EKATO Rühr- und Mischtechnik GmbH

---

Kapillare DB-17	Agilent
Magnetrührer	Heidolph
Membranhalter	Sartorius
P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System	Beckmann Coulter
Peristaltikpumpe Ecoline VC	Ismatec
Photometer LKB Biochrom 4060	Pharmacia
Polyethersulfonmembran 100 kDa	Millipore
Polyethersulfonmembran 5 kDa	Millipore
Quarzglas-Mikrotiterplatte	Hellma
Rotationsschüttler	Eigenbau Universität Bielefeld
Rotor-Gene 3000	Corbett Life Science
Run One Electrophoresis Cell	Embi Tec
Spectramax 250	Molecular Devices
Thermostat	Julabo
Vortex Genie 1™	Bender & Hobein
XK 50/30-Säule	Pharmacia
XK 16/20-Säule	Pharmacia
Zahnradpumpe	IWAKI Europe GmbH
Zentrifuge 6K10	Sigma
Rotor 12500	
Rotor 12169	
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Rotor 3325	

### **7.8 Software**

Rotogene 3000	Rotorgene 6.0.19
Spectramax 250	Softmax Pro
Transilluminator	E.A.S.Y. Gel Documentation
P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System	Karat 32 Software

## 8 *Curriculum Vitae*

### **Persönliche Daten**

---

Name: Nadine Streitner  
geboren am: 29.10.1979 in Solingen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulische Ausbildung**

---

Aug. 86 – Jun. 90 Grundschole Spenge/Hücker-Aschen  
Aug. 90 – Jun. 99 Widukind-Gymnasium Enger  
Abschluss: Abitur  
Schwerpunktfächer: Mathematik, Spanisch  
Jan. 97 – März 97 Colegio Alemán Quito Ecuador

### **Studium**

---

Okt. 99 – Juli 05 Lebensmitteltechnologie  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Okt. 01 Vordiplom  
März 02 – Nov. 02 Auslandssemester an der Griffith University Brisbane Australien  
Okt. 04 – Apr. 05 Diplomarbeit bei der Humana GmbH in Herford  
Thema: Anwendbarkeit der Ionenchromatographie bei der Bestimmung der Nitrat- und Nitritgehalte von Rohstoffen, die bei der Produktion von Infant Formulas eingesetzt werden.  
Abschluss: Dipl.-Ing. Lebensmitteltechnologie  
2005 – 2008 Promotion an der Universität Bielefeld  
Technische Fakultät, Lehrstuhl für Fermentations-technik  
Thema: Extraktion pharmazeutisch einsetzbarer Plasmid-DNA und Integration in einen skalierbaren Aufarbeitungsprozess

## 9 *Schriftenverzeichnis*

Streitner, N., Voss, C., Flaschel, E. (2007). Reverse micellar extraction systems for the purification of pharmaceutical grade plasmid DNA. *J. Biotechnol.* **131**, 188-196.

Streitner, N., Voss, C., Flaschel, E. (2008), Isolierung von Plasmid-DNA durch invers-mizellare Zweiphasensysteme – Optimierung der Rückextraktion. *CIT* **80**, 831-837.

Tschapalda, K., Streitner, N., Voß, C., Flaschel, E. (submitted), Influence of different alkaline lysis procedures on the concentration of chromosomal DNA in the lysate and subsequent removal using reverse micellar extraction. *Biotechnol. Lett.*

Streitner, N., Voss, C., Flaschel, E. (2006). Extraktion von Nukleinsäuren mittels invers-mizellarer Zweiphasensysteme. Präsentiert auf der 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen in Wiesbaden.

Streitner, N., Voss, C., Flaschel, E. (2006). Extraction of nucleic acids using reverse micellar two-phase systems. Präsentiert beim 26<sup>th</sup> International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynuclotides in Innsbruck.

Streitner, N., Voss, C., Flaschel, E. (2007). Platform Technologies for Bioprocessing: Development of an Extraction Process for Nucleic Acids. Präsentiert auf der European Bioperspectives in Köln.

Streitner, N., Voss, C., Flaschel, E. (2007). Extraction of nucleic acids using reverse micellar two-phase systems. Präsentiert beim 26<sup>th</sup> International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynuclotides in Orlando, Florida.