

Untersuchung von Membranadsorbersystemen in der Proteinaufreinigung und Entwicklung Aptamer-basierter Affinitätschromatografie

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Chem. Öznur Kökpınar

geboren am 18.03.1977 in Gölbaşı

2008

Referent

Prof. Dr. T. Scheper

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferentin

PD Dr. C. Kasper

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 30.07.2008

Hierdurch erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, Juni 2008

Öznur Kökpınar

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 2004 bis Februar 2008 am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper, dem ich für die Überlassung der interessanten Projekte und seine stets freundliche und aufmunternde Unterstützung danke.

Frau PD Dr. Cornelia Kasper möchte ich für die Übernahme des Korreferats und die abwechslungsreichen Aufgabenstellungen außerhalb des Promotionsthemas danken.

Herrn Dr. Frank Stahl danke ich für die sehr guten fachlichen Hilfestellungen und die „Blanko-Bestellscheine“ beim Aptamerprojekt.

Ganz besonderer Dank gilt Johanna Walter für die hervorragende Zusammenarbeit, die vielen Diskussionen, förderlichen Ideen und das intensive Korrekturlesen dieser Arbeit trotz des eigenen Prüfungsstress.

Bei Martina Weiß bedanke ich mich herzlich für die gute Einführung in die Bedienung diverser Analysegeräte.

Martin Pähler danke ich für das angenehme Arbeiten im RNA-Labor und die Zeitersparnis durch die freundlicherweise angesetzten Puffer.

Für die große Hilfe bei der Kultivierung und Aufarbeitung im Großmaßstab möchte ich Michael Büring, Bastian Rode und Christian Endres danken.

Den Mitarbeitern des Instituts danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima. Ich weiß, jeder Dank bei meinen Kolleginnen im „Hühnerstall“ kommt zu kurz. Sie wissen aber Bescheid.

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Freunden, die mich während meiner Studien- und Promotionszeit herzlich begleitet haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für ihre Liebe und Unterstützung in jeder Hinsicht.

Zusammenfassung

Die Flüssigkeitschromatografie ist eine unersetzliche Technik in der Proteomforschung und in industriellen *Downstream* Prozessen. Die klassische Chromatografiesäule besteht dabei aus einem Stahl- oder Glasrohr, das mit porösen Partikeln gepackt wird. Die Transportphänomene bei diesen gepackten Säulen sind komplex und machen das *Scale-up* schwierig. Eine effektive Alternative bieten die Membranadsorber, die aus einer oder mehreren Lagen mikro- bzw. makroporöser Membranen bestehen und biospezifische Liganden auf ihrer inneren Porenoberfläche enthalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Baukastensystem auf Basis von Membranadsorbieren vorgestellt, mit dem schon im Mikrolitermaßstab eine effiziente Strategie zur Aufreinigung von Proteinen aus komplexen biologischen Proben entwickelt werden kann. Für diese Anwendung wurden die von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH hergestellten *8-strips* verwendet. Die Module sind mit unterschiedlich funktionalisierten Membranen versehen und können in Kombination mit 96-well Platten zum Hochdurchsatz *Screening* eingesetzt werden. Starke Ionenaustauscher (Q und S) und Metallchelat (IDA) Module wurden näher charakterisiert und mit Einheiten größerer Bettvolumina und anderer Bauformen verglichen (*spin columns*, MA 75). Bei den Ionenaustauschern konnte gezeigt werden, dass die Bindungskapazität unabhängig von der Modulform, der Ausdehnung des Membranbettes und der Flussrate ist. Allerdings wurde eine Abhängigkeit der Bindungskapazität von der Anzahl der Membranlagen beobachtet, die vor allem in einer unterschiedlichen Strömungsverteilung in den einzelnen Membranlagen begründet ist. Ein einfaches *Up-scale* von Einheiten mit gleicher Membranlagenanzahl (*8-strip*, 15-lagig, 4,8 cm² und MA 75 Einheit, 15-lagig, 75 cm²) konnte erzielt werden. Als Anwendungsbeispiel für Ionenaustauscher Module wurde das Wachstumshormon hGH aus CHO-Zellkulturüberständen über Kationenaustauschermembranen erfolgreich aufgereinigt. Die IDA *8-strips* wurden direkt zur parallelen Bestimmung der optimalen Aufreinigungsbedingungen von His-getaggtten Enzymen eingesetzt und die Ergebnisse auf IDA 75 Einheiten übertragen.

Auf der Suche nach neuen Liganden werden zunehmend Aptamere für den Einsatz in chromatografischen Aufarbeitungsprozessen diskutiert. Aptamere sind kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide, die ihre Targetmoleküle mit hoher Affinität und Spezifität binden können. So wurde im zweiten Teil der Arbeit eine Aptamer-basierte Affinitätschromatografie entwickelt. Hierzu wurden zwei gegen den His-Tag gerichtete Aptamere als Modellliganden verwendet. Zur Immobilisierung der Aptamere wurden verschiedene Oberflächen (poröse Agarose Partikel, Membranen, Magnetic Beads) mit unterschiedlichen Funktionalitäten (Aldehyd, Epoxy, Carboxyl, Amino) untersucht. Die aminofunktionalisierten Aptamere konnten durch Aktivierung mit Cyanurchlorid unter Erhalt ihrer aktiven Konformation an NH₂-Magnetpartikel immobilisiert werden. Nach Optimierung und Charakterisierung der entwickelten Aptamerchromatografie wurden His-getaggte Proteine aus Fermentationsbrühen erfolgreich aufgereinigt, wobei die Wiederverwendbarkeit und Langzeitstabilität der Aptamerpartikel demonstriert werden konnte.

Schlagerworte: Membranadsorber, Aptamere, Magnetpartikel

Abstract

Liquid chromatography is an indispensable tool in proteomics research and industrial applications. Chromatographic techniques are traditionally carried out using packed beds. The complex transport phenomena of packed bed chromatographic processes make the scale-up difficult. An effective alternative presents the membrane adsorber based downstreaming. Membrane adsorbers are composed of one or more layers of microporous and macroporous membranes, which are modified by diverse biospecific ligands.

Within the scope of this thesis, a modular construction system concept based on membrane adsorber technology was developed to screen different target proteins and to devise the most efficient strategy for their fast and direct separation and purification. For the implementation of this concept, 8-strip devices were designed by Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen. Each 8-strip represents a certain membrane type (e.g., ion exchanger, metal chelate) and can be arranged in the 96-well format. To demonstrate the flexible applicability of the developed membrane adsorber based devices in a high-throughput downstream screening system, the adsorption capacity and the selectivity of the strong ion exchange (Q and S) and metal chelate (IDA) adsorber membranes, as well as the effect of loading-elution conditions, were investigated and compared with membrane modules with a larger bed volume and other types of construction (spin columns and MA 75 units). It could be shown that the binding capacity of ion exchangers is not limited by the type of construction, the expansion of the membrane bed and flow rate. However, the binding capacity was dependent on the stacks of large number of membranes, which is caused by the variable flow dispersion in the several membrane layers. An easy scale-up of the units equal number of membranes (8-strip, 15 layers, 4.8 cm² and MA 75 unit, 15 layers, 75 cm²) was demonstrated. As example of use for ion exchanger modules the human growth hormone (hGH) was successfully purified from CHO cell culture supernatant on cation exchange membranes. The IDA 8-strips were applied in the determination of the optimal purification conditions of his tagged enzymes and the results were carried on IDA 75 units.

In search of new ligands, aptamers are increasingly discussed for the application in the chromatographic purification processes. Aptamers are short single stranded DNA or RNA oligonucleotides binding their target molecules with high affinity and specificity. Therefore, in the second part of the thesis an aptamer based affinity chromatography was developed. For this purpose, two aptamers against his tag were utilised as model ligands. To immobilise the aptamers, several surfaces (porous agarose particle, membranes, magnetic beads) with different functionalities (aldehyde, epoxy, carboxyl, amino) were investigated. Under maintenance of their active conformation, the amine-modified aptamers could be immobilised on amino magnetic beads by activation with cyanuric chloride. After optimisation and characterisation of the developed aptamer chromatography, the successful purification of his tagged proteins from fermentation broths was achieved, whereas the reusability and the long-term stability of the aptamer beads were demonstrated.

Keywords: membrane adsorber, aptamer, magnetic beads

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
2	Grundlagen der präparativen Chromatografie	3
2.1	Membranadsorber	6
2.2	Magnetpartikel	7
2.3	Aptamere als neuartige Affinitätsliganden in der analytischen und präparativen Chromatografie	8
2.3.1	SELEX (<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>)	8
2.3.2	Charakteristika von Aptameren	9
2.3.3	Anwendung von Aptameren in der Affinitätschromatografie	12
3	Membranchromatografie: Materialien und Methoden	15
3.1	Membranadsorbereinheiten	15
3.2	Protokolle zur Proteinaufreinigung	16
3.3	Visualisierung der Adsorptionsverteilung auf den Membranen	19
3.4	Aufnahme von Bindungsisothermen	20
3.5	Bereitstellung von hGH-Überständen und hGH-ELISA	21
3.6	Produktion von His-Tag Proteinen	21
4	Membranchromatografie: Experimenteller Teil	24
4.1	Ionenaustauscher-Membranen	25
4.1.1	Charakterisierung der Ionenaustauscher	25
4.1.2	<i>Scale-up</i> vom Mikro- in den Labormaßstab	32
4.1.3	Anwendung: Aufreinigung von hGH mittels S-Membranen	36
4.2	Metallchelat Membranen	39
4.2.1	Herstellung von His-Tag Proteinen	39
4.2.2	Optimierung der Aufreinigung von His-Tag Proteinen mittels <i>8-strips</i> und Übertragung auf IDA 75	40
4.2.3	Charakterisierung der IDA Membranen	41
5	Membranchromatografie: Zusammenfassung und Ausblick	46
6	Aptamerchromatografie: Materialien und Methoden	48
6.1	Oberflächenplasmonresonanz (SPR) Spektroskopie	48
6.2	Bestimmung der Aptamerkonzentration	50
6.3	Aptamere auf Epoxy-Sepharose Gel	50
6.4	Reaktion mit Aldehydmembran	51

6.5	EDC-NHS Aktivierung der Carboxyoberflächen.....	52
6.6	EDC Aktivierung der Carboxyl Magnetic Beads	53
6.7	Immobilisierung an Amino Magnetic Beads.....	53
6.8	Aminofunktionalisierung regenerierter Cellulose Membranen.....	54
6.9	Bindung des Targetproteins.....	55
7	Aptamerchromatografie: Experimenteller Teil.....	56
7.1	Bestimmung der Funktionalität der verwendeten Aptamere mittels SPR.....	56
7.2	Immobilisierung des 6H7-Aptamers an Epoxy- bzw. Aldehydoberflächen und Bindung / Elution von Bgl-His.....	58
7.3	Carboxylfunktionalisierte Oberflächen in der Entwicklung der Aptamerchromatografie.....	59
7.4	Cyanurchloridaktivierung der Aptamere und Immobilisierung an Amino Magnetic Beads	63
7.5	Optimierung der Aptamerchromatografie auf Basis von aminomodifizierten Magnetpartikeln.....	65
7.5.1	Etablierung eines geeigneten Analyseverfahrens zur Bestimmung der Proteine neben Imidazol	66
7.5.2	Bestimmung der Aptamer-Immobilisierungszeit.....	70
7.5.3	Abhängigkeit der Aptamerdichte von der Immobilisierungskonzentration.....	71
7.5.4	Variation der Protein-Aptamer-Interaktionszeit.....	73
7.5.5	Optimierung der Elutionsbedingungen	74
7.6	Charakterisierung der Aptamerbeads	74
7.7	Anwendung der Aptamerchromatografie: Aufreinigung von His-Tag Proteinen aus Zelllysaten	76
7.7.1	Untersuchung der Wiederverwendbarkeit der Aptamerbeads	77
7.7.2	Untersuchung der Langzeitstabilität der immobilisierten Aptamere	78
7.8	Versuche zur Entwicklung Membran-basierter Aptamerchromatografie	78
8	Aptamerchromatografie: Zusammenfassung und Ausblick.....	82
9	Anhang.....	84
9.1	Standardanalyseverfahren.....	84
9.2	Abkürzungsverzeichnis	86
9.3	Chemikalien.....	89
9.4	Verwendete Geräte	91
10	Literaturverzeichnis.....	93

1 Einleitung und Aufgabenstellung

In der pharmazeutischen Industrie ist eine wachsende Nachfrage nach rekombinanten Proteintherapeutika zu beobachten. Mehrere biologische Präparate sind entweder bereits in Phase III der klinischen Studien oder warten auf Zulassung. Um den Bedarf des Marktes zu decken, werden dabei einige Präparate in größeren Mengen produziert (größer 1 g pro Patient und pro Jahr). Neben den Produkten von therapeutischem Interesse bestehen auch Protein- und Enzymapplikationen in der Landwirtschaft, der Nahrungsmittel-, Futter, chemischen und pharmazeutischen Industrie sowie in der Analyse und Molekularbiologie. Die weltweiten Enzymabsätze sind mit über 500 Produkten für mehr als 50 Applikationen über 2 Mrd. Dollar pro Jahr [1].

Im Gegensatz zu den industriellen Enzymen, bei denen die Herstellungskosten minimal sein können, ist die Produktion von Proteintherapeutika mit hohen Kosten verbunden. Dabei fallen 50-80 % der gesamten Herstellungskosten auf die Isolations- und Feinreinigungsprozesse [2]. Dies ist bedingt durch die strengen Qualitätsanforderungen, die für diese Proteinprodukte vorgeschrieben werden (wie z. B. Wirksamkeit, Stabilität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik). Entsprechend den Validierungsplänen müssen die therapeutischen Proteine von Kontaminanten wie Wirtszellproteinen, Nukleinsäuren, Endotoxinen, Pyrogenen, Viren, Zellkulturadditiven, Antibiotika und Auswaschungen vom Chromatografie Medium (Ligandenausblutung) sowie von inaktiven und modifizierten Formen des Produkts befreit werden [3, 4]. Zur Senkung der Kosten für das *Downstream Processing* sind effektive analytische und präparative Werkzeuge notwendig.

Des Weiteren ist im Bereich biotechnologischer Forschung die Isolierung und Aufreinigung von Proteinen aus komplexen biologischen Systemen wie Zellkulturüberständen, bakteriellen Fermentationsbrühen und tierischen oder pflanzlichen Extrakten eine wesentliche Voraussetzung für die anschließende Untersuchung von Struktur und Funktion. Dabei wird in der Regel im Mikrolitermaßstab gearbeitet und es ist von entscheidender Bedeutung, milde und produktschonende Bedingungen für den Aufreinigungsprozess zu entwickeln, um eine Denaturierung des Proteins und einen damit einhergehenden Verlust der biologischen Aktivität zu verhindern [5, 6]. Beispielsweise werden bei den strukturellen Genomprojekten zur Kontrolle von Expressionsklonen Proteine im Hochdurchsatz in Mikrotiterplatten exprimiert. Dies erfordert eine schnelle und parallele Bearbeitung der anfallenden Proben unter Verwendung kosteneffektiver Methoden [7].

Vor diesem Hintergrund sollen im Rahmen dieser Dissertation integrierte Systeme auf Basis der Membranadsorbertechnologie zur Aufreinigung von Proteinen untersucht werden. Diese Systeme sollen eine gezielte und schnelle Problemlösung der vorliegenden Trennaufgabe ermöglichen.

Dabei soll zunächst in einem kleinen Maßstab eine geeignete Kombination von Membranbasis, Derivatisierung der Membran und entsprechender Dekoration, sowie geeignete Immobilisierungs- und Elutionsbedingungen gefunden werden. Für diese Anwendung sollen Screening-Module eingesetzt werden, die die Testung unterschiedlicher Membransysteme unter gleichen Bedingungen zur Abtrennung der gewünschten Komponente erlauben. Verschiedene Membranen können kombiniert werden, um damit eine optimale Aufreinigung der gewünschten Komponente zu erzielen. Darüber hinaus wird eine möglichst umfassende Beschreibung der Dynamik von Stofftransport und Adsorption in der Membranchromatografie angestrebt, wobei das Bindungs- und Durchbruchverhalten, die Bindungskapazitäten sowie die *Scale-up*-Fähigkeit verschiedener Membranadsorber (Ionenaustauscher, Affinitätsmembranen) durch die Verwendung eines modularen Kartuschensystems bestimmt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll eine neuartige Aptamer-basierte Affinitätschromatografie entwickelt werden. Unter Aptameren versteht man synthetische DNA und RNA Moleküle, die Liganden hochspezifisch binden können. Obwohl Aptamere sich strukturell von Antikörpern unterscheiden, ahmen sie die molekularen Erkennungseigenschaften von Antikörpern nach. Sie können daher Antikörper substituieren und bieten den Vorteil, dass sie eine höhere Stabilität aufweisen und günstiger zu produzieren sind.

Bei der Entwicklung der Aptamerchromatografie werden verschiedene Oberflächen (poröse Partikel, Magnetic Beads, Membranen) mit unterschiedlichen Funktionalitäten (Aldehyd, Epoxy, Carboxyl, Amino) zur Immobilisierung des Aptamers untersucht, wobei die Aktivität des immobilisierten Aptamers gewährleistet werden muss. Anschließend sollen dann über die Aptamer-funktionalisierten Matrices Proteine aus Fermentationsbrühen unter Ermittlung der optimalen Bedingungen aufgereinigt werden.

2 Grundlagen der präparativen Chromatografie

Die Flüssigkeitschromatografie ist eine wichtige Technik in der Proteinforschung und *Large-scale* Proteinaufreinigung, die die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften erlaubt [8, 9]. Das Prinzip der Flüssigkeitschromatografie beruht darauf, dass gelöste Substanzgemische in mobiler Phase über eine stationäre Phase wandern und dabei aufgrund unterschiedlich starker Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten mit der stationären Phasenoberfläche aufgetrennt werden.

Ein herkömmliches chromatografisches Trennsystem ist aufgebaut aus einer Trennsäule, einer Lösungsmittelpumpe, der Probenaufgabe und der Detektion. Die Trennsäule ist dabei das Kernstück des Systems. Sie besteht aus einem Stahl- oder Glasrohr, das mit dem Füllmaterial, der stationären Phase, gepackt wird. Füllmaterialien sind entweder poröse oder nichtporöse feste Partikel von möglichst einheitlicher Größe. Sie enthalten kovalent gebundene, funktionelle Gruppen, welche für die Trennmethode spezifisch sind [10].

Drei unterschiedliche Material-Gruppen werden für die Chromatografie von Proteinen verwendet [11]:

- Biopolymere wie Cellulose, Dextran, Agarose oder Chitosan
- Synthetische Polymere wie Polyacrylamid, Methacrylate oder Polyvinylbenzol/Polystyrol
- Anorganische Polymere wie Kieselsäure, Zeolithe, Zirkoniumoxid, Hydroxyapatit oder poröse Glaskügelchen

Die charakteristischen Eigenschaften eines Proteins ermöglichen eine Isolierung und Reinigung des Proteins aus biologischen Matrices. In Tabelle 2.1 sind die Eigenschaften, die in der Chromatografie ausgenutzt werden, zusammengefasst [12-15].

Tabelle 2.1 Wechselwirkungen in der Proteinchromatografie.

Name	Wechselwirkung	Trennung durch
Adsorptionschromatografie	Oberflächenbindung	Molekulare Struktur
Ionenaustauschchromatografie	Ionenbindung	Oberflächenladung
Größenausschlusschromatografie	Größenausschluss	Molekulare Größe und Form
Affinitätschromatografie	Biospezifische Adsorption/Desorption	Molekulare Struktur
Hydrophobe Interaktionschromatografie	Hydrophobe Komplexbildung	Hydrophobizität und hydrophobe Stellen
Metalchelat Chromatografie	Koordinationskomplex	Komplexbildung mit Übergangsmetallionen
Normal-phase Chromatografie	Hydrophobe Komplexbildung	Hydrophobizität
Reversed-phase Chromatografie	Hydrophobe Komplexbildung	Hydrophobizität

Die Ionenaustauschchromatografie ist weiterhin das „Arbeitspferd“ für die *Large-scale* Proteinaufreinigung in der biotechnologischen Industrie. Die Retention der Proteine in Ionenaustauscher Systemen hängt zum einen von der Oberflächenladungsverteilung des Proteins, zum anderen von der Ligandendichte an der stationären Phase sowie vom pH-Wert und Salzgehalt der mobilen Phase ab. Aufgrund dieser Abhängigkeit wird der Chromatografieprozess zur Erzielung einer effizienten Aufreinigung im linearen oder Stufengradienten Operationsmodus durchgeführt [8].

Die Affinitätschromatografie ist die Trennmethode mit der größten Spezifität und Selektivität für die Isolierung von Biomolekülen [16]. Hierbei werden die Proteine auf der Basis von einer reversiblen Interaktion zwischen einem Protein (oder einer Gruppe von Proteinen) und einem spezifischen, matrixgebundenen Liganden isoliert. Typische Interaktionspartner, die in der Affinitätschromatografie benutzt werden, sind:

- Enzym \leftrightarrow Substrat, Cofaktor, Inhibitor
- Antikörper \leftrightarrow Antigen, Virus, Zelle
- Lectin \leftrightarrow Glykoprotein, Polysaccharid, Zelle
- Nukleinsäure \leftrightarrow komplementäre Basensequenz, Polymerase, Protein
- Hormon, Vitamin \leftrightarrow Rezeptor, Carrier
- Glutathion \leftrightarrow Glutathion-S-transferase
- Immunoglobulin (IgG) \leftrightarrow Protein A, Protein G
- Metallionen \leftrightarrow native Proteine mit Histidin, Cystein und/oder Tryptophan Resten auf ihrer Oberfläche

Um eine effiziente Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus rohen Zellextrakten oder Kulturüberständen zu verwirklichen, wurden mehrere Fusionsysteme entwickelt, in denen das Targetprotein genetisch so verändert wird, dass durch Einführung eines C- oder N-terminalen Polypeptid-Restes die oben genannten Interaktionen ausgenutzt werden können: ganze Enzyme mit Affinität zu immobilisierten Substraten oder Inhibitoren; Peptid-bindende Proteine mit Affinität zu Immunoglobulin G oder Albumin; Kohlenhydrat-bindende Proteine oder Domänen; Biotinylierung; Antigen Epitope mit Affinität zu immobilisierten monoklonalen Antikörpern; geladene Aminosäuren für die Nutzung auf Ladung basierter Methoden; poly(His) Reste für den Einsatz in der immobilisierten Metallchelate Affinitätschromatografie und andere poly(Aminosäuren) mit Bindungsspezifitäten basierend auf Eigenschaften der Aminosäure-Seitenkette [17].

Konventionelle Chromatographiesäulen sind beschränkt durch intrapartikuläre Diffusion, hohen Druckabfall und das Auftreten von Kurzschlussströmungen. Die innere Oberfläche der porösen Partikel ist für gelöste Substanzen nur durch Diffusion erreichbar. Diese Abhängigkeit von intrapartikulärer Diffusion steigert die Transportzeit bei Makromolekülen, folglich steigt auch das Elutionsvolumen. Während des Trennprozesses über die gepackte

Säule kommt es wegen Verfestigung der Schüttung durch Mediumdeformation und aufgrund von Säulenverstopfung durch Ansammlung von kolloidalem Material zu einem hohen Druckabfall. Das Auftreten von Kurzschlussströmungen führt zu einer geringeren Nutzung der Packung. Hierdurch ist das Transportphänomen von auf gepackten Säulen beruhenden Prozessen kompliziert und macht das *Scale-up* schwierig [18-20].

Zur Vermeidung dieser Probleme wurde vor allem die Prozessführung variiert. So wurde in den letzten Jahren die *Expanded-bed* Chromatografie untersucht, wobei dieser Prozess aufgrund der kurzen Lebensdauer der Trägerpartikel keinen Einstieg in die industrielle Praxis gefunden hat. Andere Konzepte verfolgten die Entwicklung von kontinuierlichen Chromatografieprozessen, wie die *Simulated Moving-bed* Technologie [21] oder *Preparative Continuous Annular* Chromatografie [22]. Auch diese Verfahren konnten die gepackte Säulenchromatografie nicht völlig ersetzen, da in vielen Fällen die betriebliche Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit gering und die Kosten relativ hoch sind [23].

Deshalb wurde in der Literatur nach Chromatografiealternativen gesucht. Von Przybycien et al. (2004) wurde ein Übersichtsartikel über die kürzlich in der Literatur vorgestellten Technologien publiziert. Diese Alternativen werden allgemein als *Bulk*, Feld-basierte und adsorptive Separationstechniken charakterisiert. *Bulk* Separationen sind durch Phasenwechsel gekennzeichnet, während Feld-basierte Separationen auf ein angelegtes Kraftfeld (Fluss, magnetisch oder elektrisch) und adsorptive Trennungen auf Sorbent-Sorbat Interaktionen basieren [24]. Diese Verfahren sind bezüglich ihres Auflösungspotenzials und der industriellen Reife in Abbildung 2.1 dargestellt [25]. Die Säulenchromatografie ist das Standardverfahren in industriellen Applikationen. Die stärkste Alternative hierzu ist zur Zeit die Kristallisation. Aber auch die Membranchromatografie findet in industriellen Prozessen immer häufiger Anwendung.

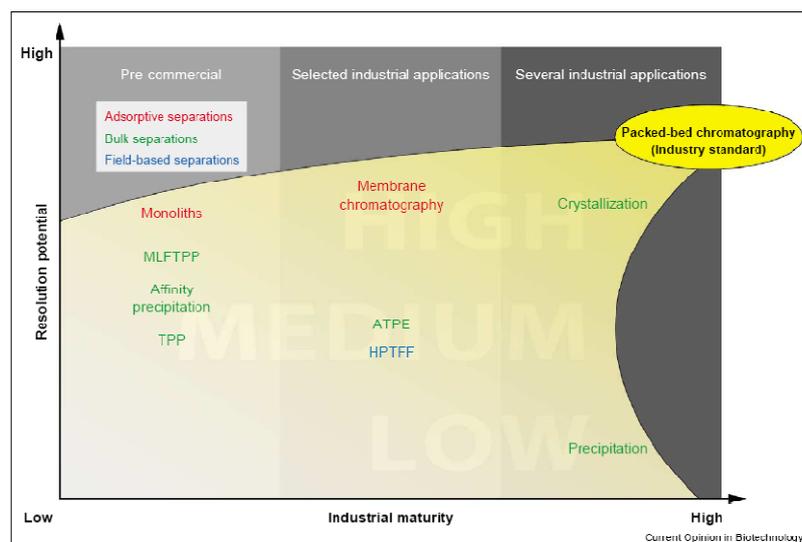


Abbildung 2.1 Analyse von Chromatografie Alternativen im Hinblick auf das relative Auflösungspotenzial und industrielle Reife. ATPE, *aqueous two-phase extraction*; HPTFF, *high-performance tangential flow filtration*; MLFTPP, *macroaffinity ligand-facilitated three-phase partitioning*; TPP, *three-phase partitioning*. Quelle: Przybycien et al. (2004) [25].

2.1 Membranadsorber

Membranadsorber stellen eine spezielle Form der stationären Phase in Chromatografie-Verfahren dar. Diese Adsorber bestehen aus einer oder mehreren Lagen mikro- bzw. makroporöser Membranen, die biospezifische Liganden auf ihrer inneren Porenoberfläche enthalten [26, 27]. Sie funktionieren als extrem kurze chromatografische Säulen mit großem Durchmesser [28-30]. Durch Verwendung solcher Membraneinheiten können einige Probleme, die mit den klassischen Trägermaterialien verbunden sind, überwunden werden [31].

Bei Membranadsorbern ist im Gegensatz zu gepackten Säulen der Durchflusswiderstand aufgrund höherer Porosität niedrig. Der Lösungsmitteltransport erfolgt in erster Linie durch Konvektion, wodurch die Prozesszeit und das Elutionsvolumen reduziert werden. Der Druckabfall ist ebenfalls deutlich niedriger und es können konstante dynamische Bindungskapazitäten sogar bei hohen Flussraten erzielt werden [117]. Durch den Einsatz von Membraneinheiten kann auch das *Scale-up*-Problem umgangen werden. Darüber hinaus sind diese Einheiten generell einfacher und billiger zu produzieren [32, 33].

Neben diesen Vorteilen weist die Membranchromatografie auch einige Nachteile auf. Ein Schwachpunkt von Membranadsorbern liegt in der im Vergleich zu gepackten Säulen geringen Bindungskapazität. Dies kann auf das niedrige Verhältnis von Oberfläche zu Bettvolumen zurückgeführt werden. Ineffiziente Einlaufflussverteilungen machen sich in der Membranchromatografie aufgrund einer großen Frontalfläche hinsichtlich der Betthöhe besonders bemerkbar. Im Innern des Adsorbers wird die Lösungsmittelfront durch die Flussverteilung deformiert, daraus folgt eine Verbreiterung der Form der Durchflusskurve, was wiederum zu einer Reduktion der effektiven Adsorbensnutzung führt. Die optimale Adsorbensnutzung wird auch durch eine ungleichmäßige Porengrößenverteilung vermindert. Die Flüssigkeitszufuhr erfolgt hauptsächlich durch die größeren Poren und nur wenig Material erreicht die innere Oberfläche der kleineren Poren. Ein ähnliches Problem tritt bei ungleichmäßiger Dicke der Membran auf. Der Fluss wird infolge niedrigeren Druckabfalls dort gefördert, wo die Membranstärke gering ist. Durch Verwendung von Adsorbereinheiten mit mehrlagigen Membranen können diese Probleme minimiert werden [19]. Membranadsorber werden am besten bei Aufreinigungsprozessen eingesetzt, in denen große Volumina mit einer geringen Konzentration Zielprotein bearbeitet werden müssen [18, 34, 35].

Verschiedene kommerziell erhältliche Membranadsorber differieren in Modulaufbau und Membranfunktionalität und werden im Labor sowie in industriellen Prozessen eingesetzt (z. B. Membranadsorber der Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen). Die Membranen bestehen dabei aus regenerierter Cellulose [36] und sind mit starken/schwachen Ionenaustauschern, metallchelatisierenden Gruppen oder mit Protein A funktionalisiert. Es sind auch Membranen mit Epoxy- oder Aldehyd-Gruppen erhältlich, bei denen die Dekoration mit anderen Liganden wie z. B. Antikörpern erfolgen kann. Die Modulvariation reicht von Sartobind MA-Einheiten mit 0,14 – 2,8 ml Bettvolumen (5 - 20 Membranlagen) bis hin zu Sartobind Systemen mit 35 – 2130 ml Bettvolumen (15 - 60 Membranlagen) für den großtechnischen Einsatz [37-39]. Die Verwendung von Sartobind[®] MA-Einheiten als ersten

Schritt im *Scale-up* von *Downstream* Prozessen konnte am Beispiel der Molke-Aufarbeitung erfolgreich demonstriert werden [40]. Zhou und Tressel (2006) zeigten durch eine Kostenanalyse, dass Ionenaustauscher Membranchromatografie als *Polishing*-Schritt im *Flow-through* Modus eine praktikable und günstige Alternative zu Ionenaustauscher Säulenchromatografie für die Antikörperproduktion im Prozessmaßstab bietet [41].

2.2 Magnetpartikel

Als eine weitere Alternative zu gepackten Säulen entwickelte sich in der molekularbiologischen und im diagnostischen Bereich der Einsatz von magnetischen Nanopartikeln als ein effizientes Werkzeug für eine schnelle und einfache Extraktion von Biomolekülen [42].

Magnetpartikel sind Eindomänen Magnetdipole, die in Abwesenheit eines magnetischen Feldes keine gerichtete Orientierung aufweisen. Die magnetischen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen sind schwach (<1 kT) und thermische Einflüsse dominieren die Dispersion der Partikel. Erst beim Anlegen eines äußeren Magnetfeldes richten sich die Partikel parallel zum Magnetfeld aus und können so abgetrennt werden. Im feldfreien Raum kehren sie dann wieder in den ungeordneten, frei beweglichen Zustand zurück. Eine Restmagnetisierung und Partikelaggregation tritt dabei nicht auf. Dieses hysteresefreie Verhalten wird als Superparamagnetismus bezeichnet [43, 44].

Die superparamagnetischen Partikel werden zum einen durch Emulsionspolymerisation von Methacrylat und Divinylbenzol in Anwesenheit von Magnetit Nanopartikeln, die mit Ölsäure beschichtet sind, hergestellt. Hierbei werden Partikel mit einem Durchmesser von 390 nm und einer sternförmigen Struktur erhalten. Eine andere Möglichkeit zur Herstellung von Magnetpartikeln ist die Gasphasenkondensation von Eisen(III)-acetylacetonat mit Tetraethylortosilicat bei einer Reaktionstemperatur von 1000 °C und einem Druck von 40 mbar. Ein anderes Verfahren ist die basische Fällung einer Eisen(II)-/Eisen(III)-Chloridlösung. Die erhaltenen Magnetit-Nanopartikel (Fe_3O_4) können dann über einen Sol-Gel-Prozess oder über langsame Polymerisation einer Natriumsilikatlösung mit Silica beschichtet werden [44, 45].

Die Nutzung von Magnetpartikeln als reaktive Matrix erlaubte die Entwicklung von einfachen, schnellen und effizienten Methoden für die Isolierung von biologischen Zielmolekülen. Heutzutage können diese Prozesse zweckmäßigerweise andere Techniken wie Zentrifugation, Filtration und Chromatografie ersetzen. Im biomedizinischen Bereich ist in zahlreichen Publikationen die Verwendung von Magnetpartikeln zur Trennung von Biomolekülen, Zellsortierung und Wirkstofffreisetzung, abgehandelt [46]. Darüber hinaus sind Magnetpartikel weit verbreitet in der Molekularbiologie, medizinischen Diagnostik und Therapie [47]. Die größte Applikation betrifft jedoch die Extraktion von Biomolekülen wie Proteinen, Antikörpern und Nukleinsäuren [48-51]. Antikörper tragende Magnetpartikel werden beim *Capturing* von spezifischen Bakterien und Viren eingesetzt [52]. Einige publizierte Anwendungsbeispiele sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.2 Übersicht über unterschiedliche publizierte Anwendungen von Magnetpartikeln.

Funktionalisierung	Anwendung	Literatur
Lektin	Isolierung von Glykopeptiden aus humanem Serum	[53]
Ni-NTA	automatisierte Aufreinigung von His-Tag Proteinen	[54]
Antikörper	Hochdurchsatzisolierung von Peptiden aus humanem Serum	[55]
AT-reiches Oligonukleotid	Selektion von verschiedenen Medikamenten zur massenspektrometrischen Bestimmung	[56]
Penicillin Amidase	Untersuchung von kinetischen, selektiven und stereoselektiven Eigenschaften von immobilisiertem Enzym	[57]
Polymyxin B	Entfernung von Lipopolysacchariden aus rekombinanten Proteinproben	[58]
Diethylaminoethyl-Gruppen	<i>Capturing</i> von Plasmid DNA direkt aus dem Zelllysat	[59]
Antikörper gegen Zelloberflächenmarker	Isolierung und Expansion von Zellen	[60]
Palladium	Suzuki Kreuz-Kopplungsreaktion	[61]

2.3 Aptamere als neuartige Affinitätsliganden in der analytischen und präparativen Chromatografie

Unabhängig voneinander berichteten 1990 drei unterschiedliche Laboratorien über ihre Ergebnisse in der Entwicklung einer *in vitro* Selektions- und Amplifikationstechnik für die Isolierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen, die im Stande waren, Targetmoleküle (Zielmoleküle) mit hoher Affinität und Spezifität zu binden. Die Technik wurde als SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) und die resultierenden Oligonukleotide als Aptamere bezeichnet [62-64]. Aptamere, abgeleitet vom Lateinischen *aptus* (passend, einpassen), sind spezifische DNA- oder RNA-Oligonukleotide mit der Fähigkeit unterschiedliche Targetmoleküle wie Peptide, Proteine, Wirkstoffe, organische und anorganische Moleküle oder auch an ganze Zellen mit einer hohen Affinität und Spezifität zu binden [65].

2.3.1 SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*)

Aptamere werden mit Hilfe des SELEX Prozesses, der iterative Zyklen aus Adsorption, Selektion und Amplifikation umfasst, aus einer Bibliothek mit vielen unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen selektiert (Abbildung 2.2). Die Nukleinsäurebibliothek wird durch kombinatorische Chemie hergestellt und besteht aus 10^{14} - 10^{15} DNA oder RNA Molekülen, die eine Random-Region mit zufälliger Basenabfolge enthalten, welche auf beiden Seiten von

definierten Primersequenzen für die Amplifikation flankiert ist. Der erste Zyklus im SELEX Prozess wird durch Inkubation des Targets mit der Bibliothek initiiert. Das Zielmolekül kann dabei an Magnetpartikel, Affinitätsäulen oder Mikrotiterplatten immobilisiert sein oder frei in Lösung vorliegen. Die Trennung der ungebundenen DNA/RNA Moleküle von den an das Target gebundenen Sequenzen erfolgt bei nicht immobilisierten Targets durch Filtrationstechnik (z. B. Nitrocellulosefilter). Aber auch die Kapillarelektrophorese wird als eine effiziente Methode zur Abtrennung von bindenden Sequenzen in der Literatur vorgestellt [65]. Nach der Isolierung dieser Sequenzen erfolgt die Amplifikation mittels PCR (*polymerase chain reaction*). Der nächste Selektions-Amplifikations-Zyklus wird mit der nun verkleinerten Bibliothek durchgeführt. Mit jedem Zyklus wird die Stringenz der Selektion erhöht und die Konzentrationen von DNA/RNA und Target werden reduziert. Um die Spezifität des Aptamers zu erhöhen, werden Negativ-Selektionen durchgeführt, bei der Liganden entfernt werden, die unspezifisch an die feste Phase binden. Die *Counter-SELEX* ist eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Spezifität. Hierbei werden Aptamere abgetrennt, die an strukturelle Analoge des Targets binden. Nach Erreichen einer Affinitätsättigung (für die meisten Targets sind 8-15 Zyklen notwendig), wird die angereicherte Bibliothek kloniert und sequenziert. Einzelne Sequenzen werden durch Bindungsstudien mittels Fluoreszenz- oder Radioaktivitätsassays, Oberflächenplasmonresonanz oder Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie näher charakterisiert. Schließlich wird/werden Aptamer(e) mit höchsten Affinitäten und Spezifitäten in größerem Maßstab chemisch synthetisiert.

2.3.2 Charakteristika von Aptameren

Mehrere Vorteile von Aptameren machen ihre Nutzung in analytischen oder klinischen Applikationen vielversprechend. Zum einen können Aptamere auch gegen nicht immunogene und toxische Targets selektiert werden, da der SELEX-Prozess nicht auf der Induktion von tierischen Immunsystemen beruht, wie es bei der Antikörpergenerierung der Fall ist [66]. Zum anderen kann die SELEX so manipuliert werden, dass Aptamere gegen eine spezifische Region des Targets produziert werden; ein Aspekt, der manchmal mit Antikörpern nicht möglich ist. Außerdem kann die Selektion unter nicht physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, so dass Aptamere auch unter extremen Bedingungen aktiv sind (z. B. Anwesenheit von Lösemitteln, niedriger pH-Wert).

Die Kenntnis der kritischen Sequenz zur Targetbindung ermöglicht neben der Markierung mit Reporterproteinen wie Fluorophoren oder Enzymen auch die Immobilisierung, ohne die Affinität des Aptamers zu beeinflussen. Durch den Wiedererhalt der nativen Konformation nach Denaturierung können Aptamere für analytische Applikationen und Biosensoren regeneriert werden, indem der Aptamer-Target-Komplex z. B. durch Zusatz von chaotropen Mitteln gebrochen wird.

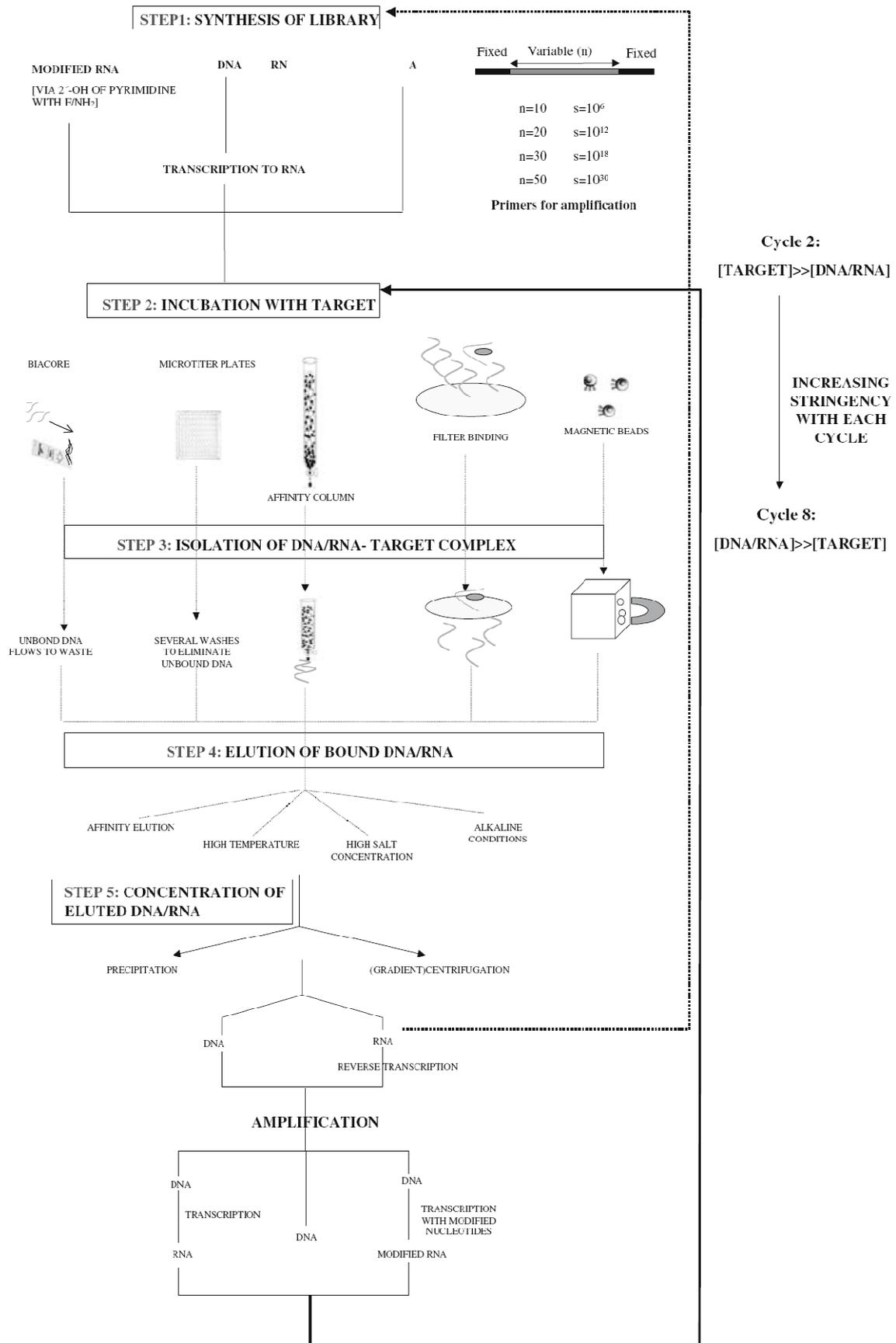


Abbildung 2.2 Durchgeführte Schritte im SELEX Prozess. Quelle: Mairal et al. (2008) [65].

Das Verständnis der Konformation und Bindungseigenschaften führte zum Einsatz von Nukleinsäuren in der Entwicklung von neuen analytischen Verfahren, die auf molekularer Erkennung basieren [67, 68]. Die Sekundärstruktur des Aptamers enthält neben den üblichen kanonischen Basenpaaren auch *Mismatch*- Paarungen und Triplets. Die Interaktion eines Aptamers mit seinem Target hängt eng mit der dreidimensionalen Faltung des Aptamers zusammen. Zwei Mechanismen werden für die Interaktion diskutiert: die adaptive Bindung und die Bindung nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip. Bei der adaptiven Bindung bildet das Oligonukleotid zwar auch in Abwesenheit des Zielmoleküls dreidimensionale Strukturelemente (Stämme und Loops), diese sind jedoch nicht in eine stabile 3D Konformation eingebunden und die eigentliche Struktur wird erst durch Initiation des Targets ausgebildet (*Induced Fit Mechanismus*) [69].

Nach dem zweiten Bindungsmodell nimmt das Aptamer bereits in Abwesenheit des Targets die zur Bindung erforderliche Faltung ein und tritt in einem Schlüssel-Schloss Prinzip mit dem Target in Wechselwirkung. Bei beiden Mechanismen erfolgt die Target-Bindung über van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen. In der Literatur wird auch über die Ionenabhängigkeit der Aptamer-Target-Bindung berichtet, wonach Kationen wie Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ oder K^+ die aktive Konformation des Aptamers stabilisieren [70, 71].

Aptamere zeigen ihren Targetmolekülen gegenüber mit K_d -Werten im picomolaren Bereich vergleichbare, wenn nicht bessere, Affinitäten wie monoklonale Antikörper. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass für Aptamere aufgrund ihrer kleinen Größe eine gesteigerte Sensitivität mit Techniken erwartet werden kann, bei denen das Signal der Affinitätsmessung mit zunehmender Nähe zur Messwandler-Oberfläche steigt (z. B. Elektrische Impedanz Spektroskopie, Oberflächenplasmonresonanz, Transmissionplasmonresonanz). Zusätzlich können Aptamere gerade bei sehr ähnlichen Strukturen Bindungsspezifitäten mit 10000 bis 12000facher Unterscheidung gegenüber den Targetmolekülen aufweisen, so wie im Falle des Theophyllin Aptamers, bei dem das Koffein-Molekül aufgrund des Vorhandenseins einer Methylgruppe von dem RNA Aptamer diskriminiert wird [72].

Ein Hauptproblem in der Anwendbarkeit von Nukleinsäuren ist die Anfälligkeit gegenüber Nukleasen, wobei DNA-Aptamere weniger anfällig sind als RNA-Moleküle. Die reaktive Hydroxylgruppe an der 2'-Position im Pentosering greift den benachbarten Phosphordiester zur Bindung eines zyklischen 2'-3'-Phosphats an, wodurch die Bindung zum nächsten Nukleotid gelöst wird. Diese Reaktion wird insbesondere durch endogene Ribonukleasen, die sich üblicherweise in biologischen Proben befinden, katalysiert. Um die Stabilität von RNA zu erhöhen, werden 2'-amino- oder 2'-fluoromodifizierte Aptamere verwendet [73]. Auch der Zusatz von Ribonukleaseinhibitoren kann die Degradierung von RNA-Liganden verhindern. Einen alternativen Ansatz zur Herstellung nukleaseresistenter Aptamere bieten die Spiegelmer. Spiegelmer sind synthetische spiegelbildliche RNA (L-RNA) oder DNA (L-DNA) Oligonukleotidliganden, die auf der nicht natürlichen enantiomeren Form L-Ribose beziehungsweise L-2'-Deoxyribose basieren. Sie binden spezifisch an das Zielmolekül, werden aber nicht von Ribonukleasen erkannt und somit auch nicht zersetzt. Bei dem SELEX-Prozess erfolgt die Selektion der D-Oligonukleotide gegen das synthetische

Enantiomer des Zielmoleküls. Das spiegelbildliche Aptamer zu der so selektierten Sequenz bindet dann an das eigentliche Zielmolekül.

2.3.3 Anwendung von Aptameren in der Affinitätschromatografie

Als Ersatz für die im Allgemeinen als Fänger- oder Detektionsmoleküle verwendete Antikörper wird in der Literatur zunehmend die Applikation von Aptameren beschrieben. Neben zunehmenden diagnostischen [74] und therapeutischen Applikationen [75-77] finden Aptamere in der Sensorik [78-81] und auf Microarrays [82, 83] sowie in der Protein Blot Analyse und in ELISA analogen Experimenten umfangreiche Anwendung [84-86].

Auch in der Affinitätschromatografie werden Aptamere eingesetzt. Durch diesen Einsatz können einige Nachteile, die mit herkömmlichen Immunoaffinitätsäulen verbunden sind, überwunden werden. Die Immobilisierung von Antikörpern an die Säule erfolgt meist nicht gleichmäßig, was eine Reduzierung der Bindungskapazität sowie ein *Leaching* des Antikörpers von der Säule zur Folge haben kann. Außerdem wird die Ligandendichte der Antikörper auf chromatografischen Oberflächen aufgrund der relativ hohen Größe (ca. 150 kDa) begrenzt. Zuletzt können die extremen Elutionsbedingungen wie pH, Detergenzien, organische Lösemittel oder chaotrope Salze zur Denaturierung des Antikörpers und womöglich auch des Targets (z. B. Protein) führen. Bei Aptameren werden dagegen milde Elutionsbedingungen und aufgrund der geringeren Größe (ca. 13-26 kDa bei 40-80 nt) höhere Ligandendichten erwartet. Zudem können Aptamere durch entsprechende Modifikation gezielt an stationäre Phasen immobilisiert werden [87].

Eine Übersicht über die Applikationen der Aptamere in der Affinitäts- und Elektrophoretografie geben Ravelet et al. (2006) [87], Mosing und Bowser (2007) [88] sowie Mairal et al. (2008) [65]. Es wird festgestellt, dass die Anwendung der Aptamere in der Chromatografie noch auf wenige Aptamere beschränkt ist (Tabelle 2.3). Drolet und Mitarbeiter [89] präsentierten 1999 die erste Arbeit bezüglich der Nutzung eines immobilisierten DNA Aptamers als stationäre Affinitätsphase. Ein Aptamer mit 36 Nukleotiden, einer hohen Spezifität und Affinität zum humanen L-Selektin wurde zur chromatografischen Aufreinigung des rekombinanten L-Selektin-Ig Fusionsproteins aus einem CHO Kulturüberstand eingesetzt. Die 5'-biotinylierte anti-L-Selektin DNA wurde an eine Streptavin Sepharose Matrix immobilisiert, die zu einer kurzen Säule gepackt wurde. Nach dem Beladen der Säule wurde das Protein unter nicht denaturierenden Bedingungen eluiert: Die zur Bildung der Tertiärstruktur und somit zur Bindung des Targets notwendigen divalenten Kationen wurden durch einen linearen EDTA Gradienten entfernt. Die Applikation der Aptamersäule als ersten Aufreinigungsschritt resultierte in einer 1500-fachen Aufreinigung mit einer Wiederfindung von 83 % und bewies die Effektivität von Aptameren als Affinitätsreagenzien. Die Arbeitsgruppe um Peyrin nutzte in verschiedenen Arbeiten die chiralen Diskriminierungseigenschaften von Aptameren zur Enantiomerentrennung aus [90, 91]. Hierzu wurden Aptamere gegen D-Vasopressin, D-Adenosin und L-Tyrosinamid entwickelt und durch eine Biotin-Streptavidin-Interaktion an eine hochporöse Matrix aus

Polystyroldivinylbenzol immobilisiert. Anschließend wurde der Einfluss verschiedener Parameter (Säulentemperatur, pH und Salzkonzentration) auf die Enantioselektivität untersucht, wobei Informationen über den Bindungsmechanismus von Aptameren erhalten wurden. Peyrin und Mitarbeiter konnten auch die Stabilität von Spiegelmeren am Beispiel des L-RNA Aptamers gegen Tyrosin und am anti-D-Histidin L-RNA Aptamer erfolgreich demonstrieren [92, 93]. Die Gruppe um McGown setzte Aptamere, die ein G-Quartett-Motiv bilden, als stationäre Phasen für nicht-Target spezifische Kapillarelektrophorese ein, wobei das 5'-Thiol modifizierte Aptamer kovalent an die innere Oberfläche der Quarzglas Kapillare gebunden wurde. Diese Phasen wurden zur Separation von Enantiomeren, Aminosäuren, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und Dipeptiden verwendet [94-98]. Als Modellsystem zur Untersuchung der Aptamer-basierten Proteinisolation in der Kapillarchromatografie verwendete die Arbeitsgruppe das Thrombin bindende DNA Aptamer [99]. Deng et al. (2001) separierten eine Gruppe von strukturell ähnlichen kleinen Molekülen unter Einsatz von Adenosin und ATP bindenden Aptameren als Liganden in einer gepackten Kapillarchromatografie Säule. Die unterschiedlichen Affinitäten des immobilisierten Aptamers für cyclic-AMP, NAD⁺, AMP, ADP und ATP ermöglichte die Separation der einzelnen Analyten aus einer komplexen Mischung [100]. Murphy et al. (2003) setzten als Matrix Magnetpartikel zur Immobilisierung des Aptamers gegen Thyroid Transcription Factor 1 (TTF1) ein. Die Aptameraffinitätschromatografie wurde in einem einzigen Aufreinigungsschritt aus bakteriellem Zelllysate durchgeführt. Die Elution von TTF1 von der Säule wurde unter DNase Behandlung bewirkt [101]. Über eine einfache Elutionsstrategie, die auf der fotolytischen Methode basiert, wurde die Detektion von Hepatitis C Virus RNA Polymerase und Replikase aus einer Proteinmischung erzielt. Das RNA Aptamer wurde unter Verwendung eines F-moc fotospaltbaren Linkers an Microbeads immobilisiert und in ein Mikrofluidchip, die aus transparenten Mikrokanälen besteht, eingeführt. Die Proteinmischung wurde in die Mikrokammer injiziert und nach einer Inkubation von 5 bis 30 min wurde das gebundene Protein durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 360 nm von der Säule gelöst und mit der mobilen Phase herausgepumpt [102, 103]. Sowohl bei der Elution durch DNase Behandlung als auch bei der fotolytischen Elution ist die Aptamermatrix nicht regenerierbar. Zuletzt wurde von Öktem et al. (2007) die Aufreinigung von *Thermus aquaticus* DNA Polymerase aus *E. coli* Zelllysaten unter Verwendung eines DNA-Aptamers, das kovalent an Magnetpartikel immobilisiert wurde, vorgestellt [104].

Wie diese Anwendungsbeispiele zeigen, können Aptamere aufgrund der hohen Affinitäts- und Spezifitätseigenschaften als neuartige Liganden in Separation, Aufreinigung und Quantifizierung von Analyten in Chromatografie, Elektrochromatografie und Kapillarelektrophorese Techniken agieren.

Tabelle 2.3 Übersicht über publizierte Aptamerliganden in der Chromatografie und Elektrochromatografie.

Targets/Spezies	Aptamer	Matrix	Immobilisierung	Literatur
L-Selektin	DNA	Azlacton aktiviertes Polyacrylamid	Biotin-Streptavidin	[89]
D-Vasopressin	DNA	hochporöses Polystyrol-divinylbenzol	Biotin-Streptavidin	[90]
D-Adenosin und L-Tyrosinamid	DNA	hochporöses Polystyrol-divinylbenzol	Biotin-Streptavidin	[91]
Tyrosin	L-RNA	hochporöses Polystyrol-divinylbenzol	Biotin-Streptavidin	[92]
D-Histidin	L-RNA	hochporöses Polystyrol-divinylbenzol	Biotin-Streptavidin	[93]
Nicht-Target spezifisch	G-Quartett DNA	Quarzglas Kapillare	kovalent	[94-98]
Thrombin	DNA	Quarzglas Kapillare	kovalent	[99]
Adenosin und Analoga	DNA	hochporöses Polystyrol-divinylbenzol	Biotin-Streptavidin	[100]
Thyroid Transcription Factor 1	DNA	Magnetpartikel	Biotin-Streptavidin	[101]
HCV RNA Polymerase und Replikase	RNA	Microbeads	F-moc <i>photocleavable</i> Linker	[102, 103]
<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase	DNA	Magnetpartikel	kovalent	[104]

3 Membranchromatografie: Materialien und Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Membranadsorbereinheiten vorgestellt, sowie die zur Proteinaufreinigung verwendeten Protokolle wiedergegeben und zur Charakterisierung von Membranadsorbereinheiten eingesetzten Methoden geschildert.

3.1 Membranadsorbereinheiten

Die Membranadsorbereinheiten wurden von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen zur Verfügung gestellt. Für Arbeiten im Mikrolitermaßstab wurden die *Vivapure mini spin columns* und *Vivawell 8-strips* eingesetzt (Abbildung 3.1, links). Die *spin columns* sind so entwickelt, dass die Adsorbereinheiten in Eppendorfhütchen überführt werden können, wodurch die einzelnen Aufreinigungsschritte dann einfach in der Zentrifuge erfolgen. Die *8-strips* bestehen aus 8 nebeneinander angeordneten Einheiten und werden über einen Lochrahmen mit 96-well Platten kombiniert. Somit können Proteingemische auf den *8-strips* in einer Zentrifuge oder in einem Überdruckmodul getrennt werden. Eine Trennung mit Hilfe von Unterdruck ist ebenfalls möglich.



Abbildung 3.1 Links: *Vivapure spin columns* und *8-strip*. Rechts: *Sartobind MA units*.

Als ersten Schritt im *Up-scale*-Prozess kommen die *Sartobind MA units* zum Einsatz. Die Einheiten sind als Spritzenvorsätze konzipiert, können aber ebenso an Chromatografieanlagen angeschlossen werden, wobei mehrere Einheiten hintereinander geschaltet werden können (Abbildung 3.1, rechts).

Alle drei Einheiten werden mit einer unterschiedlichen Anzahl von Membranlagen angeboten. Die Matrix der 230 - 320 μm dicken Membranen besteht aus stabilisierter regenerierter Cellulose mit einer mittleren Porengröße von 3 - 5 μm . In Tabelle 3.1 sind einige technische Daten der in dieser Arbeit getesteten Einheiten zusammengefasst. Zur Untersuchung der *Up-*

scale Möglichkeit von den Mikrolitereinheiten in den Labormaßstab wurden drei verschiedene Membranfunktionalitäten verwendet (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.1 Technische Daten der untersuchten Membranadsorbereinheiten nach Herstellerangaben.

	<i>Vivawell 8-strips</i> (pro well)		<i>Vivapure mini spin columns</i>	<i>Sartobind MA 75</i>	
Membranlagen	5	15	5	15	15
Membranfläche [cm ²]	1,6	4,8	1,87	5,61	75
Bettvolumen [µL]	-	-	60	180	2100
Max. Durchsatzvolumen [µL]	300	300	500	500	-

Tabelle 3.2 Verwendete Membranfunktionalitäten.

Funktionelle Gruppe	Bezeichnung	Anwendung
R-CH ₂ -Na ⁺ -(CH ₂) ₂ Cl ⁻	Quaternäres Ammonium (Q)	starker Anionenaustauscher
R-CH ₂ -SO ₃ ⁻ Na ⁺	Sulfonsäure (S)	starker Kationenaustauscher
HOOC - CH ₂ - NH - CH ₂ - COOH	Iminodiessigsäure (IDA)	Metallchelatchromatografie

3.2 Protokolle zur Proteinaufreinigung

Die optimalen Aufreinigungsbedingungen wurden unter Verwendung von *spin columns* und *8-strips* ermittelt und dann auf die *Sartobind MA 75*-Einheiten übertragen. Alle Puffer und Proteinlösungen wurden vor der Aufgabe auf die Membranen filtriert (0,2 µm) und entgast.

Ionenaustauscher *spin columns* und *8-strips* (Scouting Protokoll)

Zur Trennung von Proteinen über Ionenaustauscher wurde das Proteingemisch parallel auf Q- und S-Membranen bei verschiedenen pH-Werten gegeben. Die Membranen wurden jeweils mit 300 µL bzw. 500 µL Flüssigkeit beladen. Bei jedem Schritt wurde für 5 min bei 500 g (5-lagige Einheiten) oder 1500 g (15-lagige Einheiten) zentrifugiert.

Verwendete Puffer:

Bindungspuffer: 25 mM Na-Acetat; pH 4,5

25 mM KPP; pH 6,0

25 mM Tris/HCl; pH 7,5

25 mM NaHCO₃; pH 9,0

Elutionspuffer: wie Bindungspuffer; zusätzlich 300, 600, 900 und 1500 mM NaCl

- Die *8-strips* wurden über Halterahmen auf eine 96-well Deep Well Platte und die *spin columns* in 2,2 mL Eppendorfhütchen positioniert und mit den entsprechenden Bindungspuffern äquilibriert.
- Zur Probenaufgabe wurde das Proteingemisch mit jedem der Bindungspuffer verdünnt, so dass der jeweilige pH-Wert in den Proben eingestellt wurde und auf die Membranen aufgetragen.
- Nach dem dreimaligen Waschen mit Bindungspuffer wurden die gebundenen Proteine mit steigendem Salzgehalt im jeweiligen Elutionspuffer eluiert.

Sartobind Ion Exchange Q 75 bzw. S 75

Nach Bestimmung der optimalen Bindungs- und Elutionsbedingungen mittels *spin columns* und *8-strips* wurden die Proteine über Q 75 bzw. S 75 Einheiten aufgereinigt. Die Proteinadsorption –und Elution wurde an einer Chromatografieanlage durchgeführt und durch Messung der Leitfähigkeit und des UV-Signals bei 280 nm verfolgt.

Durchführung:

- Zunächst wurde die entsprechende MA 75 Einheit mit Bindungspuffer bis zu einer konstanten Basislinie äquilibriert.
- Die Membran wurde mit einer Flussrate von 1-10 mL/min mit der Proteinlösung bis zum Durchbruch bzw. bis zum vollständigen Durchbruch beladen.
- Mit Bindungspuffer wurde dann bis zum proteinfreien Durchfluss gewaschen.
- Zur Elution des gebundenen Proteins wurde schließlich der Elutionspuffer aufgetragen.

Regeneration der Membran und Lagerung: Zur Regeneration wurde die Membran nach der Elution mit Bindungspuffer äquilibriert und mit 0,2 M NaOH behandelt. Nach wiederholtem Waschen mit Bindungspuffer wurde die Einheit in 1 M KCl in 20 % Ethanol gelagert.

Proteinaufreinigung über *IDA spin columns* und *8-strips*

Bei der Proteinisolierung über IDA-Membranen wurden verschiedene Metallionen auf ihre Eignung zur Reinigung und Wiederfindung des zu analysierenden His-Tag Proteins getestet. Es wurden jeweils 300 bzw. 500 μL Flüssigkeit aufgegeben. Die Zentrifugationen wurden bei 1500 g durchgeführt.

Eingesetzte Puffer:

Äquilibrierungspuffer: 0,1 M Natriumacetat, 500 mM NaCl, pH 4,5

Bindungspuffer: 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0 oder 0,1 M Imidazol in Äquilibrierungspuffer

I. Beladen der Membran mit Metall-Ionen

Verwendete Metallsalz-Lösungen:

Ni^{2+} : 0,1 M Nickelsulfat ($\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) in Äquilibrierungspuffer

Co^{2+} : 0,1 M Cobaltchlorid ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) in Äquilibrierungspuffer

Cu^{2+} : 0,1 M Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) in Äquilibrierungspuffer

Zn^{2+} : 0,1 M Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) in Äquilibrierungspuffer

- Die Membranen wurden mit Äquilibrierungspuffer 1 min zentrifugiert.
- Zum Beladen der Metallionen wurden die Salz-Lösungen auf die Membranen aufgetragen und für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt.
- Anschließend wurden die Membranen zweimal mit Äquilibrierungspuffer gewaschen und 1 min zentrifugiert.

II. Aufreinigung des His-Tag Proteins

- Hierzu wurden die mit Metallionen beladenen Membranen zunächst zweimal mit Bindungspuffer äquilibriert, Zentrifugation für 1 min.
- Die Proteinlösung in Bindungspuffer wurde auf die Membranen verteilt und für 3 min zentrifugiert.
- Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde drei Mal mit Bindungspuffer gewaschen (Zentrifugation 3 min).
- Das Protein wurde mit dem Elutionspuffer in drei Fraktionen eluiert (Zentrifugation 3 min).

Sartobind IDA 75

Die Aufreinigung von His-Tag Proteinen wurde nach Bestimmung des optimalen Metallions mittels *8-strips* über IDA 75 Einheit durchgeführt. Hierzu wurde die Einheit wie bei den Ionenaustauschern an die FPLC angeschlossen. Es wurden dieselben Puffer wie bei den Mikrolitereinheiten verwendet.

Versuchsdurchführung:

I. Beladen der Membran mit Metall-Ionen

- Zunächst wurde der Adsorber mit dem Natriumacetatpuffer äquilibriert.
- Zur Metallchelate-Komplexbildung wurde mit 10 mL Metalllösung beladen und mit Äquilibrierungspuffer gewaschen (20 mL).

II. Aufreinigung des His-Tag Proteins

- Auf die so vorbereitete Membran wurde nach Äquilibrieren mit 10 mL Bindungspuffer die Proteinlösung aufgetragen.
- Bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie wurde dann mit Bindungspuffer gewaschen.
- Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit imidazolhaltigem Puffer eluiert.

Regeneration der Membran und Lagerung: Nach dem Elutionsschritt wurde die Membran mit Äquilibrierungspuffer gewaschen. Um die Metallionen zu lösen, wurde durch die Einheit 1 M H₂SO₄ durchlaufen lassen. Nach erneutem Waschen bis zum Erreichen des pH-Wertes vom Natriumacetat-Puffer, wurde die Membran in dem Acetatpuffer mit 0,02 % Natriumazid gelagert.

3.3 Visualisierung der Adsorptionsverteilung auf den Membranen

Coomassie Brilliant Blau R-350 bindet an bestimmte Aminosäuren der Proteine. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0,1-0,2 µg Protein pro Bande und wurde deshalb zur Visualisierung der Proteinadsorptionsverteilung auf den Ionenaustauschermembranen verwendet. Hierzu wurden die Kationenaustauscher-Einheiten *S 75*, *8-strips* und *spin columns* mit 1-10 mg/mL Lysozym in KPP, pH 7,5 folgendermaßen beladen:

- Ansatz 1: Beladen der Einheit bis zum Durchbruch ($C / C_0 < 10 \%$), ohne Elution.
- Ansatz 2: Beladen der Einheit bis zum Durchbruch, anschließende Elution mit 2 M NaCl.
- Ansatz 3: Beladen der Einheit bis zum vollständigen Durchbruch ($C / C_0 > 90 \%$), ohne Elution.
- Ansatz 3: Beladen der Einheit bis zum vollständigen Durchbruch, anschließende Elution mit 2 M NaCl.

Zur Färbung wurden die Membranen aus den Einheiten entnommen und einzeln gefärbt:

- Zur Vorbereitung der Färbelösung wurde eine PhastGel Blue R Tablette (17-0518-01, Pharmacia Biotech) in 80 mL ddH₂O gelöst und mit 120 mL MeOH versetzt. Anschließend wurde die Lösung filtriert.
- Die Membranen wurden unter Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur in der Coomassie-Lösung inkubiert.
- Die Entfärberlösung wurde aus 30 % EtOH, 10 % Essigsäure und 60 % ddH₂O hergestellt.
- Die Membranen wurden nun in der Entfärberlösung so lange geschüttelt, bis die Kontroll-Membran (ohne Protein) vollständig entfärbt wurde.
- Zum Stoppen der Entfärbung wurden die Membranen in ddH₂O gelagert.

3.4 Aufnahme von Bindungsisothermen

Zum Vergleich der Membranadsorbereinheiten wurden für Ionenaustauschermembranen die maximalen Bindungskapazitäten und Dissoziationskonstanten anhand von Bindungsisothermen bestimmt.

Verwendete Puffer: Bindungspuffer: 25 mM KPP, pH 7,5

Elutionspuffer: 25 mM KPP + 2 M NaCl, pH 7,5

Hierbei wurden die Q-Membranen mit unterschiedlichen Konzentrationen an BSA-Lösung und die S-Membranen mit unterschiedlichen Lysozym-Konzentrationen bis zum vollständigen Durchbruch ($C/C_0 > 90\%$) bei konstantem Volumenstrom beladen. Aus den Elutionen wurden die maximal gebundenen Proteinmengen ermittelt und gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen. Die jeweilige maximale Bindungskapazität und die Dissoziationskonstante wurden anhand der Langmuir-Isotherme berechnet:

$$\frac{dq}{dt} = k_a C (q_m - q) - k_d q \quad (3.1)$$

Der Ansatz geht davon aus, dass die Adsorptionsrate des Analyten proportional zu ihrer Konzentration C in der mobilen Phase, einer Geschwindigkeitskonstante k_a und der Zahl der auf der Oberfläche verfügbaren freien Bindungsplätze ($q_m - q$) ist. Dabei steht q_m für die maximal verfügbaren Bindungsplätze. Die Desorption ist der Anzahl der belegten Bindungsplätze und einer Geschwindigkeitskonstante k_d proportional [118].

Im Gleichgewichtszustand gilt:

$$q = \frac{q_m C}{K_{Diss} + C} \quad \text{mit } K_{Diss} = \frac{k_d}{k_a} \quad (3.2)$$

Aus der linearisierten Form der Gleichung 3.2 können bei Auftragung von $1/q$ gegen $1/C$ die Dissoziationskonstante K_{Diss} aus der Steigung und die maximale Bindungskapazität q_m aus der Ordinate berechnet werden.

3.5 Bereitstellung von hGH-Überständen und hGH-ELISA

Die *Scale-up* Möglichkeit der Ionenaustauscher Membranen wurde am Beispiel der Aufreinigung von *Human growth hormone* (hGH, Somatotropin) aus Kulturüberständen untersucht.

Die Kultivierungen der rekombinanten Zelllinie CHO^{SFS} hGH (*Chinese hamster ovary*) wurden von Fabienne Anton im Rahmen ihrer Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie durchgeführt [119]. Die an serumfreies Medium adaptierte Suspensionszelllinie zeigt eine Methotrexat (MTX)-Resistenz. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt ca. 24 h. Die CHOSFS hGH-Zellen wurden in dem proteinarmen Medium ProCHO 4-CDM (Cambrex) kultiviert, welches 10 µg/mL Insulin enthält und vor dem Gebrauch mit 4 mmol L-Glutamin, 0,1 µmol MTX und Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin) versetzt wurde. Weitere Kulturüberstände wurden freundlicherweise von der Firma Cell Culture Service GmbH, Hamburg zur Verfügung gestellt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Überständen und Proteinfractionen wurde ein hGH-ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) durchgeführt. Hierfür wurde ein Kit der Firma Roche (1 585 876) verwendet.

3.6 Produktion von His-Tag Proteinen

Zur Testung der IDA-Membranen wurden His-Tag Proteine aus Kulturüberständen bzw. Zelllysaten aufgereinigt. In Tabelle 3.3 sind die verwendeten Proteine zusammengestellt. Der *E. coli* Stamm zur Produktion von Bgl-His wurde freundlicherweise von PD Dr. Karl Friehs, Technische Fakultät, AG Fermentationstechnik, Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt. Die Plasmide zur Expression der His-getaggten Esterasen wurden von Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Abt. Biotechnologie & Enzymkatalyse, Institut für Biochemie, Universität Greifswald zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.3 Verwendete His-Tag Proteine [120].

Protein	Kurzbezeichnung	MW [Da]	pI	produzierender Stamm
β-Glucanase	Bgl-His	26700	6,1	<i>E. coli</i> JM109 pET-bgl-his
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase I	PFEI	31059	5,91	<i>E. coli</i> K12 pJOE2702
<i>Bacillus subtilis</i> p-Nitrobenzylesterase	pNBE	54965	4,86	<i>E. coli</i> K12 pJOE2702
<i>Bacillus subtilis</i> Esterase	BsubE	29378	5,50	<i>E. coli</i> K12 pJOE2702
<i>Bacillus stearothermophilus</i> Esterase	Bste	29341	5,23	<i>E. coli</i> K12 pJOE2702

Transformation

Zur Produktion der Esterasen wurden die erhaltenen Plasmide in den *E. coli* Sicherheitsstamm K12 transformiert. Hierzu wurde wie folgt verfahren:

Materialien und Puffer:

LB-Kulturmedium: 10 g/L Bacto Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl

Agarplatten: LB + 15 g/L Agar

Antibiotikum: 100 mg/L Ampicillin (Amp)

TSS (*Transformation and storage solution*): 10 % PEG 6000 (w/v), 5 % DMSO (v/v), 35 mM MgCl₂ in LB-Medium, pH 6,5-6,8

- Herstellung kompetenter Zellen: 50 mL LB-Medium wurden mit 500 µL einer K12-Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm und 4 °C geerntet. Das Pellet wurde in 2 mL eiskaltem TSS resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte direkt die Transformation.
- Transformation: 50 µL kompetente Zellen wurden mit 5 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis gestellt. Nach Hitzeschock-Behandlung bei 42 °C für 45 s wurde erneut für 5 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden zu den Zellen 200 µL LB-Medium gegeben und bei 37 °C unter Schütteln für 1 h inkubiert. Zur Selektion der transformierten Zellen wurden 100 µL der Kultur auf LB/Amp Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.
- Anlegen von Gefrierkulturen: Einzelne Kolonien auf den Agarplatten wurden in LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden mit 200 µL Kultur + 800 µL Glycerin (87 %) Gefrierkulturen angelegt. Diese wurden bei -80 °C gelagert.

Expression

- Alle Kultivierungen wurden in LB/Amp-Medium durchgeführt. Zur Sterilisation wurde das LB-Medium in einem Wasserdampf-Hochdruckautoklaven für 20 min bei 121 °C und 1.013 x 10⁵ Pa Überdruck autoklaviert. Das Ampicillin wurde steril filtriert dem autoklavierten Medium mit einer Endkonzentration von 100 mg/L zugegeben.
- Aus den Gefrierkulturen wurden Übernachtskulturen angesetzt.
- Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur angeimpft (1 mL auf 100 mL).
- Die Kultivierungen wurden bei 30 °C und 120 rpm durchgeführt. Das Wachstum wurde unter Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt.

- Bei einer OD_{600} von 0,5 wurde zur Expression von Bgl-His die Kultur mit IPTG versetzt (Endkonzentration 1 mM). Die Induktion der Esterasen erfolgte mit 0,2 % L-Rhamnose.
- 4 h nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation für 30 min bei 3345 g und 4 °C geerntet. Da das Bgl-His sowohl intra- als auch extrazellulär exprimiert wird, wurde hier auch der Kulturüberstand zur Proteinaufreinigung verwendet.
- Die Pellets wurden im IDA-Bindungspuffer aufgenommen (10 mL/g Zellen) und mit Ultraschall unter Eiskühlung aufgeschlossen (90 W, 10 min, 0,6 s Pulsdauer). Nach Zentrifugation für 30 min bei 3345 g und 4 °C wurden die Lysate steril filtriert.

Aktivitätsbestimmung von Esterasen mittels *p*-Nitrophenylacetat

Zur schnellen Bestimmung der Aktivität von Esteraseproben wurde ein fotometrischer Assay verwendet, der auf der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat durch die Esterasen basiert. Dabei wird *p*-Nitrophenolat ($\epsilon_{410\text{nm}, \text{pH}7,5} = 14500$) freigesetzt, das fotometrisch durch Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm detektiert wird [120].

Durchführung:

- In einer 1 mL Mikroküvette wurden 100 μL *p*-Nitrophenylacetat-Lösung (10 mM in DMSO) vorgelegt.
- Zu untersuchende Esteraseprobe wurde mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,5 soweit verdünnt, bis die Absorption der Lösung unter 1 AU lag.
- Auf die *p*-Nitrophenylacetat-Lösung wurden 900 μL Probe aufgetragen und durch hin- und herpipettieren gut durchmischt.
- Anschließend wurde die kinetische Messung gegen Phosphatpuffer als Referenzzelle gestartet (Absorptionsmessung im 10 s-Intervall über 3 min bei 410 nm).

4 Membranchromatografie: Experimenteller Teil

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Membranadsorbersystemen für den Einsatz im *Downstream Processing*. Hierbei sollten integrierte Systeme zur Entwicklung einer optimalen Proteinaufreinigungsstrategie im Mikrolitermaßstab untersucht werden. Dabei wurde eine möglichst umfassende Beschreibung der Dynamik von Stofftransport und Adsorption in der Membranchromatografie angestrebt, indem das Bindungs- und Durchbruchverhalten, die Bindungskapazitäten sowie die *Scale-up*-Fähigkeit verschiedener Membranadsorber (Ionenaustauscher, Affinitätsmembranen) durch die Verwendung eines modularen Kartuschensystems bestimmt wurden.

Um verschiedene Targetproteine zu untersuchen und eine effiziente Strategie für deren schnelle und direkte Separation und Aufreinigung zu erarbeiten, wurde ein Baukastensystem auf Basis der Membranadsorbertechnologie entwickelt. Das Konzept dieses *High-Throughput Downstream Screening Systems* (HTDSS) ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

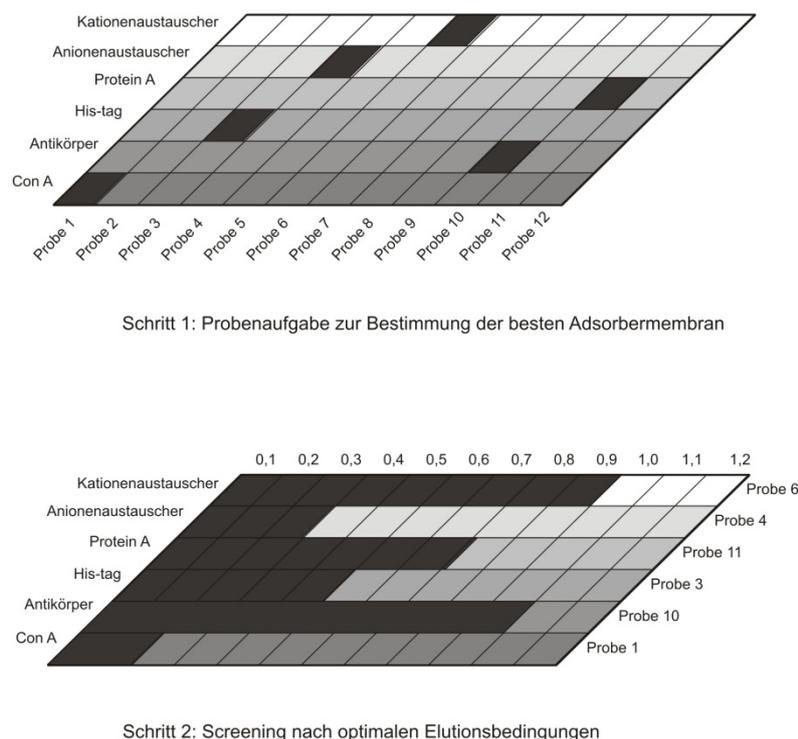


Abbildung 4.1 Modulares Konzept für ein Screening Experiment [105].

Im ersten Schritt werden die zu untersuchenden Proben zur Bestimmung des für das jeweilige Protein optimalen Membranadsorbers auf jeden Membrantyp aufgetragen. Beispielsweise bindet das Protein in Probe 6 an den Kationenaustauscher, während das Protein in Probe 3 von der Metallchelatomembran zurückgehalten wird. Im zweiten Schritt kann dann nach

optimalen Elutionsbedingungen gescreent werden. Zur Verwirklichung dieses Konzeptes wurden die von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, hergestellten 8-er Streifen (vgl. Abschnitt 3.1) verwendet.

4.1 Ionenaustauscher-Membranen

Im Rahmen ihrer im Institut für Technische Chemie, Universität Hannover durchgeführten Dissertationen optimierten Thorsten Weiß und Kerstin Plate das Isolierungsverfahren von Lactoferrin aus Molke über unterschiedliche Membrantechniken [122, 123]. In dem Verfahren kamen unter anderem auch Kationenaustauschermembranen zum Einsatz, an denen Lactoferrin gebunden und von restlichen Molkeproteinen getrennt wurde. Dabei konnte eine Maßstabvergrößerung von 100 cm^2 auf 4 m^2 Membranfläche durchgeführt werden. In dieser Arbeit soll nun anhand der von der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH zur Verfügung gestellten Membranmodule (siehe Kapitel 3.1.1) gezeigt werden, ob eine Übertragung vom Mikrolitermaßstab (*Vivawell 8-strips*, *Vivapure mini spin columns*) in den Labormaßstab (*Sartobind MA units*) und folglich auf den Technikmaßstab möglich ist. Da die wiederverwendbaren *Sartobind MA* Einheiten mit 75 cm^2 und 15 Membranlagen die selbe Anzahl an Lagen wie im *Sartobind Large Scale System* aufweisen und somit die *Scale-down* Einheit im *Up-scale* Prozess darstellen, wird eine Übertragung von *8-strips* und *spin columns* auf das MA 75 Modul überprüft.

Zunächst werden die Einheiten näher charakterisiert, indem starke Anionen- und Kationenaustauscher Membranen mit unterschiedlicher Anzahl an Membranlagen unter Verwendung von Standardproteinen beladen werden. Dabei wird neben der Bestimmung der gebundenen Menge auch die Verteilung der Proteine auf den Membranen untersucht. Die Kapazität der Membranen wird zum Zeitpunkt des 10 %igen Durchbruchs (C/C_0) bestimmt, da diese Bedingungen üblicherweise gewählt werden, um den Verlust des Produktes während der Aufreinigung zu minimieren. Daneben wird die maximale Bindungskapazität der Membranen $> 90 \%$ Durchbruch ermittelt. Nach Aufnahme von Bindungsisothermen wird das *Up-scaling* anschließend am Beispiel der Aufreinigung von hGH aus Kulturüberstand demonstriert.

4.1.1 Charakterisierung der Ionenaustauscher

Als funktionelle Gruppen befinden sich auf den Membranen quaternäres Ammonium (Q) für starke Anionenaustauscher und Sulfonsäure (S) für starke Kationenaustauscher. Um das Bindungs- und Elutionsverhalten der Ionenaustauscher zu erforschen, wurden BSA und Lysozym als Modellproteine verwendet und nach den in Kapitel 3.2 vorgestellten Protokollen beladen.

8-strips

Zuerst wurde der Einfluss der Anzahl an Membranlagen auf die Bindung und Elution von 8-strips untersucht. Hierzu wurden 1 mg/mL BSA bzw. Lysozym in 25 mM KPP, pH 7,5 auf die 5- und 15-lagigen Anionen- bzw. Kationenaustauscher Module aufgetragen.

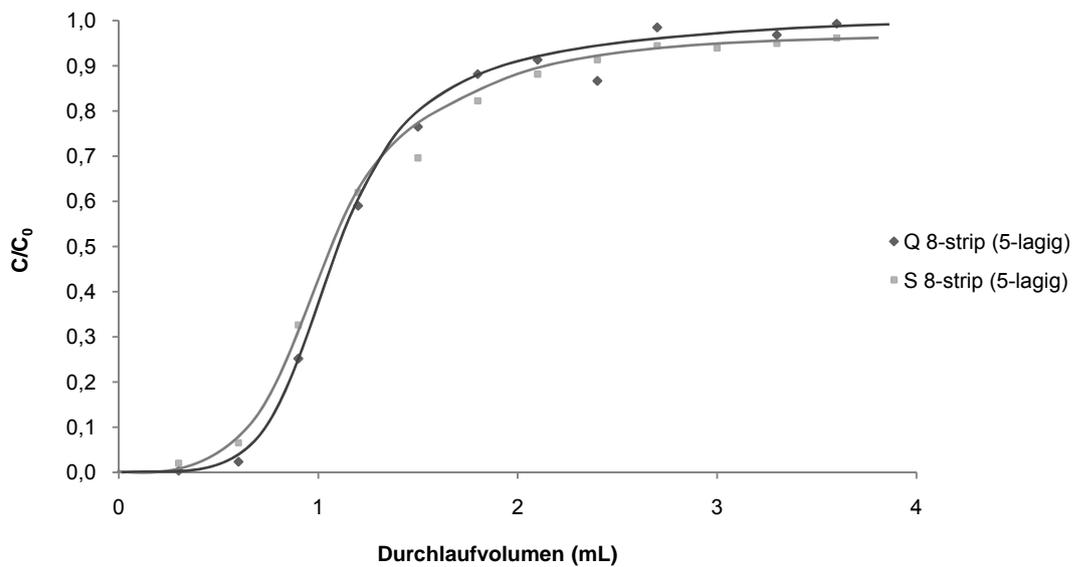


Abbildung 4.2 Durchbruchkurven der 5-lagigen Ionenaustauscher 8-strips. Die Q- und S-Membranen wurden mit 1 mg/mL BSA bzw. Lysozym beladen (12 x 300 μ L). Es sind jeweils der Mittelwert von 8 wells angegeben.

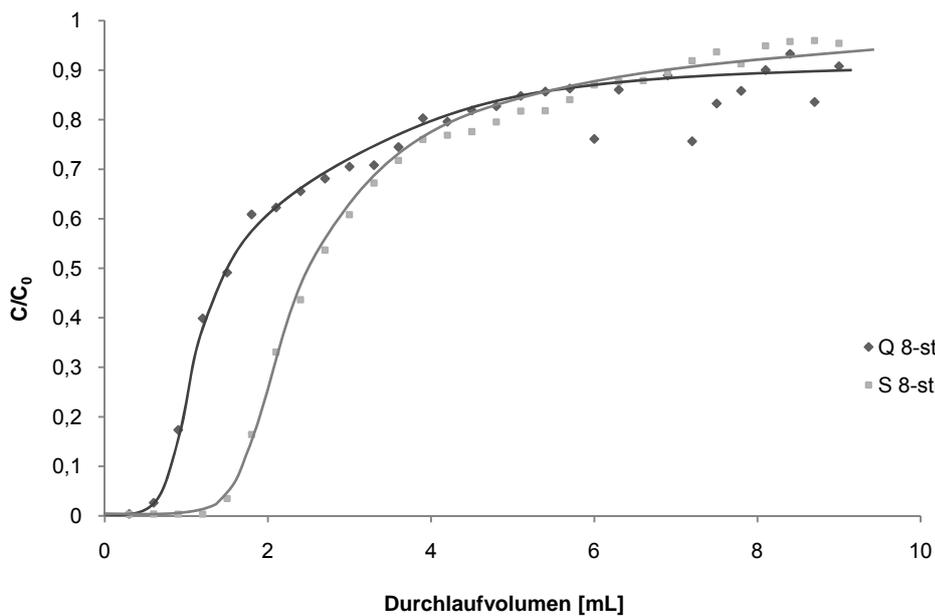


Abbildung 4.3 Durchbruchkurven der 15-lagigen Ionenaustauscher 8-strips. Die Q- und S-Membranen wurden mit 1 mg/mL BSA bzw. Lysozym beladen (30 x 300 μ L). Es sind jeweils der Mittelwert von 8 wells angegeben.

Der Vergleich der Durchbruchkurven (Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3) zeigt, dass bei 5-lagigen *8-strips* sich die beiden Ionenaustauscher ähnlich verhalten, während bei 15-lagigen Einheiten der Durchbruch mit Lysozym erst bei höheren Auftragsvolumina eintritt. Außerdem wird bei diesen Einheiten auch ein asymmetrisches Durchbruchverhalten festgestellt, was auf eine zunehmend durch Diffusion kontrollierte Bindung hindeutet. Dies würde auch die geringere Bindungskapazität bei den 15-lagigen Q *8-strips* gegenüber den S-Membranen erklären. Da das Lysozym (14 kDa) um etwa 1/5 kleiner ist als das BSA (66 kDa) diffundiert es vermutlich innerhalb der Membranschicht und wird besser adsorbiert. Betrachtet man die Durchlaufkurven bei 0,5 mg/mL Proteinlösung (Abbildung 4.4) wird der Unterschied zwischen den beiden Proteinen deutlicher.

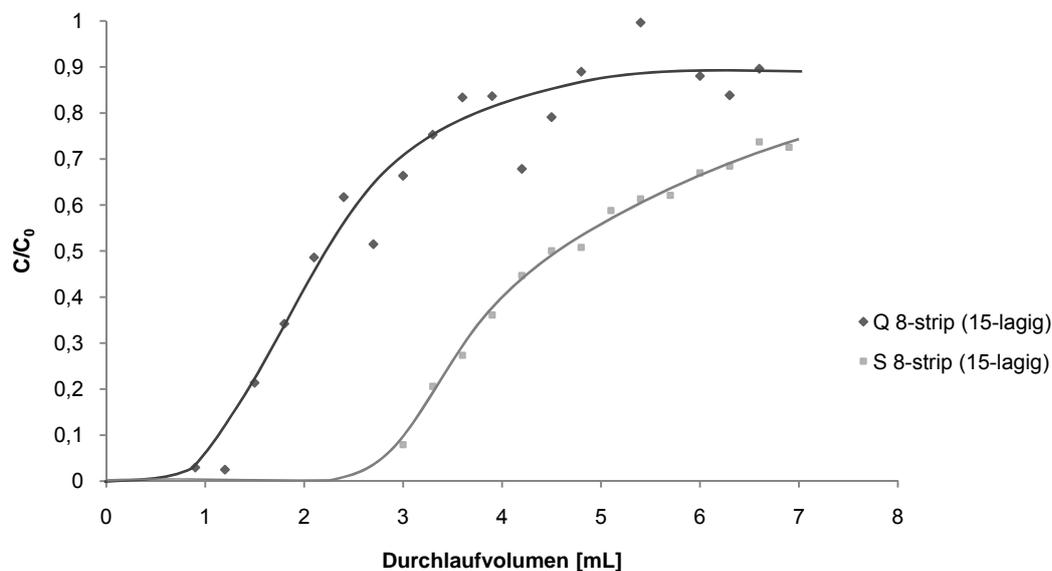
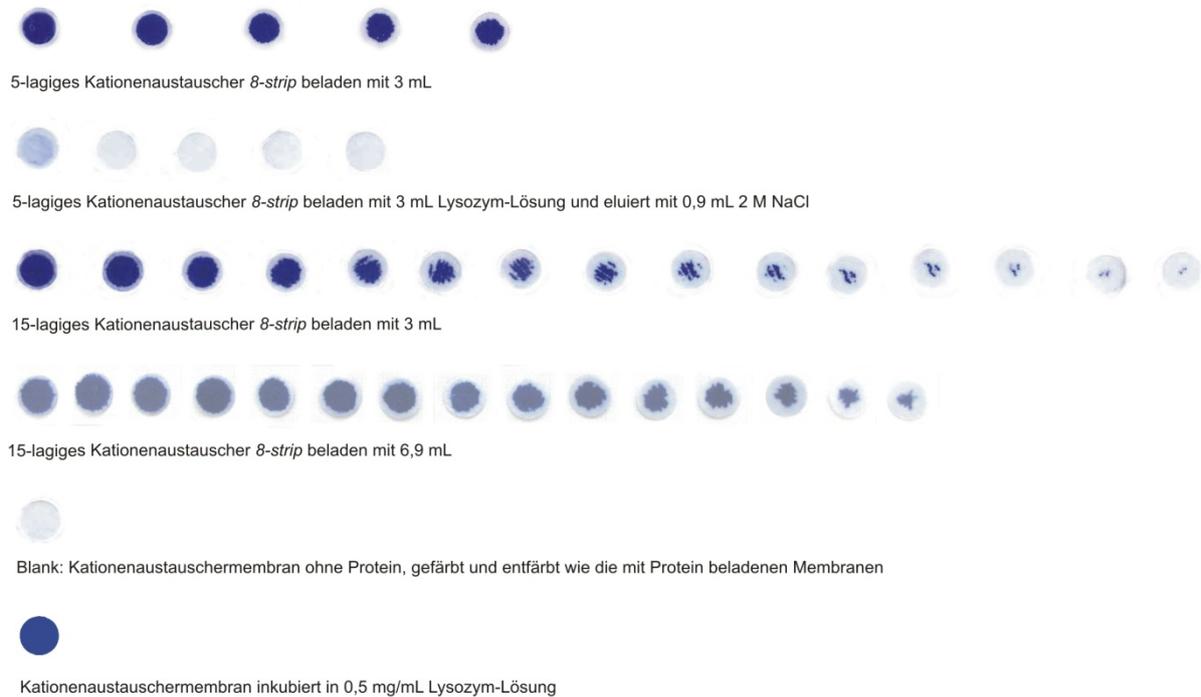


Abbildung 4.4 Durchbruchkurven der 15-lagigen Ionenaustauscher *8-strips*. Die Q- und S-Membranen wurden mit 0,5 mg/mL BSA bzw. Lysozym beladen (23 x 300 μ L). Es sind jeweils der Mittelwert von 8 wells angegeben.

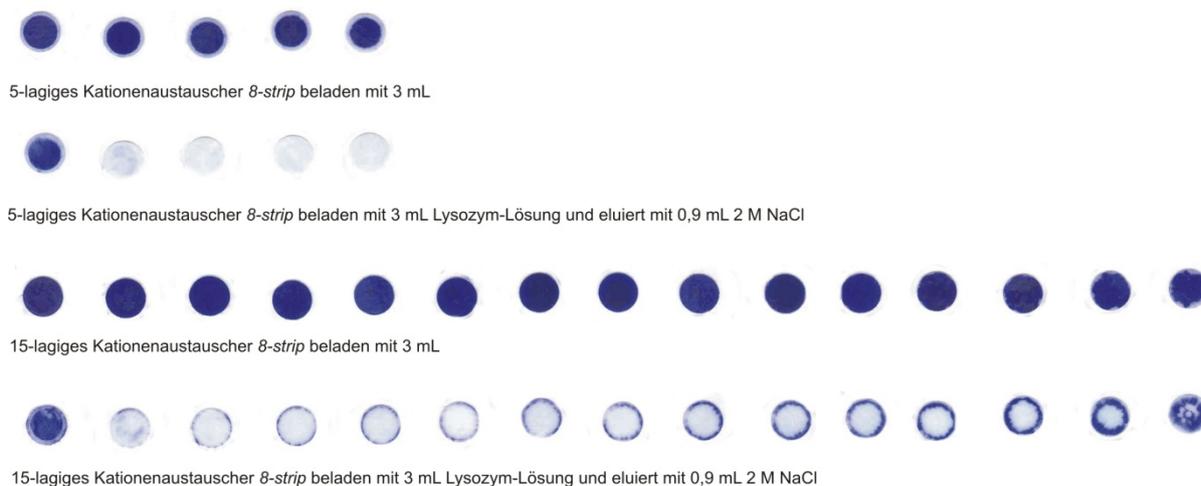
Um die Stofftransportverhältnisse in den Modulen zu verdeutlichen, wurden die mit Lysozym beladenen Kationenaustauscher wie in Kapitel 3.3 beschrieben mit Coomassie Brilliant Blau R-350 Lösung gefärbt. In Abbildung 4.5 wird zunächst eine Abnahme der Proteinadsorption von der obersten zur untersten Membranschicht beobachtet. Dabei bleibt ein äußerer Ring auf den *8-strip* Membranen vom Protein unbesetzt (Abbildung 4.5 (a)). Dies ist auf das Zylinderrohr zurückzuführen, das die einzelnen Membranlagen in den Einheiten zusammenhält. Die Adsorptionsfläche wurde deshalb aus der tatsächlichen Membranfläche (0,32 cm²) durch Subtraktion um den äußeren Ring errechnet und beträgt 0,204 cm². In

Tabelle 4.1 wurden deshalb die bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL ermittelten Bindungskapazitäten für die *8-strips* auf diese durchströmte Membranfläche bezogen. Diese Annahme stimmt jedoch bei einem vollständigem Durchbruch für 15-lagige *8-strips* nicht ganz (vergleiche Abbildung 4.5 (b)). Hier erkennt man, dass bei einer Überladung in allen Schichten die komplette Membran mit Protein belegt wird, während bei den 5-lagigen *8-strips* weiterhin der äußere Rand erhalten bleibt. Die Bindung der Proteine an den Membranen erfolgt durch Zentrifugation. Dabei kommt hauptsächlich die Membranmitte mit den

Probelösungen in Kontakt, nach Außen hin ist die Membran durch Diffusion erreichbar. Der diffusive Anteil im Stofftransport steigt anscheinend mit Erhöhung der Anzahl an Membranlagen, so dass sogar der äußere Membranrand, der nicht mit der Proteinlösung durchströmt wird, mit Lysozym belegt wird. Aufgrund dieses diffusiven Stofftransportes reicht eine Elution mit 0,9 mL 2 M NaCl nicht aus, um die am Rand gebundenen Proteinmoleküle zu lösen.



(a) Beladung mit 0,5 mg/mL Lysozym-Lösung



(b) Beladung mit 10 mg/mL Lysozym-Lösung

Abbildung 4.5 Coomassie-Färbung der mit Lysozym-Lösung beladenen Kationenaustauscher Membranen. Gezeigt sind von links nach rechts die Membranlagen in den *8-strips* von der obersten zur untersten Lage. (a) Beladung mit 0,5 mg/mL Lysozym-Lösung. (b) Beladung mit 10 mg/mL Lysozym-Lösung.

Tabelle 4.1 Ermittelte Bindungskapazitäten für Ionenaustauscher *8-strips* in Abhängigkeit von der Anzahl an Membranlagen.

	Q 8-strip		S 8-strip	
	5-lagig (1,02 cm ²)	15-lagig (3,06 cm ²)	5-lagig (1,02 cm ²)	15-lagig (3,06 cm ²)
Bindungskapazität bei 10 % Durchbruch* [mg/cm ²]	0,68 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,62 ± 0,03	0,59 ± 0,02
Bindungskapazität bei vollständigem (> 90 %) Durchbruch* [mg/cm ²]	1,47 ± 0,08	0,77 ± 0,01	1,36 ± 0,06	1,16 ± 0,05
Proteinwiederfindung [%]	93 – 97 %			

* 1 mg/mL BSA bzw. Lysozym in 25 mM KPP, pH 7,5. Die Bindungskapazität bei vollständigem Durchbruch wurde durch die Quantifizierung des Proteingehalts der Elutionsfraktionen ermittelt.

Diese Tatsache spiegelt sich auch in der geringen Wiederfindungsrate (56 %) wieder, die bei Überladung festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswert ist auch, dass die oberste Membranlage auch nach der Elution mit Protein besetzt bleibt. Das Protein kann also unter den gegebenen Bedingungen nicht vollständig eluiert werden.

Die Ergebnisse der Durchbruchanalyse und der Membranfärbung zeigen, dass eine Erhöhung der Membrananzahl aufgrund steigendem diffusivem Stofftransport zu einer Verminderung der Membrankapazität in den *8-strips* führt, die sich vor allem bei größeren Proteinmolekülen bemerkbar macht.

Spin columns

Für die *spin columns* wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. In Abbildung 4.6 ist das Beladungsprofil von 15-lagigen *spin columns* (5,61 cm²) angegeben. Während bei den Q-Membranen mit 2 mL BSA-Lösung beladen wurde, wurden bei den S-Membranen 3,6 mL Lysozym-Lösung aufgetragen, um den Proteindurchbruch zu erzielen. Die Bindungskapazitäten bei 10 % Durchbruch liegen mit 0,36 ± 0,01 mg/cm² bzw. 0,63 ± 0,03 mg/cm² für Q- und S-Membranen über den von *8-strips* (vgl. Tabelle 4.1).

Um die Proteinverteilung auf den Membranen in *spin columns* zu untersuchen, wurde ebenfalls eine Coomassie-Färbung der mit Lysozym beladenen Kationenaustauscher durchgeführt (Abbildung 4.7). Entsprechend den *8-strips* wird auch hier ein äußerer Membranrand nicht mit Proteinlösung durchströmt. Aufgrund der größeren Membranfläche allerdings ist das Verhältnis zur durchströmten Fläche kleiner und es wird eine partielle Beladung dieses äußeren Membranringes schon bei den 5-lagigen Einheiten beobachtet. Dies rührt wahrscheinlich daher, dass die *spin columns* in Zentrifugen mit festem Winkel zentrifugiert werden, so dass die Proben nicht unbedingt durch die Membranmitte durchlaufen. Würden die Einheiten immer mit der gleichen Seite in die Zentrifuge eingesetzt, könnte man eine Verschiebung der Proteinbindung zu der Seite hin feststellen.

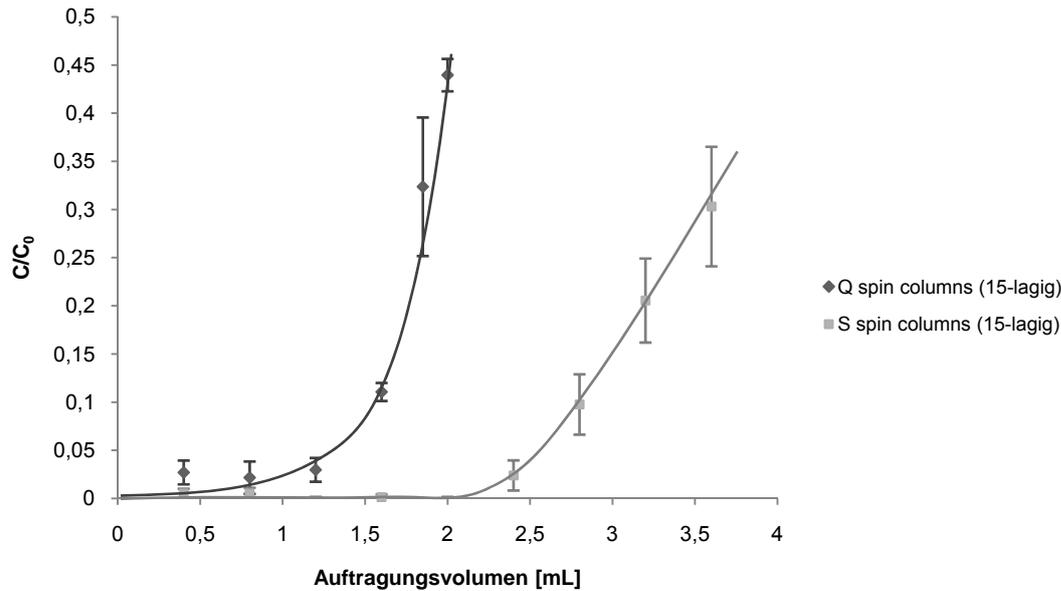


Abbildung 4.6 Ermittlung des Durchbruchs von BSA und Lysozym an 15-lagigen Ionenaustauscher *spin columns*. Die Q- und S-Membranen wurden mit 1,3 mg/mL BSA bzw. Lysozym in 25 mM KPP, pH 7,5 beladen. Angegeben ist der Mittelwert aus vier *spin columns*.

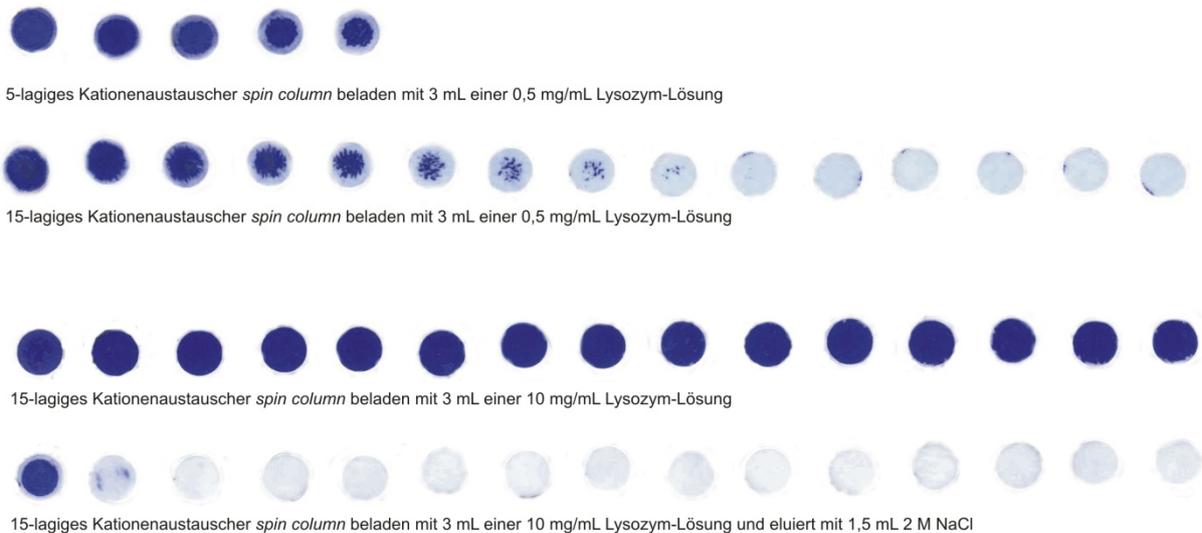


Abbildung 4.7 Coomassie-Färbung der mit Lysozym-Lösung beladenen Kationenaustauscher Membranen. Gezeigt sind von links nach rechts die Membranlagen in den *spin columns* von der obersten zur untersten Lage.

Teilweise erkennt man diesen Effekt in Abbildung 4.7. bei den mit 0,5 mg/mL Lysozym-Lösung beladenen 15-lagigen *spin columns*. Bei einer Überladung der Membran (3 mL einer 10 mg/mL Lysozym-Lösung) wird auch bei diesen Einheiten die komplette Membranfläche mit Protein belegt. Nach der Elution lösen sich im Gegensatz zu den δ -strips auch die Proteine von der Membran, die sich im äußeren Rand befinden. Dafür bleibt aber die erste Membranlage wieder mit Protein besetzt. Es wird hier eine maximale Bindungskapazität von $1,43 \pm 0,04 \text{ mg/cm}^2$ bei einer effektiven Adsorptionsfläche von $5,61 \text{ cm}^2$ festgestellt. Es sollte jedoch beachtet werden, dass bei solch einer Überladung die Bindungskapazität auf die

tatsächliche Membranfläche von $6,28 \text{ cm}^2$ bezogen werden müsste. Demnach beträgt die maximal gebundene Proteinmenge $1,27 \pm 0,04 \text{ mg/cm}^2$, wobei die Proteinwiederfindung bei 89 % liegt.

MA 75 units

Die Charakterisierung der Q 75 und S 75 Einheiten erfolgte analog zu den *8-strips* und *spin columns*. Zunächst wurde das Durchbruchverhalten der Module untersucht, wobei die Q-Membranen bei verschiedenen Flussraten mit 1 mg/mL BSA in 25 KPP , $\text{pH } 7,5$ beladen wurden. Zur Bestimmung der Bindungskapazität der Kationenaustauscher wurde 1 mg/mL Lysozym bei einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Abbildung 4.8 zeigt die erhaltenen Durchbruchkurven. Es wird eine von der Flussrate unabhängige Bindung festgestellt. Die Bindungskapazität bei 10 % Durchbruch beträgt für Q 75 $0,37 \pm 0,05 \text{ mg/mL}$ und für S 75 $0,66 \pm 0,03$. Die Bindungskapazitäten sind vergleichbar mit den ermittelten Werten für 15-lagige *spin columns* und liegen um $0,08 - 0,1 \text{ mg/cm}^2$ über den Bindungskapazitäten der 15-lagigen *8-strips*.

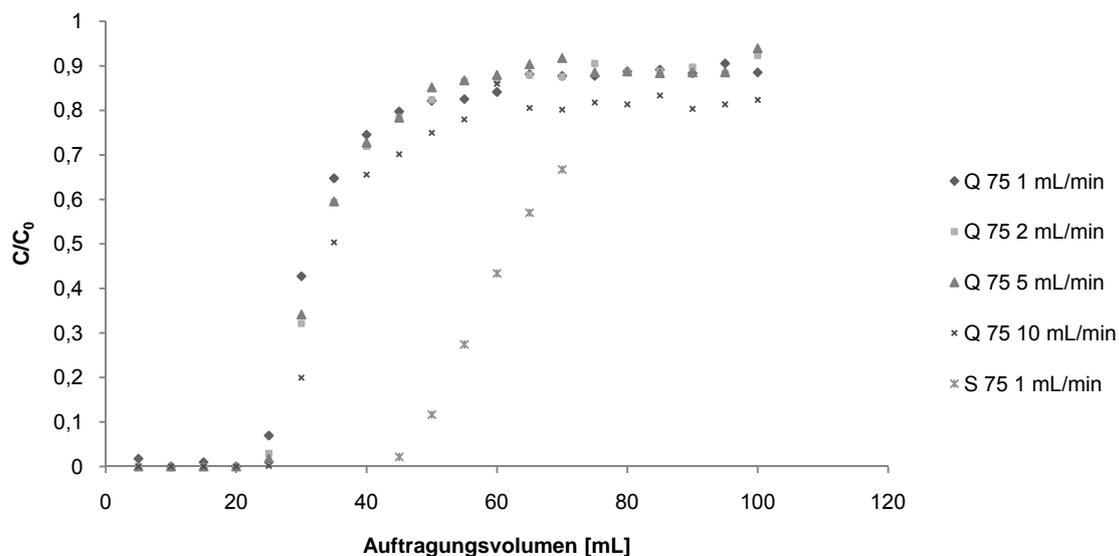


Abbildung 4.8 Durchbruchkurven von Q 75 und S 75 Einheiten. Bei den Anionenaustauschern wurde auch der Einfluss der Flussrate auf die Bindung untersucht. Aufgetragen wurde eine 1 mg/mL BSA- bzw. Lysozym-Lösung in 25 mM KPP , $\text{pH } 7,5$.

Die Proteinadsorption auf den MA 75 Einheiten wurde ebenfalls anhand der Kationenaustauscher untersucht. Hierzu wurde eine 10 mg/mL Lysozym-Lösung verwendet. Zwei S 75 Module wurden bis zum vollständigen Durchbruch beladen, von dem einen Modul wurde das Protein wieder eluiert, während das andere nur mit Bindungspuffer gewaschen wurde. Ein drittes Modul wurde nur bis zum Durchbruch beladen. Anschließend wurden die Membranen aus den Modulen entfernt und einzeln in der Coomassie-Färbelösung inkubiert (Abbildung

4.9). Die effektive Membranfläche bei den MA 75 Einheiten beträgt 5 cm^2 pro Membranlage. Aufgrund des Modulaufbaus bleibt der äußere Membranrand auch bei vollständiger Beladung unbesetzt. Während bei der Beladung bis zum Durchbruch ab der 8. Membranschicht die mit Protein beladene Fläche kleiner wird, beobachtet man bei vollständigem Durchbruch eine gleichmäßige Beladung aller Membranschichten.

Das gebundene Protein wird mit 2 M NaCl bis auf die erste Lage komplett wieder eluiert. In der ersten Schicht wird ähnlich den *8-strips* und *spin columns* (vergleiche Abbildung 4.5 und Abbildung 4.7) eine leichte Färbung der Membran festgestellt.

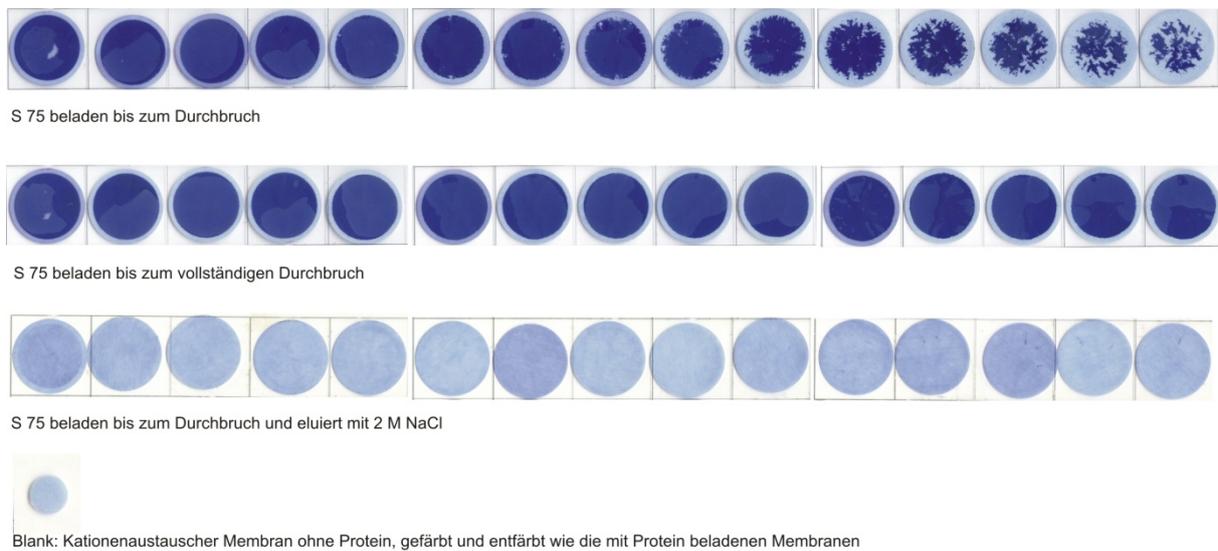


Abbildung 4.9 Coomassie-Färbung der mit 10 mg/mL Lysozym-Lösung beladenen Kationenaustauscher Membranen. Gezeigt sind von links nach rechts die Membranlagen in den S 75 Einheiten von der obersten zur untersten Lage.

4.1.2 Scale-up vom Mikro- in den Labormaßstab

Grundsätzlich werden bei einem *Scale-up* Prozess die Betthöhen, lineare Fließgeschwindigkeit, Probenkonzentration und das Verhältnis Gradienten- zu Gesamtvolumen konstant gehalten, während das Probenvolumen, die Flussrate und der Bettdurchmesser erhöht werden. Dabei werden im analytischen Maßstab zuerst die Trennung optimiert und alle wichtigen Parameter ermittelt. Nach einer Maßstabvergrößerung um den Faktor 10 oder 100 erfolgt in einem weiteren Schritt die Übertragung auf die tatsächliche Prozessgröße. Neben den Ansprüchen an die verwendete Apparatur muss hierbei auch die gleichmäßige Strömungsverteilung über großflächige Betten gewährleistet sein [106].

In dieser Arbeit sollte nun eine Maßstabvergrößerung von Mikroliter- in den Labormaßstab stattfinden. In den nächsten Versuchen wurden deshalb die *8-strips* den MA 75 Einheiten gegenübergestellt. Bezüglich der Adsorptionsverteilung wurde bei den *MA 75 units* eine bessere Strömungsverteilung festgestellt. Zum genaueren Vergleich der Membranadsorbereinheiten wurden die maximalen Bindungskapazitäten und Dissoziationskonstanten anhand von

Bindungsisothermen ermittelt, wobei zunächst die Abhängigkeit der Proteinbindung von der Fließgeschwindigkeit überprüft wurde. Da durch Bearbeitung der *8-strips* in der Zentrifuge die Bestimmung der Flussrate nicht möglich war, wurden die *8-strips* mit geeigneten Anschlüssen an eine FPLC-Anlage angeschlossen. Unter Variation der Fließgeschwindigkeit wurden die 5- und 15-lagigen Q *8-strips* mit 1 mg/mL BSA beladen, wobei die Flussrate und das Probenvolumen entsprechend der Q 75 Einheit (Abbildung 4.8) angepasst wurde. Es wurden also 1,3 mL bzw. 4 mL BSA-Lösung aufgegeben und die gebundene Proteinmenge wurde durch Messung der Elutionsfraktionen bestimmt.

In Abbildung 4.10 sind die eluierten Proteinmengen gegen die linearen Fließgeschwindigkeiten für die 5- und 15-lagigen Q *8-strips* sowie für die Q 75 Einheit aufgetragen. Hierbei wird eine von der Auftragungsgeschwindigkeit relativ unabhängige Proteinadsorption festgestellt. Bei einer Steigerung der Fließgeschwindigkeit um den Faktor 10 wird lediglich eine Abnahme von 10 % festgestellt. Die weiteren Versuche wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 cm/min durchgeführt.

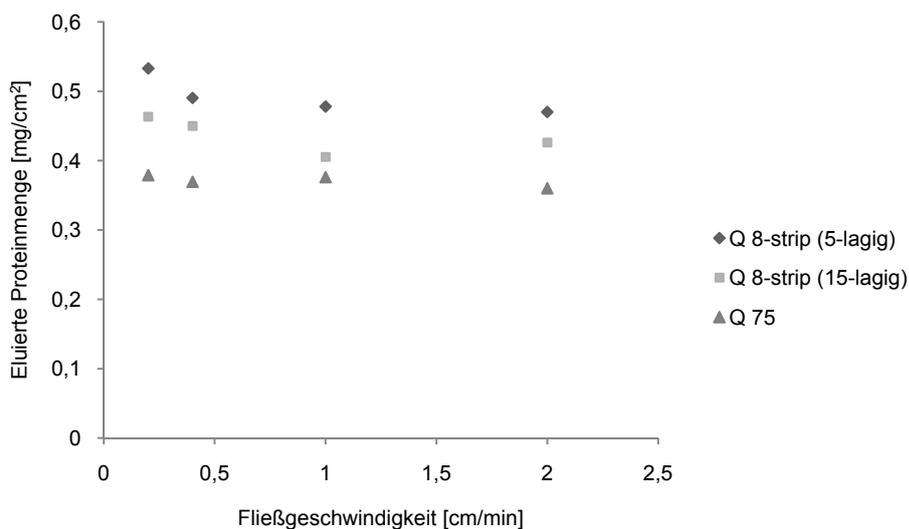


Abbildung 4.10 Abhängigkeit der Proteinbindung an Anionenaustauscher von der Auftragsgeschwindigkeit. Aufgetragen wurden 1,3 mL (5-lagige *8-strips*), 4 mL (15-lagige *8-strips*) bzw. 100 mL (Q 75) einer 1 mg/mL BSA-Lösung.

Da bei einem *Up-scale* Prozess lediglich der Bettdurchmesser verändert wird, während die Betthöhe konstant gehalten wird, wurden bei der Aufnahme der Adsorptionisothermen nur die 15-lagigen *8-strips* mit den MA 75 Einheiten verglichen. Hierzu wurden die Anionen- und Kationenaustauscher Module mit unterschiedlichen Konzentrationen an BSA bzw. Lysozym-Lösung beladen. Adsorptionisothermen werden normalerweise beim vollständigen Durchbruch ($\geq 98\%$) aufgenommen, deshalb wurden die Q *8-strips* zunächst mit je 8 mg beladen (Abbildung 4.11). Es wurde aber nur ein Durchbruch von 90 % erreicht. Für einen kompletten Durchbruch wurden im nächsten Versuch 24 mg Protein auf die *8-strips* aufgetragen. Die Adsorptionisotherme für diese Beladung ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Man erkennt

einen fast linearen Anstieg mit steigender Proteinkonzentration. Anscheinend findet bei einer Überladung der Membran nicht nur eine Adsorption in Monolage statt. Wie auch bei den Membranfärbungen gezeigt wurde, wird bei solch einer Überladung die komplette Membranfläche zur Proteinbindung ausgenutzt. Deshalb müsste in diesem Fall die Beladung auf die gesamte Fläche bezogen werden.

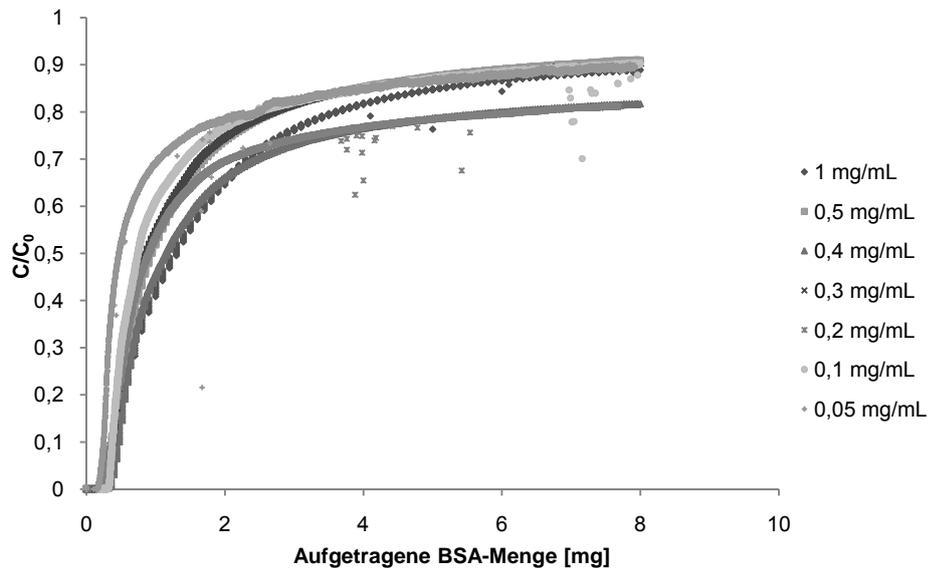


Abbildung 4.11 Durchbruchkurven von 15-lagigen Q 8-strips.

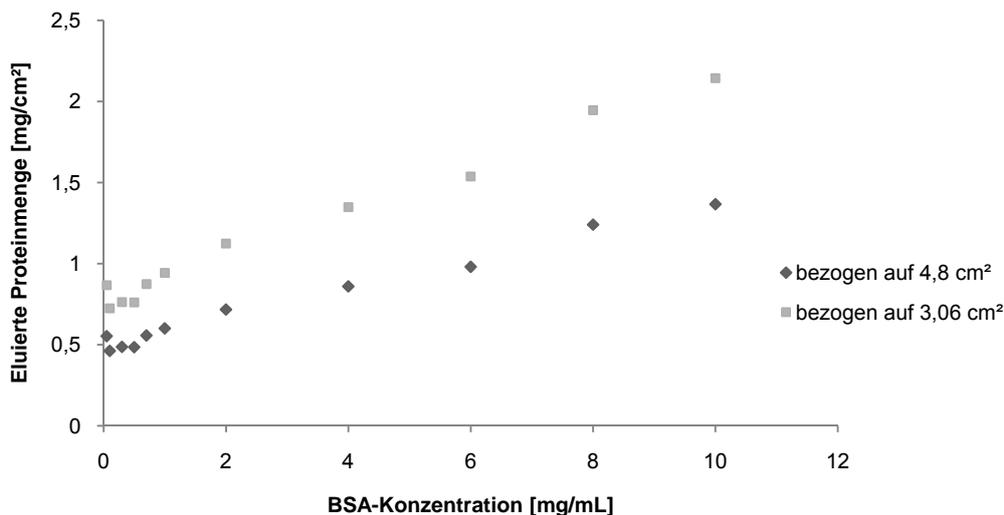


Abbildung 4.12 Adsorptionsisotherme für 15-lagige Q 8-strips bei einer Proteinbeladung von 24 mg. Dargestellt sind die Isothermen bezogen auf 3,06 cm² bzw. 4,8 cm² Membranfläche.

Aufgrund dieser Ergebnisse und den Ergebnissen aus der Membranfärbung wurde bei der Überprüfung der *Up-scale* Möglichkeit von den 15-lagigen *8-strips* auf MA 75 Einheiten für *8-strips* der Mittelwert aus der gesamten Membranfläche und der durchströmten Fläche als effektive Adsorptionsfläche angenommen ($3,93 \text{ cm}^2$). Um eine Überladung der Membranen zu verhindern und so die effektive Adsorptionsfläche konstant zu halten, wurde deshalb bei allen Proteinkonzentrationen auf die Membranen in beiden Modulen eine Proteinmenge von $1,3 \text{ mg/cm}^2$ aufgetragen.

Die Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14 zeigen die Adsorptionsisothermen sowie die ermittelten Langmuir Isothermen für Q- und S-Membranen in den beiden Modulen. Grundsätzlich wird eine höhere Proteinbindung bei S-Membranen festgestellt und die Adsorptionen an MA 75 Einheiten lassen sich durch die Langmuir Isotherme besser beschreiben. Die ermittelten Parameter der Isothermen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Bindungskapazitäten und Affinitäten der *8-strips* sind für beide Ionenaustauscher vergleichbar mit denen der MA 75 Einheiten.

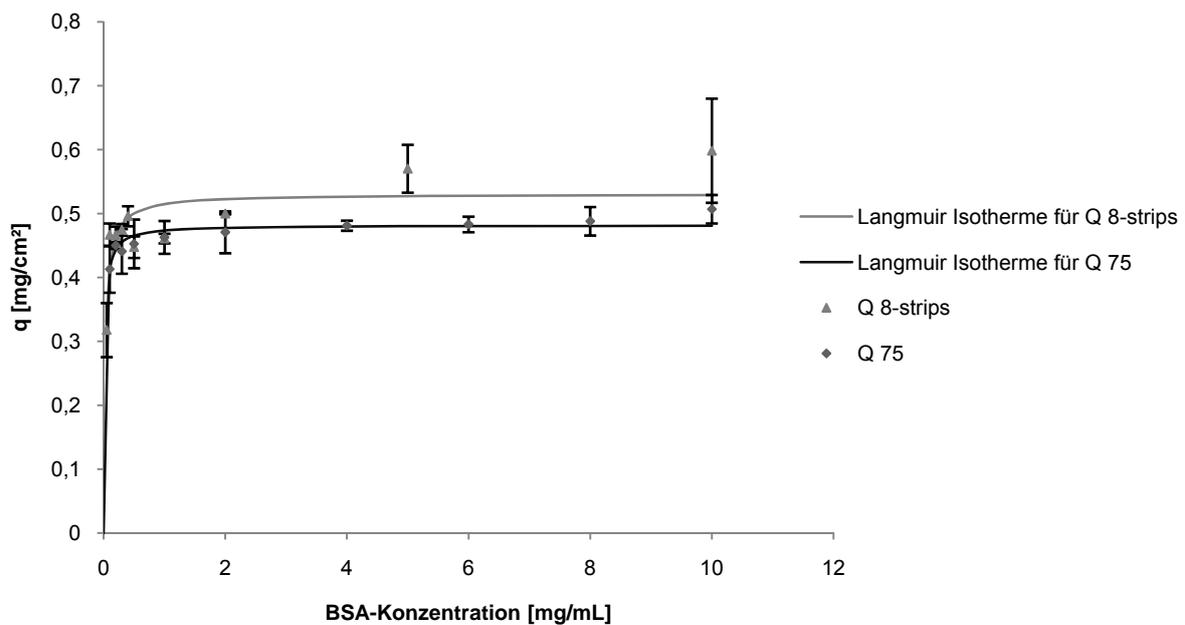


Abbildung 4.13 Adsorptionsisothermen für Q 75 und 15-lagige Q 8-strips bei einer Proteinbeladung von $1,5 \text{ mg/cm}^2$. Angegeben ist der Mittelwert aus drei Messungen.

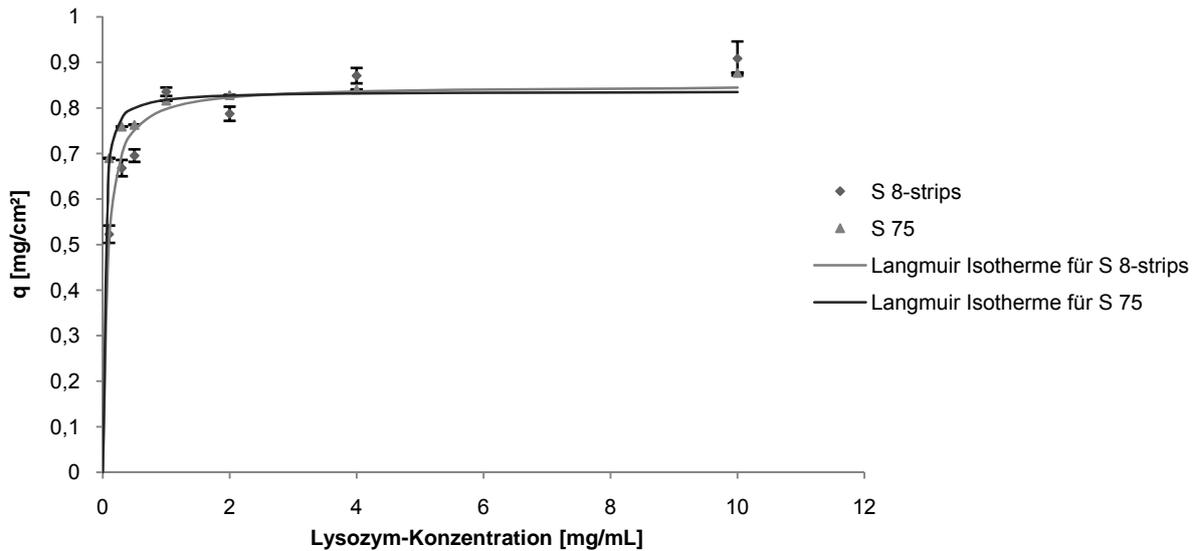


Abbildung 4.14 Adsorptionsisothermen für S 75 und 15-lagige S 8-strips bei einer Proteinbeladung von $1,5 \text{ mg/cm}^2$. Angegeben ist der Mittelwert aus drei Messungen.

Tabelle 4.2 Parameter der für die Ionenaustauscher Membranen ermittelten Isothermen.

	Q 8-strips	Q 75	S 8-strips	S 75
K_{Diss} [mg/mL]	$2,98 \times 10^{-2}$	$1,72 \times 10^{-2}$	$6,68 \times 10^{-2}$	$2,39 \times 10^{-2}$
q_{max} [mg/cm ²]	0,53*	0,48	0,85*	0,84

* Bezogen $3,93 \text{ cm}^2$ Membranfläche.

Bei einer angenommenen effektiven Membranfläche von $3,93 \text{ cm}^2$ für 8-strips lassen sich die beiden Ionenaustauscher Einheiten miteinander gut vergleichen. Dies ist jedoch nur ein Näherungswert, der nur bei einem Durchbruch von $> 90 \%$ gilt. Bei einem Durchbruch von 10% werden bei den MA 75 Einheiten höhere Bindungskapazitäten festgestellt (Kapitel 4.1.1).

4.1.3 Anwendung: Aufreinigung von hGH mittels S-Membranen

Die Scale-up Möglichkeit der Ionenaustauscher Membranen wurde auch am Beispiel der Aufreinigung von Human growth hormone (hGH, Somatotropin) aus Kulturüberständen untersucht. Das Somatotropin ist ein aus 191 Aminosäuren aufgebautes Protein mit 2 Disulfidbrücken und einer Molmasse von ungefähr $21,5 \text{ kDa}$. Als Wachstumshormon ist es zusammen mit anderen Hormonen wie Insulin und Thyroxin essenziell für ein normales Längenwachstum. Ein Mangel an hGH in der Kindheit führt zu Kleinwüchsigkeit, die durch Zufuhr von hGH behandelt werden kann.

Die Kultivierungen mit der rekombinanten Zelllinie CHO^{SFS} hGH wurden von Fabienne Anton durchgeführt [119]. Weitere Kulturüberstände wurden von der Cell Culture Services GmbH, Hamburg zur Verfügung gestellt (Kapitel 3.5). Zur Aufarbeitung wurden die Zellen abzentrifugiert und der Kulturüberstand durch 0,2 µm Membran filtriert. In Suck et al. wurden bereits die Aufreinigungsbedingungen für hGH anhand des *Scouting* Protokolls über *spin columns* optimiert: Kationenaustauscher Membran, Bindungspuffer: 25 mM NaAc, pH 4,5; Elution mit 0,3 und 0,6 M NaCl in Bindungspuffer [107]. Diese wurden für das *Up-scaling* übernommen.

Zunächst wurde in dem Überstand der pH-Wert auf 4,5 eingestellt. Die Konzentration an hGH in der Probe betrug 12,4 µg/mL. Um das Bindungs- und Elutionsverhalten der Membranen bei solch einer geringen Probenkonzentration zu überprüfen, wurden 7,2 bzw. 80 mL Überstand auf S 8-strip (1 well) bzw. S 75 Einheiten aufgetragen. Das Ergebnis der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 4.15). Das hGH wird komplett an die Membranen gebunden. Das Protein wird mit 0,3 M und 0,6 M NaCl eluiert. Während die Erhöhung der Salzkonzentration auf 1 M keine weitere Elution von hGH bewirkt, ist in der Elution mit Laemmli-Puffer hGH vorhanden. Dies zeigt, dass hGH erst unter denaturierenden Bedingungen vollständig von der Membran gelöst werden konnte.

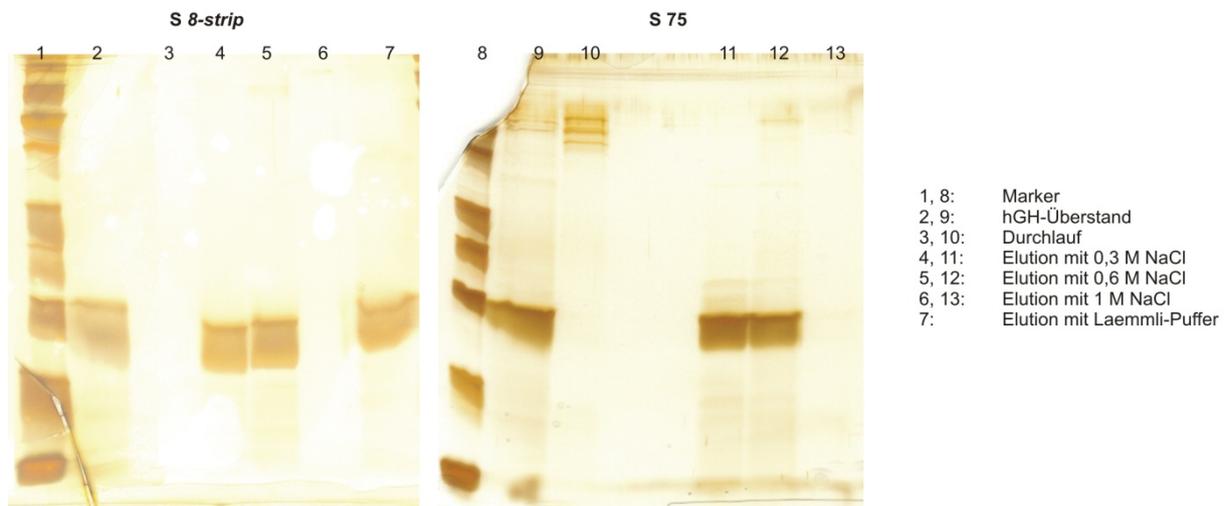


Abbildung 4.15 SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von hGH aus Kulturüberstand über Kationenaustauscher (12 %iges Gel, Silber-Färbung).

Nach diesem Vorversuch wurden die Bindungskapazitäten der Kationenaustauscher für hGH bestimmt. Hierzu wurde auf die S 75 Einheit 2,25 L Kulturüberstand mit einer Flussrate von 5 mL/min aufgetragen und nach Waschen mit Bindungspuffer unter Einstellung eines Stufengradienten eluiert (Abbildung 4.16). Beim 8-strip wurde ein aufkonzentrierter Überstand (24 x 300 µL) verwendet und mit dem gleichen Gradienten eluiert. In Abbildung 4.17 ist die SDS-PAGE-Analyse der Proteinfractionen für beide Einheiten dargestellt. Die Bindungskapazität der Membranen wurde offensichtlich erschöpft (vgl Spur 3 und 15). In den Elutionsfraktionen werden Verunreinigungen durch andere Proteine festgestellt. Bei einer Überladung der Membran spielen anscheinend außer den ionischen Wechselwirkungen auch

andere Kräfte eine Rolle. So können z. B. Wechselwirkungen mit den bereits gebundenen Proteinmolekülen auftreten oder Membranstellen besetzt werden, an denen geringe sterische Hinderungen existieren, wo die ionischen Interaktionen zwischen den Liganden und der Proteinoberfläche nicht zur Wirkung kommen. Die Elution mit Laemmli-Puffer (Spur 9) zeigt, dass die Membran mit anderen Proteinen des Kulturüberstands stark verunreinigt wurde.

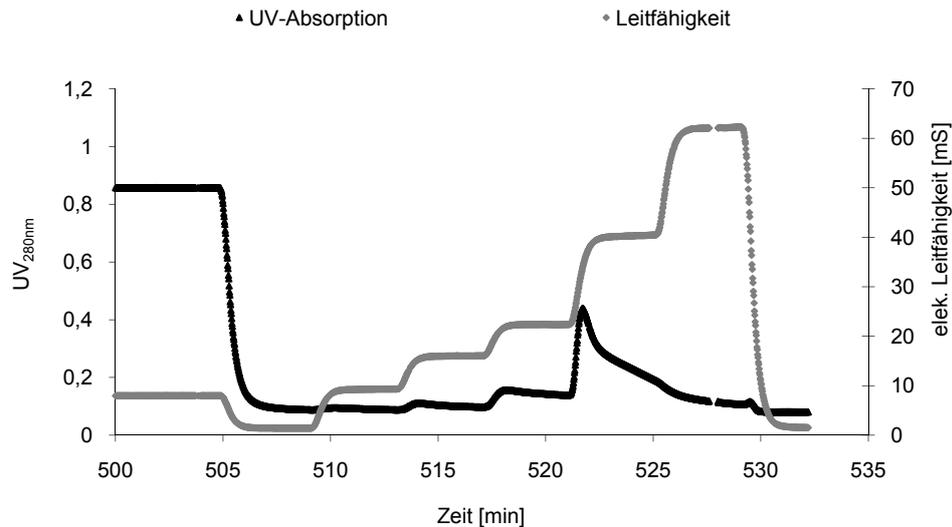


Abbildung 4.16 Chromatogramm der hGH-Aufreinigung über S 75 Modul.

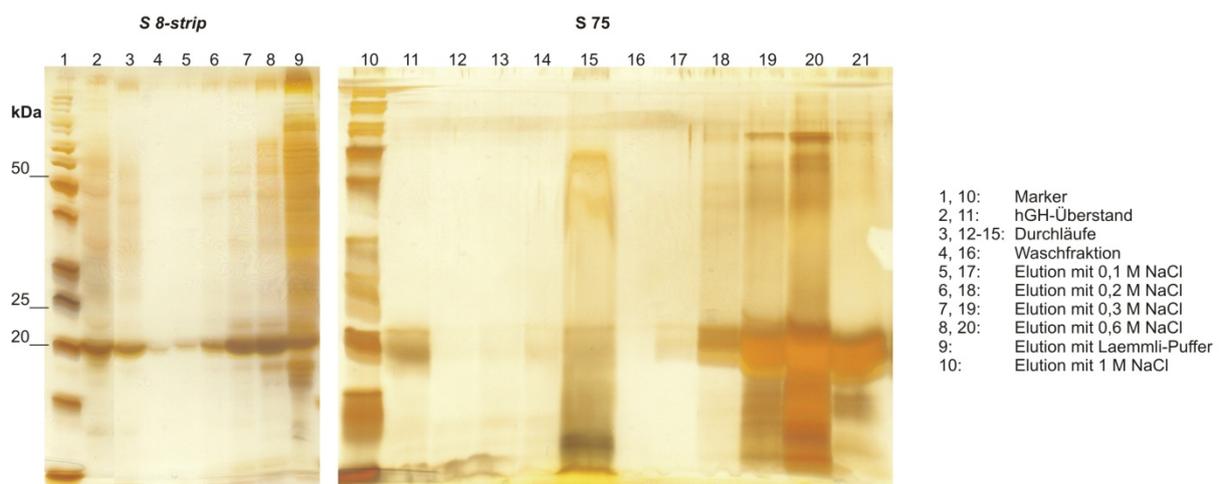


Abbildung 4.17 SDS-PAGE-Analyse der hGH-Aufreinigung über Kationenaustauscher 8-strip und MA 75 (12 %iges Gel, Silber-Färbung).

Die hGH-Konzentrationen in den Elutionsfraktionen wurden mit einem ELISA bestimmt und so die hGH-Bindungskapazitäten ermittelt. Mit 202,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für S 8-strip und 146,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ für S 75 wurden vergleichbare Bindungskapazitäten für beide Adsorber erhalten. Für eine effiziente Aufreinigung größerer Mengen sollte die Aufreinigungsprozedur jedoch in mehreren Schritten erfolgen, ohne die Membrankapazität vollständig auszunutzen.

4.2 Metallchelate Membranen

Neben den Ionenaustauscher Membranen wurden auch Membranen mit Metallchelatisierenden Gruppen zur Proteinaufreinigung untersucht. Die Metallchelatchromatografie wird besonders häufig zur Isolierung rekombinanter Proteine eingesetzt. An das Zielprotein fusioniert man mehrere Histidine in direkter Abfolge. Durch diese Fusion, die als His-Tag bezeichnet wird, bindet das Zielprotein fester an das Metallion als die übrigen Proteine. Standardmäßig werden 5 oder 6 Histidine als Tag verwendet. Die hier eingesetzten Membranen sind mit Iminodiessigsäure (IDA)-Gruppen funktionalisiert. Bei der Trennung über IDA-Membranen können verschiedene Metallionen auf ihre Eignung zur Reinigung und Wiederfindung des zu analysierenden His-Tag Proteins getestet werden. Die 8-strips sind hierfür besonders geeignet. Nach Ermittlung der optimalen Aufreinigungsbedingungen über 8-strips und spin columns wurden größere Mengen über IDA 75 Einheiten mit 75 cm^2 Membranfläche und 2,1 mL Bettvolumen aufgereinigt (vgl. Abschnitt 3.1).

4.2.1 Herstellung von His-Tag Proteinen

Die IDA Module wurden durch Isolation von His-Tag Proteinen (Bgl-His und His-getaggte Esterasen PFEI, BsubE, pNBE und Bste) aus *E. coli* Kulturüberständen und Zelllysaten näher charakterisiert. Eine Auflistung der Proteine mit Molekulargewichten und pI-Werten sowie das Herstellungsverfahren sind in Kapitel 3.6 angegeben. Zur Produktion der Esterasen wurden die erhaltenen Plasmide in den *E. coli* Sicherheitsstamm K12 transformiert. Alle Kultivierungen wurden in LB-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin durchgeführt. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurde bei Bgl-His mit 1 mM IPTG induziert, während die Induktion der Esterasen mit 0,2 % L-Rhamnose erfolgte. Nach 4 h Kultivierung wurden zur Gewinnung der Esterasen die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Da das Bgl-His auch extrazellulär vorliegt, wurde der Überstand zur Proteinisolierung verwendet.

4.2.2 Optimierung der Aufreinigung von His-Tag Proteinen mittels *8-strips* und Übertragung auf IDA 75

Durch die Kombination der *8-strips* mit 96-well Platten kann ein Hochdurchsatz *Screening* durchgeführt werden. So wurden die IDA *8-strips* zur parallelen Bestimmung der optimalen Aufreinigungsbedingungen der His-Tag Proteine eingesetzt. Dabei wurden vor allem verschiedene Metallionen (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) auf ihre Bindungseffizienz hin untersucht. Nach Beladung der einzelnen wells der *8-strips* mit den Metallionen wurden die Proteine aus den Zellysaten und Kulturüberständen isoliert (vgl. Abschnitt 3.2). Der Erfolg der Aufreinigungen wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die His-getaggen Enzyme konnten über Co^{2+} beladene Membranen in hoher Reinheit aus den Lysaten isoliert werden (Abbildung 4.18). Während der Aufreinigung von PFEI wurde eine hohe Instabilität des Enzyms in Lösung festgestellt, deshalb wurde dem Elutionspuffer 50 % Glycerin zugesetzt. Der Einsatz von Glycerin stellte bei den Membranadsorbentern kein Problem dar.

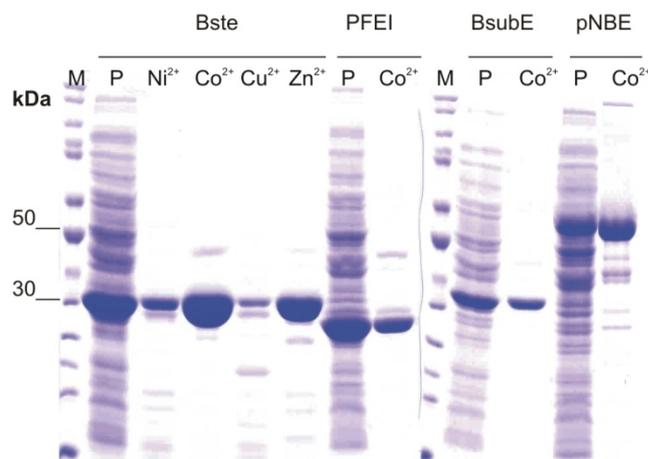
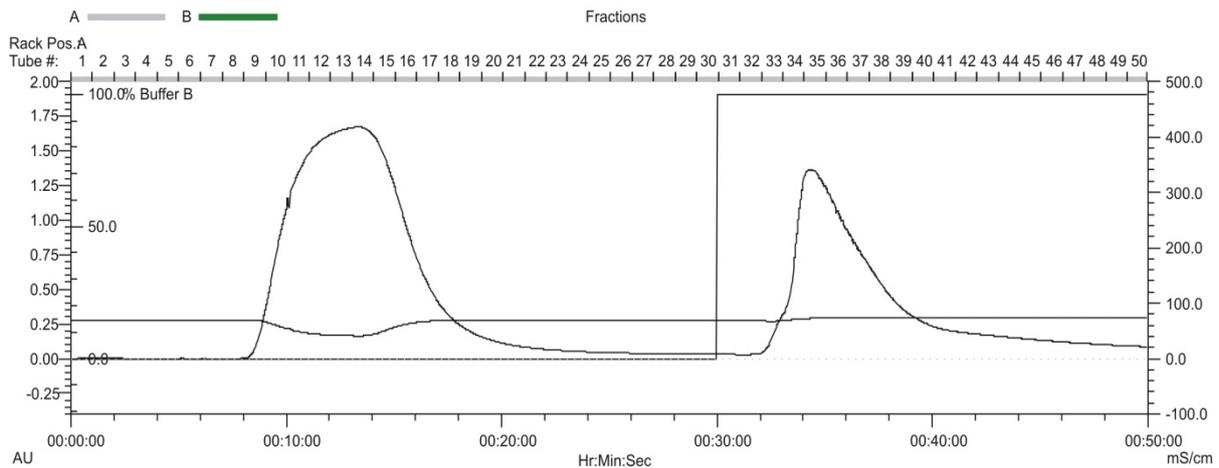
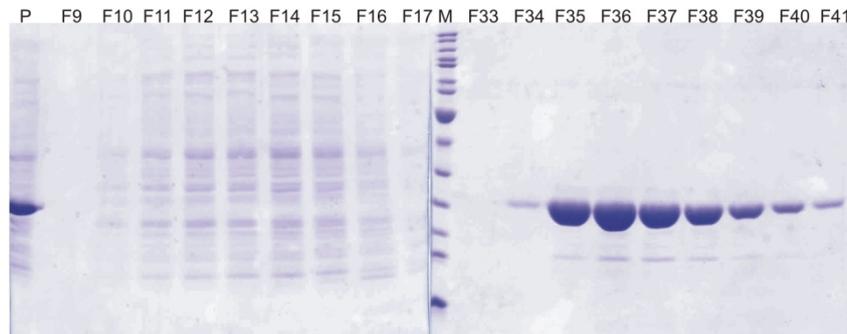


Abbildung 4.18 SDS-PAGE-Gel des Screeningversuchs nach Metallionen bei der Aufreinigung von His-tag-Proteinen über IDA *8-strips* (12 %iges Gel, Coomassie-Färbung). M: Marker; P: Probe (*E.coli* Zellysat); Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} : Elution unter Angabe des verwendeten Metallions; Bste: *Bacillus stearothermophilus* Esterase; PFEI: *Pseudomonas fluorescens* Esterase I; BsubE: *Bacillus subtilis* Esterase; pNBE: *Bacillus subtilis* p-Nitrobenzylesterase.

Im Folgenden ist beispielhaft für das Enzym Bgl-His die Übertragung der optimierten Aufreinigungsbedingungen auf IDA 75 Einheiten vorgestellt. 3 mL Zellaufschluss wurden bei einer Flussrate von 1 mL/min, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, auf eine mit Co^{2+} -Ionen beladene Membran aufgetragen. Das gebundene Protein wurde anschließend mit Imidazol eluiert. Die densitometrische Analyse der Proteinfractionen auf dem SDS-Gel zeigt, dass das Protein mit über 97 % Reinheit aus dem Zellysat isoliert werden konnte (Abbildung 4.19). Eine detaillierte Beschreibung zur densitometrischen Quantifizierung der Proteine nach SDS-PAGE befindet sich in Abschnitt 7.3.1.



(a) Chromatogramm



(b) SDS-Polyacrylamid Gel

Abbildung 4.19 (a) Chromatogramm und (b) SDS-Polyacrylamid-Gel der Aufreinigung von Bgl-His aus dem Zellaufschluss über IDA 75 (12 %iges Gel, Coomassie-Färbung). Die Metallchelate-Membran wurde mit Co^{2+} -Ionen beladen. P: Probe Bgl-His Zellysats, F: Fraktion, M: Marker. Aufgetragen wurden 3 mL Zellaufschluss, nach Waschen mit 20 mL 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, pH 8,0 wurde mit 20 mL 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0 eluiert. Die Lösungen wurden in 1 mL Fraktionen aufgefangen.

4.2.3 Charakterisierung der IDA Membranen

Zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens von IDA Modulen wurde zuerst die Ligandendichte auf den Membranen bestimmt, indem die Membranen mit Co^{2+} -Ionen beladen wurden. Durch Absorptionmessung der aufgetragenen und durchgelaufenen Metalllösung bei 487 nm wurde mittels einer Co^{2+} -Standardreihe die Metallionendichte auf der Membran ermittelt. Die Metallionen werden bei allen Modulen gleichermaßen komplexiert ($2,7 \pm 0,5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$). Bei der Regeneration der wiederverwendbaren IDA 75 Einheiten mit 1 M Schwefelsäure wurde eine Wiederfindung der Metallionen über $94 \pm 3 \%$ festgestellt. Es tritt also kaum eine Ausblutung des Liganden auf.

Im zweiten Schritt wurde die Bestimmung der Proteinadsorption an die mit Metallionen beladenen Membranen durchgeführt, wobei die Abhängigkeit der Bindungskapazität von der Probenauftragungsgeschwindigkeit untersucht wurde. Hierfür wurden die Esterasen PFEI und

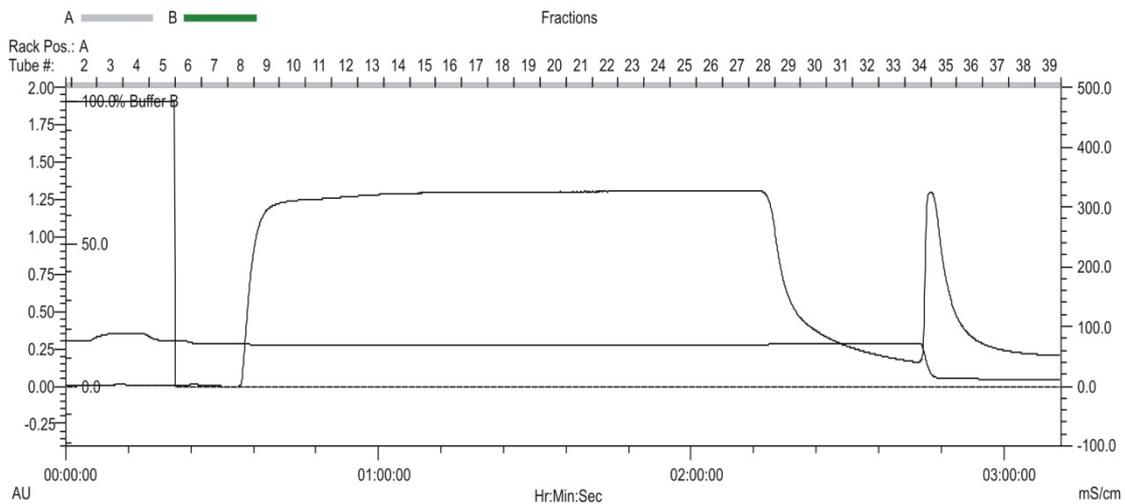
pNBE in Zusammenarbeit mit Michael Büring (laufende Dissertation, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover) im 8 L-Maßstab produziert [121]. Die Enzymmengen in den Zellaufschlüssen sowie den Elutionsfraktionen der Proteinaufreinigung wurden densitometrisch nach SDS-PAGE unter Verwendung von BSA als Standard quantifiziert (siehe Abschnitt 7.3.1). Das Durchbruchverhalten der Module wurde durch Aktivitätsmessung der Durchlaufaktionen verfolgt. Hierzu wurde ein fotometrischer Assay verwendet, der auf der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat durch die Esterasen basiert. Dabei wird *p*-Nitrophenolat ($\epsilon_{410\text{nm}, \text{pH}7,5} = 14500$) freigesetzt, das fotometrisch durch Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm detektiert wird (vgl. Abschnitt 3.7). Die relativen Absorptionen der Fraktionen wurden dabei zur Absorption der aufgetragenen Probe ins Verhältnis gesetzt.

Bindung von PFEI an IDA Module

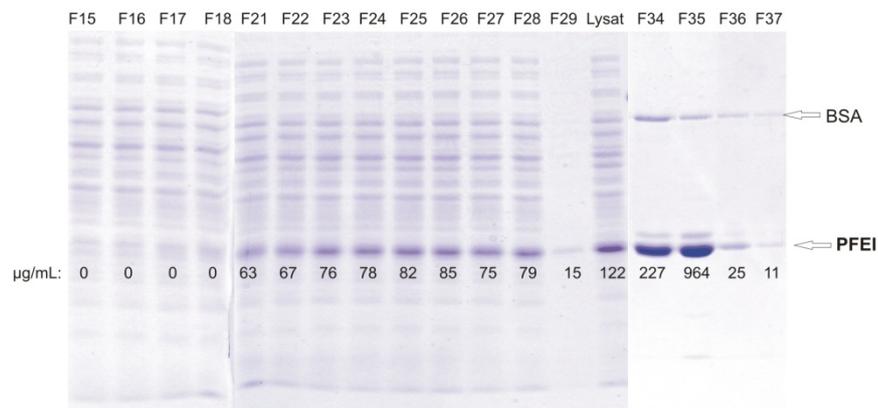
Um die benötigte Probemenge für den His-Tag Proteindurchbruch zu ermitteln, wurden 100 mL des PFEI Zellaufschlusses, der 122 $\mu\text{g/mL}$ Enzym enthält, mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die IDA 75 Einheit aufgetragen (Abbildung 4.20). Mittels SDS-PAGE Analyse und Aktivitätsmessung der Fraktionen wurde der Enzymdurchbruch von 10 % bei einem Auftragungsvolumen von 52,4 mL festgestellt. Dies entspricht einer PFEI-Menge von 6,4 mg. Zum Vergleich der Bindungskapazitäten von IDA 75 mit *8-strips* und *spin columns* wurden 103 $\mu\text{g/cm}^2$ PFEI bei verschiedenen linearen Fließgeschwindigkeiten auf die Membranen aufgegeben, wobei ein Zellaufschluss mit 155 $\mu\text{g/mL}$ PFEI verwendet wurde. Die Mikroliter-einheiten wurden hierzu wie bei den Ionenaustauschern an die FPLC angeschlossen. Die Bindungskapazitäten wurden aus der eluierten Proteinmenge errechnet. Tabelle 4.3 fasst die Ergebnisse der Proteinaufreinigung in Abhängigkeit Fließgeschwindigkeit zusammen. Bei einer 10fachen Erhöhung der Flussrate wird eine Kapazitätsabnahme von ca. 10 % festgestellt. Außer bei den 15-lagigen *8-strips* werden vergleichbare Bindungskapazitäten für die Module erhalten. Die niedrigeren Bindungskapazität hierbei sind, wie in Abschnitt 4.1.1 bereits diskutiert, auf die von der tatsächlichen Membranfläche geringere effektive Adsorptionsfläche zurückzuführen.

Tabelle 4.3 Bestimmung der Bindungskapazität der IDA Module anhand der Aufreinigung von PFEI in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit.

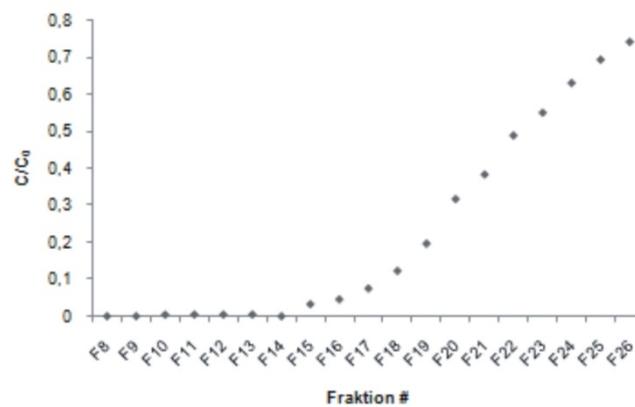
	0,2 cm/min	0,4 cm/min	1 cm/min	2 cm/min	4 cm/min
IDA 75 (75 cm²)	82 $\mu\text{g/cm}^2$	85 $\mu\text{g/cm}^2$	75 $\mu\text{g/cm}^2$	73 $\mu\text{g/cm}^2$	-
15-lagige <i>spin columns</i> (5,61 cm²)	-	83 $\mu\text{g/cm}^2$	88 $\mu\text{g/cm}^2$	85 $\mu\text{g/cm}^2$	74 $\mu\text{g/cm}^2$
15-lagige <i>8-strips</i> (4,8 cm²)	-	58 $\mu\text{g/cm}^2$	60 $\mu\text{g/cm}^2$	57 $\mu\text{g/cm}^2$	51 $\mu\text{g/cm}^2$
5-lagige <i>8-strips</i> (1,6 cm²)	-	89 $\mu\text{g/cm}^2$	75 $\mu\text{g/cm}^2$	82 $\mu\text{g/cm}^2$	70 $\mu\text{g/cm}^2$



(a) Chromatogramm



(b) SDS-Polyacrylamid Gel mit Angabe der densitometrisch bestimmten Proteinmenge



(c) Aktivitätsmessung

Abbildung 4.20 Aufreinigung von PFEI aus dem Zellaufschluss über IDA 75. (a) Chromatogramm, (b) SDS-Polyacrylamid-Gel mit Angabe der densitometrisch bestimmten Proteinmenge (12 %iges Gel, Coomassie-Färbung) und (c) Aktivitätsmessung. Die Metallchelate-Membran wurde mit Co^{2+} -Ionen beladen (Faktion 1-6). Aufgetragen wurden 100 mL Zellaufschluss, nach Waschen mit 30 mL 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, pH 8,0 wurde mit 30 mL 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0 in 50 % Glycerin eluiert. Die Lösungen wurden in 5 mL Fraktionen aufgefangen.

Bindung von pNBE an IDA Module

Neben PFEI wurde auch das Bindungsverhalten von pNBE an IDA Modulen untersucht. Da bei PFEI die 15-lagigen *spin columns* vergleichbare Kapazitäten wie die IDA 75 Einheiten zeigten, wurden hierbei diese beiden Einheiten gegenübergestellt. Aus einer 8 L Kultivierung wurden 81,59 g Zellen geerntet. Diese wurden in 815 mL IDA Bindungspuffer aufgeschlossen, zentrifugiert und durch 0,2 µm Filter filtriert. Der Zellaufschluss enthielt 245 µg/mL pNBE.

Beim IDA 75 Modul wurde der Durchbruch von pNBE in Abhängigkeit von der Flussrate anhand der Aktivitätsmessung der Proteinfraktionen verfolgt. Hierbei wurden 50 mL Zellysate auf die Membran aufgegeben (163 µg pNBE/cm²). Die Bindungskapazitäten bei 10 % Durchbruch wurden aus der aufgetragenen Proteinmenge errechnet, während die Bindungskapazitäten bei vollständigem Durchbruch aus den eluierten Proteinmengen bestimmt wurden. Bei den *spin columns* wurden entsprechend der IDA 75 Einheit 4 mL Probe verwendet, wobei hier nur die maximalen Bindungskapazitäten bei verschiedenen Flussraten ermittelt wurden. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Abbildung 4.21 zeigt die Ergebnisse der Durchbruchanalyse. Hierbei wird mit steigender Flussrate eine Verschiebung des Durchbruchs zu kleineren Auftragungsvolumina, also eine zunehmende Abhängigkeit der Bindungskapazität von der Flussrate, beobachtet. Tabelle 4.4 fasst die ermittelten Kapazitäten für IDA 75 Einheiten und 15-lagige *spin columns* zusammen. Während bei den IDA 75 Einheiten bei einer 10fachen Erhöhung der Flussrate eine Abnahme der Bindungskapazität um ca. 55 % festgestellt wird, bleibt die Bindungskapazität der *spin columns* konstant. Für beide Einheiten werden jedoch etwa 42 % geringere Kapazitäten als beim PFEI erzielt. Hierfür könnte die Größe des His-Tag Proteins verantwortlich sein. Das pNBE ist mit 54965 Da Molmasse größer als das PFEI (31059 Da). Die großen Proteinmoleküle behindern sich anscheinend gegenseitig bei der Komplexbildung. Dies erklärt auch die Abhängigkeit von der Flussrate bei der IDA 75 Einheit. Warum dieser Effekt bei den *spin columns* nicht auftritt, ist unklar.

Die Bindung von His-Tag Proteinen an Metallchelate Membranen ist demzufolge abhängig von der Größe und sicherlich verbunden damit von der Zugänglichkeit des His-Tags für das immobilisierte Metallion. Auch wenn sich die IDA Module in Abhängigkeit von dem His-getaggen Protein unterschiedlich verhalten, können durch Arbeiten im Mikrolitermaßstab die Aufreinigungsbedingungen bezüglich der Pufferauswahl im Hochdurchsatz optimiert und auf größere Einheiten übertragen werden.

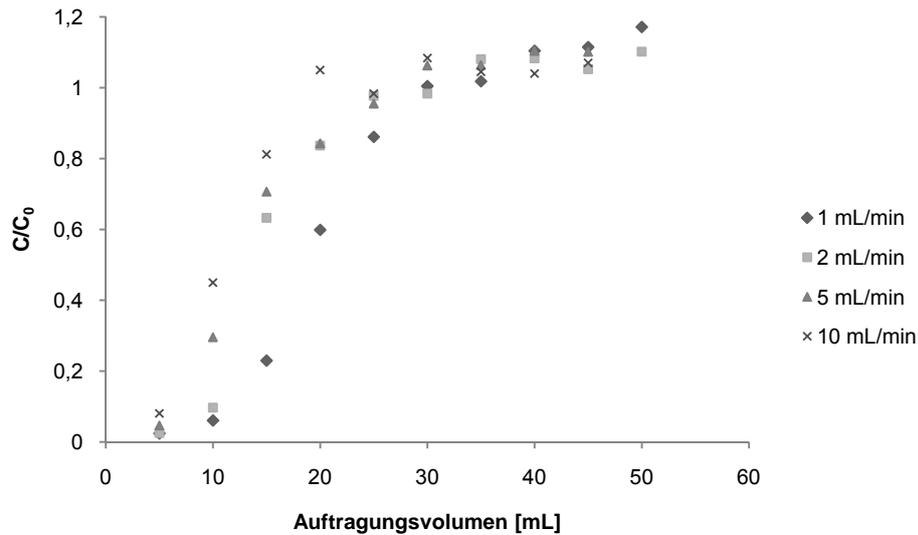


Abbildung 4.21 Durchbruchkurven von pNBE bei der Aufreinigung über IDA 75 in Abhängigkeit von der Flussrate. Die Metallchelator-Membran wurde mit Co^{2+} -Ionen beladen. Aufgetragen wurden 50 mL Zellaufschluss, nach Waschen mit 30 mL 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, pH 8,0 wurde mit 30 mL 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0 eluiert. Die Lösungen wurden in 5 mL Fraktionen aufgefangen.

Tabelle 4.4 Bestimmung der Bindungskapazität der IDA Module anhand der Aufreinigung von pNBE in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit.

	0,2 cm/min	0,4 cm/min	1 cm/min	2 cm/min
IDA 75 (10 % Durchbruch)	35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	32 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
IDA 75 (vollständiger Durchbruch)	38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	34 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
15-lagige <i>spin columns</i> (vollständiger Durchbruch)	-	26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

5 Membranchromatografie: Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Adsorbermodule (*8-strips*, *spin columns*, MA 75) mit Ionenaustauscher und Metallchelatomembranen durch Untersuchung des Bindungs- und Elutionsverhaltens näher charakterisiert und miteinander verglichen.

Ionenaustauscher (Q und S)

Zunächst wurde der Einfluss der Anzahl an Membranlagen auf die Bindungseigenschaften der Ionenaustauscher *8-strips* und *spin columns* untersucht. Es wurde festgestellt, dass sich eine Steigerung der Membranlagenanzahl von 5 auf 15 Lagen negativ auf die Bindungskapazität auswirkt, da die Strömung in diesen Modulen in der Membranmitte komprimiert wird und nur ein geringer Teil der Membranoberfläche ausgenutzt wird. Erst bei einer Überladung der Module wird die ganze Membranfläche mit Proteinen belegt. Probleme gab es aufgrund des Modulaufbaus in der Bestimmung der effektiven Adsorptionsfläche. Während die durchströmte Adsorptionsfläche bei MA 75 Einheiten gleich bleibt, wird die gesamte effektive Adsorptionsfläche in den Mikroliter-Einheiten aufgrund steigender diffusiver Anteile im Stofftransport (Filmdiffusion) bei einer Überladung vergrößert (vgl. Ergebnisse der Membranfärbung: Abbildung 4.5 und Abbildung 4.7).

Die Bindungskapazitäten bei 10 % Durchbruch korrelieren für alle drei Module (15 Membranlagen) (siehe Tabelle 5.1). Aufgrund des größeren BSA Moleküls werden für Q Membranen geringere Bindungskapazitäten ermittelt.

Tabelle 5.1 Vergleich der Bindungskapazitäten der 15-lagigen Ionenaustauscher Module bei 10 % Durchbruch.

	Q			S		
	<i>8-strip</i> (3,06 cm ²)	<i>spin column</i> (5,61 cm ²)	IDA 75 (75 cm ²)	<i>8-strip</i> (3,06 cm ²)	<i>spin column</i> (5,61 cm ²)	IDA 75 (75 cm ²)
Bindungskapazität* [mg/cm ²]	0,28 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,05	0,59 ± 0,02	0,63 ± 0,03	0,66 ± 0,03

* 1 mg/mL BSA bzw. Lysozym in 25 mM KPP, pH 7,5.

Bei linearen Fließgeschwindigkeiten zwischen 0,2 und 2 cm/min ist die Bindungskapazität der Module von der Auftragsgeschwindigkeit relativ unabhängig. Bei einer 10fachen Flussrate wird lediglich eine Abnahme von 10 % in der Proteinbindung festgestellt.

Vergleicht man die mittels Langmuir Isotherme erhaltenen Bindungskapazitäten, so weisen die Anionenaustauschermembranen wiederum eine geringere Bindungskapazität auf und die

Adsorptionen an MA 75 Einheiten lassen sich durch die Langmuir Isotherme besser beschreiben. Die Bindungskapazitäten der 15-lagigen *8-strips* bei einer angenommenen effektiven Fläche von $3,93 \text{ cm}^2$ (Mittelwert aus der durchströmten und tatsächlichen Membranfläche) sind für beide Ionenaustauscher vergleichbar mit denen der MA 75 Einheiten (vgl. Abschnitt 4.1.2).

Als Beispiel zur Anwendung der Ionenaustauscher Membranadsorber in Realproben wurde das Wachstumshormon hGH aus CHO-Kulturüberständen über Kationenaustauschermembranen aufgereinigt. Hierbei wurde für S *8-strips* und S 75 ein ähnliches Bindungsverhalten gegenüber hGH erhalten. Zu einer effizienten Aufreinigung über Ionenaustauscher sollte statt der vollen Ausnutzung der Membranfläche die Reinigungsprozedur mehrmals durchlaufen werden.

Metallchelat Membranen

Die mit metallchelatisierenden IDA-Gruppen funktionalisierten *8-strips*, *spin columns* und IDA 75 Einheiten wurden direkt für die Aufreinigung von Enzymen aus *E. coli* Zelllysaten eingesetzt. Nach Testung von verschiedenen Metallionen über *8-strips* konnten die mit Co^{2+} -Ionen beladenen Membranen als optimale Matrix zur Isolierung von His-Tag Proteinen identifiziert werden.

Zur Charakterisierung der IDA-Membranen wurden die Esterasen PFEI und pNBE in größeren Mengen produziert und über die Module aufgereinigt, wobei der Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die Proteinbindung untersucht wurde. Bei diesen Membrantypen wurde eine proteinabhängige Adsorption festgestellt. Während bei PFEI unabhängig von der Auftragungsgeschwindigkeit für alle Module ähnliche Bindungskapazitäten erhalten wurden, reduzierte sich die gebundene Proteinmenge bei pNBE für IDA 75 Einheiten mit steigender Flussrate auf die Hälfte. Zudem wurden für pNBE deutlich geringere Bindungskapazitäten erzielt (vgl. 4.2.3). Dies hängt sicherlich zum einen von der Proteingröße und zum anderen von der Zugänglichkeit des His-Tags zur Komplexbildung ab.

Durch Verwendung von *8-strips* und *spin columns* mit unterschiedlichen Funktionalitäten kann im Mikrolitermaßstab die optimale Aufreinigungsstrategie für das jeweilige Protein, einschließlich der Bestimmung der Membransorte und Ermittlung der Bindungs- bzw. Elutionspuffer, entwickelt werden. Obwohl eine Übertragung auf MA 75 Einheiten und somit auf *Sartobind Large Scale System* prinzipiell möglich ist, sollte das *Up-Scaling* in den Produktionsmaßstab über die MA 75 Einheiten erfolgen, um die Fließgeschwindigkeit zu optimieren und aufgrund der festen effektiven Adsorberfläche die Bindungskapazität sicher festzustellen.

6 Aptamerchromatografie: Materialien und Methoden

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine Aptamer-basierte Affinitätschromatografie für den präparativen Einsatz zu entwickeln. Hierzu wurden zwei gegen His-Tag gerichtete Aptamere aus der Patentschrift US 2005/0142582 A1 als Modellliganden verwendet (Tabelle 6.1), welche in einem phosphathaltigen Selektionspuffer (50 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5 (PBS-T)) aus einer DNA Bibliothek isoliert wurden [108].

Tabelle 6.1 Verwendete Aptamere

Aptamer	6H5	6H7
Sequenz	5' GGC TTC AGG TTG GTC TGG TTG GGT TTG GCT CCT GTG TAC G 3'	5' GCT ATG GGT GGT CTG GTT GGG ATT GGC CCC GGG AGC TGG C 3'
Molekulargewicht [Da]	12598	12667
Affinität	His-Tag	His-Tag
Modifizierung	5'C6-NH ₂	5'C6-NH ₂ und 3'C7-NH ₂

Um die Eignung der ausgewählten Aptamere für den Einsatz in der Chromatografie aufzuklären, wurde zu Beginn der Arbeit die Funktionalität der Aptamere mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht. Anschließend wurden verschiedene Matrices (Sephacrose Beads, Membranen und Magnetpartikel) mit unterschiedlichen Funktionalitäten (Epoxy, Aldehyd, Carboxyl und Amino) zur Immobilisierung der Aptamere getestet und die Aptamerchromatografie auf Basis der am besten geeigneten Oberfläche optimiert.

Im Folgenden sind die Versuchsprotokolle der zur Entwicklung der Aptamerchromatografie angewandten Techniken wiedergegeben. Die Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, mit den 5'C6-NH₂ modifizierten Aptameren durchgeführt.

6.1 Oberflächenplasmonresonanz (SPR) Spektroskopie

Die SPR Messungen wurden mit freundlicher Genehmigung von Dr. Thomas Reinard am Institut für Pflanzengenetik, Abteilung 2, Pflanzenbiotechnologie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

Verwendetes Gerät: Autolab ESPRIT (EcoChemie, Utrecht, Niederlande)

System Parameter:

Measurement Interval [s]: 1
Pump (1+2) Flow [$\mu\text{L/s}$]: 16,7
Synchronized Mix Flow [$\mu\text{L/s}$]: 16,7
Pump (1+2) Mix Volume [μL]: 15
Synchronized Mix Volume [μL]: 15
Drain Speed [1-255]: 250
Wash Speed [1-255]: 250

Verwendete Lösungen:

Carboxylfunktionalisierung: 11 mg 11-Mercaptoundecansäure in 50 ml 98% Ethanol

Ligandenimmobilisierung: 10 mM Natriumacetat pH 4,5 (Immobilisierungspuffer)

0,4 M EDC

0,1 M NHS

1 M Ethanolamin pH 8,5 (Blockierungspuffer)

0,1 M HCl (Regenerationspuffer)

Protein Bindung/Elution: 50 mM K_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5 (PBS-T)

1 % SDS

Eingesetzte Liganden: 2,4 mg/mL 6H5- bzw. 6H7-Aptamer und 1 mg/mL 6His-Antikörper in NaAc-Puffer

Targetprotein: 0,015 mg - 5 mg/mL PFEI in PBS-T

Vorbereitung der Goldchipoberfläche: Zur Einführung von Carboxylgruppen wurde der Goldchip in der 11-Mercaptoundecansäure-Lösung über Nacht inkubiert. Anschließend wurde er jeweils dreimal mit ddH₂O und EtOH gründlich gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Der Chip wurde auf dem Hemizylinder in die ESPRIT eingesetzt und durch Waschen mit Natriumacetat-Puffer stabilisiert.

Experimenteller Ablauf der ESPRIT-Messungen:

1. Immobilisierung des Liganden an die Sensoroberfläche:

Von der Liganden-Probe und den Reaktionslösungen EDC, NHS und Ethanolamin wurden je 2 x 75 μL (für Mess- und Referenzzelle) in eine 384-well Mikrotiterplatte eingeführt. Als Stocklösungen wurde NaAc sowie HCl verwendet. Die Kopplung wurde im "Ligand

Immobilization Mode” des Gerätes vollautomatisch durchgeführt. Folgende Reaktionszeiten wurden dabei definiert:

Baseline:	120 s Immobilisierungspuffer
EDC/NHS activation:	300 s EDC + NHS Gemisch
Ligand coupling:	1800 s Probe
Deactivation:	600 s Blockierungspuffer
Regeneration:	120 s Regenerationspuffer

2. Automatisierte Ligand-Target-Interaktion

Um den Matrixeffekt zu minimieren, wurde die Chipoberfläche zunächst mit PBS-T stabilisiert. Das PFEI wurde in steigenden Konzentrationen in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Messungen erfolgten gegen eine Referenzmesszelle, wobei statt des Targetproteins PBS-T verwendet wurde. Die Bindungsexperimente wurden im “Full Kinetic Kurve Plot” Modus durchgeführt. Folgende Zeiten wurden für die Bindung und Elution des Targets eingestellt:

Baseline:	120 s PBS-T
Association:	3600 s PFEI bzw. PBS-T
Dissociation:	300 s PBS-T
Regeneration:	300 s (SDS für Aptamerchips, HCl für den Antikörperchip)

Die Messungen wurden mit der Kinetic Evaluation-Software des Gerätes und Microsoft Office Excel 2007 ausgewertet.

6.2 Bestimmung der Aptamerkonzentration

Die Bestimmung der Aptamerkonzentrationen in Lösungen erfolgte am NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc; Wilming-ton, DE, USA) unter dem Programm Nucleic Acid, ssDNA. Durch Subtraktion des Überstandes und der Waschfraktionen von der eingesetzten Probelösung wurde die immobilisierte Aptamermenge ermittelt.

6.3 Aptamere auf Epoxy-Sepharose Gel

Verwendete Matrix: Epoxy activated-Sepharose 6B (E 6754-5G, SIGMA)

Verwendete Puffer: Bindungspuffer: 0,1 M NaHCO₃, pH 10

Blockierungspuffer: 1 M Ethanolamin, pH 8

Waschpuffer: 0,1 M NaAc, pH 4 und 0,1 M Tris/HCl, pH 8

Eingesetzte Aptamer-Lösung: 1 mg/mL 6H7 in Bindungspuffer

Vorbereitung des Gels: In 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 50 mg Feststoff (entspricht 150 μ L Gel) mit 1 mL H₂O quellen lassen und für 30 s bei 10000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde herauspipettiert und das Gel mehrmals gewaschen (insgesamt 4 ml H₂O 1 h lang).

Durchführung:

Bei jedem Schritt wurde das Gel mit der jeweiligen Lösung resuspendiert und inkubiert. Zur Entfernung des Überstands wurde anschließend für 30 s bei 10000 g zentrifugiert und die Lösung herauspipettiert.

- Das Gel wurde zunächst 3 x mit 150 μ L Bindungspuffer äquilibriert (je 1 min).
- Nach Zugabe von 150 μ L Aptamer-Lösung wurde bei 40°C für 20 h unter Schütteln bei 1000 rpm inkubiert.
- Anschließend wurde das Gel 3 x mit 150 μ L Bindungspuffer für je 5 min gewaschen.
- Zum Blockieren wurde das Gel für 4 h mit 300 μ L 1 M Ethanolamin unter Schütteln behandelt.
- Waschen nach dem Blockieren: 300 μ L NaAc, 1 min; 300 μ L Tris/HCl, 1 min. Diese Schritte wurden drei Mal wiederholt.

6.4 Reaktion mit Aldehydmembran

Verwendete Matrix: Aldehydmembran (94ALD-06-001, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen)

Verwendete Puffer: Bindungspuffer: 0,1 M NaPP, 0,15 M NaCl, pH 7,2

Aktivierungspuffer: 5 M NaCNBH₃ in 0,01 M NaOH

Blockierungspuffer: 1 M Tris/HCl, pH 7,4 oder 0,1 % NaBH₄

Waschpuffer: 1 M NaCl

Aptamer-Lösung: 1 mg/mL 6H7 in Bindungspuffer

Durchführung:

- Eine 1 cm² Membran wurde 3 x mit 200 μ L Bindungspuffer äquilibriert.
- 300 μ L Aptamer-Lösung + 2,5 μ L Aktivierungspuffer wurden auf die Membran gegeben und unter Schütteln auf dem Thermoschüttler (1000 rpm) für 6 h bei 25°C inkubiert.

- Zum Waschen wurde die Membran 3 x mit 300 μ L Bindungspuffer für 5 min geschüttelt.
- Die reaktiven Aldehydgruppen wurden bei 25 °C für 30 min mit dem jeweiligen Blockierungspuffer behandelt.
- Waschen nach dem Blockieren: 3 x 300 μ L Waschpuffer jeweils 1 min.

Zur Bestimmung der gebundenen Aptamer-Konzentration wurden die Aptamer-Probe und der Durchlauf mit Ethanol gefällt:

- Zu der jeweiligen Lösung wurde 1/10 Volumen 5 M NaCl gegeben.
- Es wurden 4 Volumenteile 96 % Ethanol addiert und über Nacht bei -80 °C gelagert.
- Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min wurde der Überstand verworfen und die Pellets wurden mit 500 μ L 70 % Ethanol überschichtet.
- Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand sorgfältig entfernt und die Pellets bei 42 °C für 15 min an der Luft trocknen lassen.
- Die Pellets wurden dann in 50 μ L H₂O gelöst und mit dem Nanodrop vermessen.

6.5 EDC-NHS Aktivierung der Carboxyoberflächen

Verwendete Matrices: 5 Membranlagen aus IDA und *Carboxylic acid (C) Vivapure spin columns* (VS-MCMINI24 und VS-IX01CM24, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen)

Verwendete Puffer: Bindungspuffer: 0,1 M MES + 0,5 M NaCl; pH 5,2

Aktivierungspuffer: 0,2 M EDC + 0,05 M NHS in Bindungspuffer

Blockierungspuffer: 0,1 M Ethanolamin in Bindungspuffer; pH 6

Aptamer-Lösung: 1 mg/mL 6H7 in Bindungspuffer

Durchführung:

- Die Membranen wurden 3 x mit 300 μ L Bindungspuffer für jeweils 5 min äquilibriert.
- Zur Aktivierung der Carboxyl-Gruppen wurden die Membranen mit 300 μ L Aktivierungspuffer für 15 min behandelt und anschließend mit Bindungspuffer gewaschen (300 μ L, 1 min).
- 300 μ L Aptamer-Lösung wurde auf die Membranen gegeben und 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.
- Nach der Inkubation wurde mit 300 μ L Bindungspuffer, 1 M NaCl und noch mal mit Bindungspuffer gewaschen (je 5 min).
- Das nicht reagierte NHS wurde mit 300 μ L Blockierungspuffer für 1 h blockiert.
- Anschließend wurden die Membranen 3 x mit 300 μ L Bindungspuffer gewaschen.

6.6 EDC Aktivierung der Carboxyl Magnetic Beads

Magnetpartikel: Biomag® Maxi Carboxyl (84130, Polysciences, Inc.)

Verwendete Puffer: Äquilibrierungspuffer: 0,1 M Phosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,2

Bindungspuffer: 0,1 M MES, 0,9 % NaCl, pH 4,7

Aptamer-Lösung: 1 mg/mL 6H7 in Bindungspuffer

Magnetpartikel: 100 µL Beads (40 mg/mL)

Die Arbeit mit den Magnetpartikeln wurde mittels Pipettierrobotter KingFisher automatisiert durchgeführt. Hierzu wurden die Beads und die Reaktionslösungen in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und der KingFisher wurde gemäß den Versuchsbedingungen programmiert. Entsprechend des Protokolls wurden dann die Magnetpartikel für jeden Reaktionsschritt anhand von Magnetstäbchen (12-er Streifen) von well zu well überführt. Bei mehr als acht Reaktionsschritten kann eine Pause in das Programm eingetragen werden, in der die Platte ausgewechselt werden kann. Es können 12 Parallelversuche durchgeführt werden, wobei die Reaktionszeiten identisch sein müssen.

- Die Beads wurden 3 x mit 100 µL Phosphat-Puffer äquilibriert (je 30 s).
- Nach Einführung der Magnetpartikel in die Aptamer-Lösung wurden 30 µL EDC in Bindungspuffer (100 mg/mL) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Anschließend wurde 3 x mit 100 µL Äquilibrierungspuffer gewaschen (jeweils 5 min).

6.7 Immobilisierung an Amino Magnetic Beads

Magnetpartikel: BioMag® Maxi Amine (84140, Polysciences, Inc.)

Verwendete Puffer: Bindungspuffer: 50 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5 (PBS)

Aktivierungslösung: 1 mg/mL Cyanurchlorid in Acetonitril

Aktivierung des Aptamers: 100 µL Aptamer in Bindungspuffer (1 mg/mL 6H5 oder 6H7) wurde mit 22 µL Cyanurchloridlösung versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige Cyanurchlorid wurde unter Verwendung von einer Microcon YM-3, 3 kDa Ultrafiltrationseinheit (42403, Millipore) entfernt.

Immobilisierung mittels KingFisher:

- 100 µL Amino Magnetic Beads (50 mg/mL) wurden 3 x mit 100 µL PBS äquilibriert.
- Zur Immobilisierung wurden die Beads mit 100 µL aktivierter Aptamer-Lösung für 2 h inkubiert.
- Anschließend wurde 3 x mit 100 µL Bindungspuffer für jeweils 10 min gewaschen.

6.8 Aminofunktionalisierung regenerierter Cellulose Membranen

Basismembran: Regenerierte Cellulose Membran Filter (18407-047 N, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen)

Die Cellulose-Membran wurde zur Immobilisierung von aktivierten Aptamermolekülen mit primären Amino-Gruppen funktionalisiert. Hierzu wurden zunächst die terminalen Hydroxygruppen der regenerierten Cellulosemembran mit dem Ethylenglycoldiglycidylether (EGDGE) in Epoxygruppen überführt. Die Epoxy-Membran wurde anschließend mit 1,6-Hexandiamin (HDA) umgesetzt.

Einführung von Epoxy-Gruppen: Eine Lage Membran (0,1 g) wurde in 10 mL 0,3 M EGDGE-Lösung (in 2-Propanol-Wasser-Azeotrop) mit 5 μ L 1 M Kalilauge 20 h bei Raumtemperatur und 700 rpm inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen.

Amino-Funktionalisierung: Zu 0,1 g der Epoxy-Membran wurden 10 mL einer 2 %igen Lösung von 1,6-Hexandiamin in 0,1 M Boratpuffer, pH 9,4 gegeben und 20 h bei Raumtemperatur und 1000 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünf Mal mit Wasser gewaschen.

Acid Orange II-Test : Zur Überprüfung der Funktionalität der hergestellten Aminomembran wurde der Acid Orange II-Test durchgeführt. Das Prinzip des Tests beruht auf der ionischen Wechselwirkung des Acid Orange-Farbstoffes mit primären Aminen. Bei niedrigen pH-Werten (pH 3) wird ein reversibler Amino-Farbstoff-Komplex gebildet, der bei höheren pH-Werten (pH 12) wieder aufgelöst wird. Der freigesetzte Farbstoff wird dann durch Absorptionmessung bei $\lambda = 480$ nm fotometrisch bestimmt. Durchführung: Die trockene Aminomembran wurde mit 20 mL 0,5 mM Acid Orange II-Lösung (pH 3) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünf Mal mit verdünnter Salzsäure (pH 3) gewaschen. Nach dem Trocknen wurden 2 mL verdünnte NaOH (pH 12) zugegeben und 15 min geschüttelt. Dieser Schritt wurde mit 5 mL NaOH wiederholt. Als Kontrolle wurde auch eine Lage nicht funktionalisierte Membran gleichermaßen behandelt. Die Dichte der auf der Membranoberfläche befindlichen Aminogruppen wurde fotometrisch mit Hilfe einer Kalibrationskurve berechnet.

6.9 Bindung des Targetproteins

Die Funktionalität der Aptamermatrixes wurde anhand der Bindung und Elution von His-Tag Proteinen überprüft.

His-getaggte Targetproteine: Bgl-His, PFEI, pNBE, Bste (Kapitel 3.1.5)

Verwendete Puffer: Bindungspuffer: 50 mM K_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5 (PBS-T)

Waschpuffer: 50 mM K_2HPO_4 , 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5 (PBS-T+NaCl)

und PBS-T+NaCl + 1 M KCl

Elutionspuffer: PBS-T + 1 M Imidazol (PBS-T+Imidazol)

Durchführung: Die Proteinprobe wurde auf die Aptamermatrix gegeben und für 2 h inkubiert. Gewaschen wurde 1 x 10 min mit PBS-T+NaCl, 1 x 10 min mit PBS-T+NaCl + 1 M KCl und 1 x 30 min nochmals mit PBS-T+NaCl. Die Elution wurde mit 1 M Imidazol in PBS-T (1 x 30 min, 2 x 10 min) durchgeführt. Die eingesetzten Volumina wurden an die jeweilige Oberfläche angepasst.

7 Aptamerchromatografie: Experimenteller Teil

Zur Entwicklung der Aptamer-basierten Affinitätschromatografie wurden die in Kapitel 6 vorgestellten gegen His-Tag gerichteten Aptamere verwendet. Diese Aptamere binden Proteinmoleküle, die mit mehreren Histidinresten fusioniert wurden. Da die Fusionierung in der rekombinanten Proteinherstellung eine gängige Methode ist und die Produktion der Proteine mit wenig Kostenaufwand verbunden ist, wäre diese Art der Aptamerchromatografie universell einsetzbar. Außerdem würde sie durch die ebenso milden Aufreinigungsbedingungen eine effektive Alternative zur IMAC bieten, in der zum Teil carcinogene Metallionen Verwendung finden. Da die Metallionen auf der Materialoberfläche nur komplexiert werden, kann ein *Leaching* des Metallliganden von der Säule nicht verhindert werden. Bei den Aptameren soll dagegen die Bindung kovalent erfolgen, so dass eine Auswaschung des Liganden nicht auftreten kann.

Zur Bestimmung der Eignung der Aptamere für die Chromatografie wurde zunächst die Funktionalität der Aptamere mittels SPR nachgewiesen. Anschließend wurden Immobilisierungsstudien durchgeführt, um eine geeignete Matrix zu finden, an der die Aptamere ohne Verlust der Funktionalität kovalent gebunden werden können. Hierfür wurden verschiedene Matrizes mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen getestet. Die Immobilisierung der Aptamere erfolgt dabei über den Amino-Link.

7.1 Bestimmung der Funktionalität der verwendeten Aptamere mittels SPR

Das Messprinzip der Oberflächenplasmonresonanz Spektroskopie basiert auf der Detektion von Massenänderungen in einem evaneszenten Feld. Dieses entsteht an der Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes (Glas und Wasser), wenn polarisiertes, monochromatisches Licht, das von der Seite mit höherem Brechungsindex kommt, unter dem Winkel θ total reflektiert wird. Ist die Glasoberfläche mit einer Edelmetallschicht (z. B. Gold oder Silber) überzogen, führt die Wechselwirkung des evaneszenten Feldes mit den freien Elektronen des Edelmetalls (Oberflächenplasmonen) zu einem Intensitätsminimum des reflektierten Lichtes. Bei Adsorption von Molekülen an die dünne Metallschicht verändern sich die Resonanzbedingungen und es kommt zu einer Verschiebung des Intensitätsminimums. Die Resonanzenergie ist dabei proportional zur Massenkonzentration. Mit der SPR können markierungsfreie Assays aufgebaut werden, indem an die Sensorchipoberfläche Biomoleküle wie z. B. Proteine, Peptide und Nucleinsäuren immobilisiert werden und mögliche Targets über die funktionalisierte Chipoberfläche gespült wird. Der zeitliche Verlauf der Assoziation bzw. Dissoziation des Analyten wird über die Messung des veränderten Winkels erfasst und dient der Bestimmung von kinetischen Parametern.

Zur Untersuchung der Interaktion immobilisierter Aptamere mit ihren Targets wurde in dieser Arbeit eine Goldchipsensoroberfläche mit dem 6H5- bzw. 6H7-Aptamer funktionalisiert und in steigenden Konzentrationen mit His-getaggttem PFEI inkubiert, wobei zwischen den Messungen mit 1 % SDS regeneriert wurde. Die SPR-Sensorgramme wurden mittels ESPRIT aufgezeichnet. Zum Vergleich wurden analoge Messungen mit einem Antikörper gegen den His-Tag (6His-Antikörper) durchgeführt. Hier erfolgte die Regeneration mit 0,1 M HCl. Eine detaillierte Versuchsdurchführung ist in Kapitel 6.1 beschrieben.

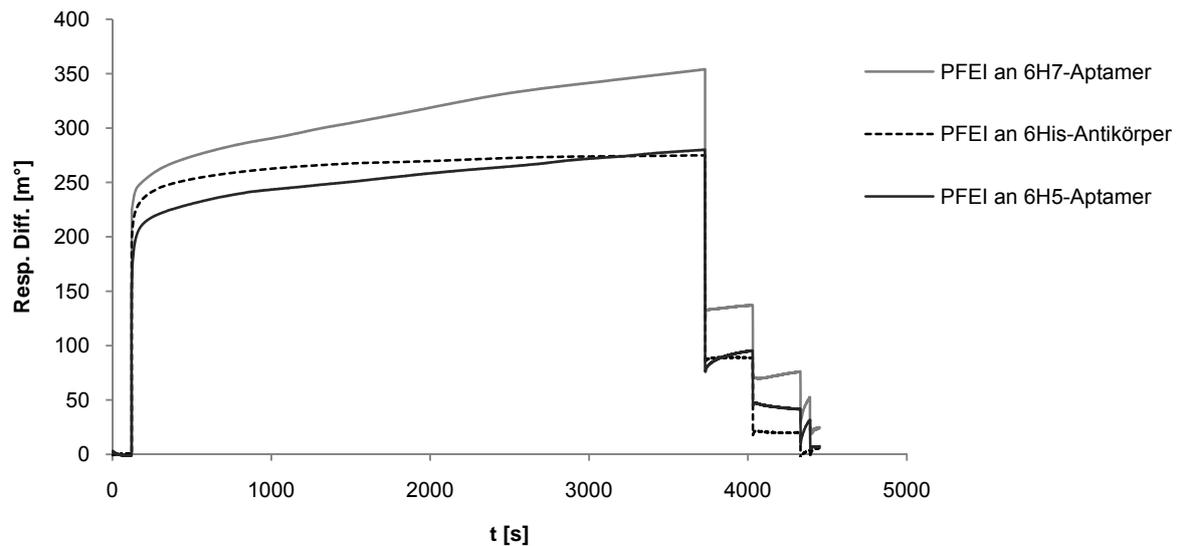


Abbildung 7.1: SPR-Sensorgramme der Interaktionen zwischen dem Aptamer 6H5 bzw. 6H7 sowie dem 6His-Antikörper und PFEI bei 2 mg/mL Analytkonzentration. Aufgetragen ist die Differenz der Winkeländerung zur Referenzzelle (PBS-T) im zeitlichen Verlauf.

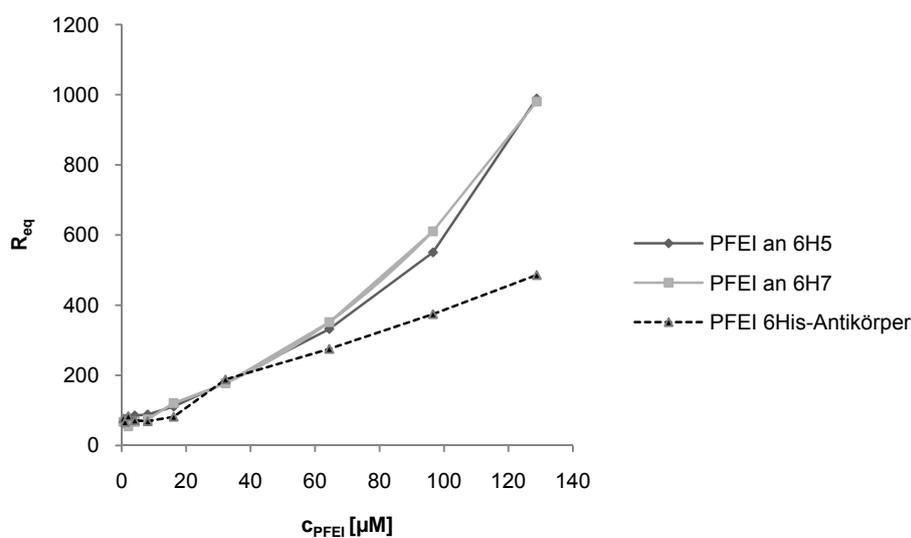


Abbildung 7.2: Mittels SPR bestimmte Bindungsisothermen des His-getaggtten Proteins PFEI an das 6H5- und 6H7-Aptamer sowie an den 6His-Antikörper.

Die Funktionalität der beiden Aptamere 6H5 und 6H7 gegenüber dem His-Tag konnte mittels SPR-Messung nachgewiesen werden (Abbildung 7.1). Bei einer PFEI Konzentration von 2 mg/mL wurden dabei vergleichbare Affinitäten wie beim Antikörper festgestellt. Für genauere Betrachtungen wurden die maximalen SPR-Signale (*Equilibrium Response*, R_{eq}) gegen die Analytkonzentration im Gleichgewicht aufgetragen (Abbildung 7.2). Die PFEI-Bindungsisothermen verlaufen bei niedrigen Targetkonzentrationen für alle drei Liganden ähnlich. Steigt jedoch die Analytkonzentration in Lösung, werden höhere SPR-Signale bei den Aptameren erhalten. Da die Aptamere kleiner sind als der Antikörper, könnte der Aptamerchip mit höheren Ligandendichten besetzt sein und somit mehr Protein adsorbieren als der Antikörperchip. Da die Konzentration an immobilisierten Liganden nicht bekannt ist, ist ein direkter quantitativer Vergleich der Bindungskonstanten und maximalen Bindungskapazitäten zwischen den Aptameren und dem Antikörper nicht möglich. Dennoch konnte mit diesen Experimenten die Funktionalität der Aptamere nachgewiesen werden. Die Aptamere können also unter Erhalt ihrer aktiven Konformation immobilisiert und in der Affinitätschromatografie eingesetzt werden.

7.2 Immobilisierung des 6H7-Aptamers an Epoxy- bzw. Aldehydoberflächen und Bindung / Elution von Bgl-His

Da in der herkömmlichen Affinitätschromatografie zur Immobilisierung von Antikörpern vor allem Epoxyoberflächen verwendet werden, wurden auch hier zunächst diese Matrizes untersucht. Die unter Ringspannung stehenden Epoxygruppen lassen sich unter sehr milden Reaktionsbedingungen nukleophil mit Thiol-, Hydroxyl- oder Aminogruppen öffnen. Eine andere häufig eingesetzte Immobilisierungsmethode ist die Reaktion mit Aldehyd-Gruppen. Aldehyde bilden mit primären und sekundären Aminen Schiffsche Basen, die durch Natriumcyanoborhydrid zu einer stabilen kovalenten Alkylaminbindung reduziert werden.

Zur Testung der beiden Reaktionswege wurde das 6H7-Aptamer an Epoxy aktivierte Sepharose Beads (150 μ L) nach dem Versuchsprotokoll in Kapitel 6.3 immobilisiert. Aldehyd aktivierte Membran (1 cm^2) wurde nach der Vorschrift in Kapitel 6.4 mit dem Aptamer behandelt. Der Erfolg der Immobilisierung bei Epoxy Beads wurde durch einfache Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop ermittelt (siehe Kapitel 6.2). Da die Absorptionsmessung bei der Aldehydmembran durch die Reaktionsprodukte gestört wurde, wurden hier die Fraktionen erst nach Fällung mit Ethanol vermessen. Die Aptamer funktionalisierten Oberflächen wurden mit aufgereinigtem Bgl-His als Modellprotein nach dem Protokoll in Kapitel 6.9 überprüft. Hierzu wurden die Durchlauf-, Wasch- und Elutionsfraktionen per SDS-PAGE qualitativ analysiert.

Obwohl bei der Aldehydoberfläche während der Ethanol-fällung ein Konzentrationsverlust von ca. 50 % auftrat (Probe vor und nach der Fällung vermessen), konnte an beiden Oberflächen eine Immobilisierung des Aptamers festgestellt werden (Tabelle 7.1). Eine Bindung und Elution des His-Tag Proteins an die funktionalisierte Oberfläche konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Anscheinend wird die Aktivität des Aptamers

durch den Immobilisierungsprozess negativ beeinflusst. Da die Epoxy und Aldehyd Gruppen sehr reaktiv sind, reagiert das Aptamer eventuell nicht nur über den terminalen Aminolink, sondern es findet auch eine kovalente Bindung zur Oberfläche innerhalb der Aptamersequenz statt. Die Kopplung ist somit nicht gerichtet und die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur, die zur Targeterkennung notwendig ist, wird behindert. Auch eine Reduzierung der Reaktionstemperatur und Verwendung von PBS-T zur Aptamerimmobilisierung führte bei dem Epoxy-Gel zu keinem Erfolg.

Tabelle 7.1 Immobilisierung des 6H7-Aptamers an Epoxy bzw. Aldehydoberfläche.

	immobilisierte Aptamermenge
Epoxy aktivierte Sepharose Gel	8526 pmol/mL
Aldehydmembran	311 pmol/cm ²

7.3 Carboxylfunktionalisierte Oberflächen in der Entwicklung der Aptamerchromatografie

Da die Immobilisierung der Aptamere an die Goldchipoberfläche für die SPR-Messungen über die EDC-NHS Aktivierung von Carboxylgruppen erfolgreich unter Erhalt der Funktionalität durchgeführt werden konnte, wurde diese Kopplungsmethode auf die Chromatografieentwicklung übertragen. Die Carboxyl-Gruppen der Matrix reagieren dabei mit EDC zu hochreaktiven Esterintermediaten, die mit primären Aminen eine Peptid-Bindung eingehen (Abbildung 7.3). Um die Effizienz der Amid-Bindung zu steigern, wird der Reaktion NHS zugegeben, wobei zunächst aktive NHS-Ester gebildet werden, die weniger anfällig gegenüber einer Hydrolyse sind und im zweiten Schritt mit dem Aminolink des Aptamers reagieren.

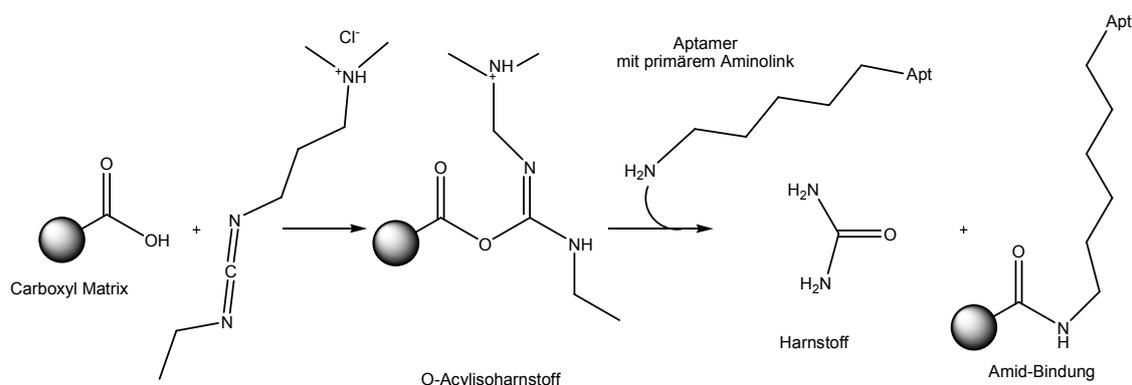


Abbildung 7.3 Aktivierung von Carboxylgruppen und Bildung von Amidbindungen.

Immobilisierung an C- und IDA-Membran

Zunächst wurde versucht, die Carboxyl-Gruppen einer schwachen Kationenaustauschermembran (C-Membran) sowie einer Iminodiessigsäuremembran (IDA-Membran) über EDC-NHS zu aktivieren (siehe Kapitel 6.5) und das 6H7-Aptamer an Membranen zu koppeln. Der Erfolg der Immobilisierung wurde anhand der Bindung von aufgereinigtem Bgl-His überprüft. Die qualitative SDS-PAGE-Analyse der Proteinfractionen zeigte, dass kein Protein gebunden und eluiert werden konnte. Wie bei den Aldehyd-Oberflächen störten die Reaktionsprodukte die Konzentrationsbestimmung durch einfache Absorptionsmessung und es konnte somit nicht ermittelt werden, ob die Kopplung nicht funktioniert hat oder das immobilisierte Aptamer nicht mehr aktiv war. Da diese Membranen ursprünglich nicht zur kovalenten Bindung von Liganden hergestellt wurden, ist es möglich, dass die Carboxyllinker auf den Membranen aufgrund ihrer Länge für eine EDC-NHS Aktivierung nicht geeignet sind und somit die aktivierten Carboxylgruppen untereinander reagieren, ohne das Aptamer zu binden. Diese Vermutung wird durch das Ergebnis des Immobilisierungsversuchs an Carboxyl Magnetpartikel bestätigt.

Aptamerchromatografie auf Basis von Carboxyl Magnetpartikeln

Hierbei wurden Magnetpartikel, die mit Carboxylgruppen versehen sind und in der Affinitätschromatografie häufig eingesetzt werden, wie in Kapitel 6.6 beschrieben, mit dem 6H7-Aptamer funktionalisiert. Auf eine Bildung von NHS-Intermediaten wurde dabei verzichtet und die Immobilisierung als Ein-Schritt-Reaktion durchgeführt. Die Funktionalität der so hergestellten Aptamer Magnetpartikel wurde durch Bindung und Elution von Bgl-His als Modellprotein kontrolliert (Abbildung 7.4).

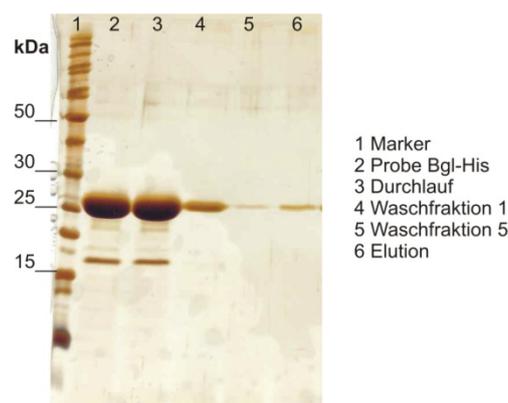


Abbildung 7.4 SDS-PAGE-Gel zur Analyse von Bindung und Elution von Bgl-His an Aptamer funktionalisierte Carboxyl Magnetpartikel (12 %iges Gel, Silber-Färbung).

Es zeigte sich, dass das Protein an die funktionalisierte Magnetpartikel gebunden und wieder eluiert werden konnte. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde folgende Versuchsreihe angesetzt: Um nachzuweisen, dass das Protein spezifisch an das Aptamer und nicht an die

Magnetpartikeloberfläche gebunden wurde, wurden die Beads auch ohne Aptamer als Kontrolle mit dem Protein inkubiert. Die Reproduzierbarkeit dieser Immobilisierungsmethode, die Spezifität der Aptamere sowie der Einfluss des Puffers auf die Immobilisierung und Funktionalität wurde mit dem 6H5-Aptamer untersucht, wobei das Aptamer in MES bzw. PBS-T an die Beads gekoppelt und zur Aufreinigung von PFEI aus dem Zelllysate eingesetzt wurde. Hierzu wurden zunächst 4 x 200 µL Beads (20 mg/mL) in je 100 µL aufgenommen und mit PBS gewaschen. Folgende Ansätze wurden durchgeführt:

1. Ansatz: 100 µL 6H5-Aptamer in MES pH 4,7 (ca. 3 mg/mL) + 30 µL EDC in MES (100 mg/mL).
2. Ansatz: 100 µL 6H5-Aptamer in PBS-T pH 7,5 (ca. 3 mg/mL) + 30 µL EDC in PBS-T (100 mg/mL).
3. Ansatz (ohne Aptamer als Kontrolle): 100 µL MES + 30 µL EDC in MES (100 mg/mL).

In Abbildung 7.5 sind die letzten Waschfraktionen und Elutionen der Versuchsreihe aufgetragen. Eine Bindung und Elution des Enzyms wird nur an in MES immobilisiertem Aptamer festgestellt (siehe Spur 3 und 4). Es sind keine weiteren Banden in den Elutionen zu erkennen, das Protein wurde demnach spezifisch und in hoher Reinheit isoliert. Daraus resultiert auch, dass für die Immobilisierung ein Puffer mit niedrigem pH-Wert notwendig ist, damit die Carboxylgruppen in protonierter Form vorliegen und aktiviert werden können. Die Funktionalität der Aptamere wird durch den Puffer nicht beeinträchtigt. Eine Behinderung der Funktionalität tritt dagegen auf, wenn 3'-modifiziertes Aptamer verwendet wird; es wird keine Proteinbindung festgestellt (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass das Aptamer an dem terminalen Link gekoppelt wird und es entscheidend ist, an welchem Ende das Oligonukleotid modifiziert ist.

Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Immobilisierung über aktivierte Carboxylgruppen in der Aptamerchromatografie eingesetzt werden kann und Magnetpartikel sich als gute Matrices hierfür eignen. Zur Optimierung dieser Methode musste eine Möglichkeit gefunden werden, um die Ligandendichte auf den Magnetpartikeln zu bestimmen.

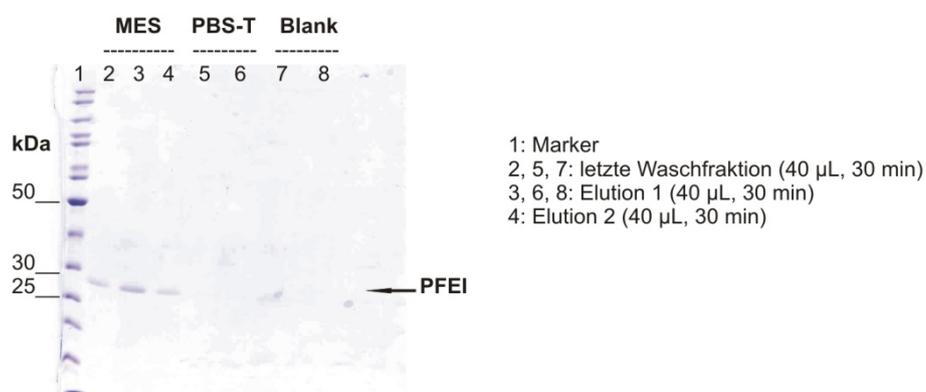


Abbildung 7.5 SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von PFEI aus dem Zelllysate über Aptamer funktionalisierte Carboxyl Magnetic Beads (12 %iges Gel, Coomassie-Färbung). Die Immobilisierung des Aptamers an die Beads erfolgte dabei in MES, PBS bzw. PBS-T. Die Beads wurden auch ohne Aptamer als Kontrolle getestet.

HPLC-Analytik zur Bestimmung der immobilisierten Aptamermenge

Da die Ethanolfällung der Aptamere mit großen Verlusten verbunden war (vgl. Kapitel 7.2), wurde das Problem der Konzentrationsanalyse in den Aptamerfraktionen in Anlehnung an M. Gilar (2001) mittels Reversed Phase HPLC gelöst [109]:

Verwendete Säule: XTerra®MS, C18, 3,5 µm, 20 x 4,6 mm

Eingesetzte Puffer: Mobile Phase A, 0,1 M TEAA, pH 7; B, 100 % ACN

Neben dem in der Literaturstelle angegebenen Gradienten wurden verschiedene Laufbedingungen getestet. In Abbildung 7.6 ist das Chromatogramm mit den optimierten Analysebedingungen am Beispiel des 6H7-Aptamers dargestellt. Es konnte auch eine Standardkurve erstellt werden (Abbildung 7.7).

Die Analytik wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da die Aptamerchromatografie auf Basis von Amino Magnetpartikel entwickelt wurde, bei der die immobilisierte Aptamerkonzentration mittels einfacher Absorptionsmessung bestimmt werden konnte.

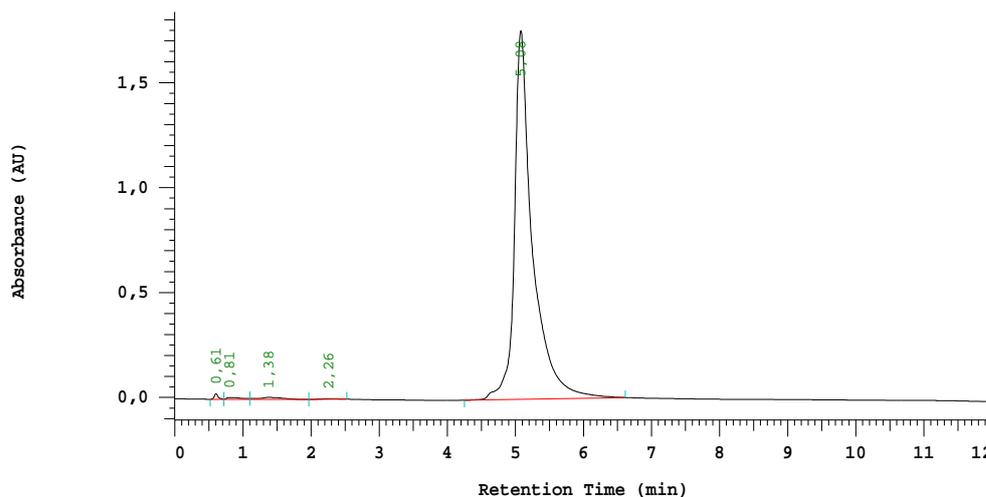


Abbildung 7.6 Chromatogramm der Ionenpaar RP HPLC Analyse des 6H7-Aptamers (1 mg/mL). XTerra®MS, C18, 3,5 µm, 20 x 4,6 mm. Mobile Phase A, 0,1 M TEAA, pH 7; B, 100 % ACN. Injektion 10 µL, 1 min bei 92 % A: 8 % B, in 0,1 min auf 85 % A: 15 % B für 8 min, in 0,1 min auf 92 % A: 8 % B für 3,9 min, 0,5 mL/min, 30 °C, UV 260 nm.

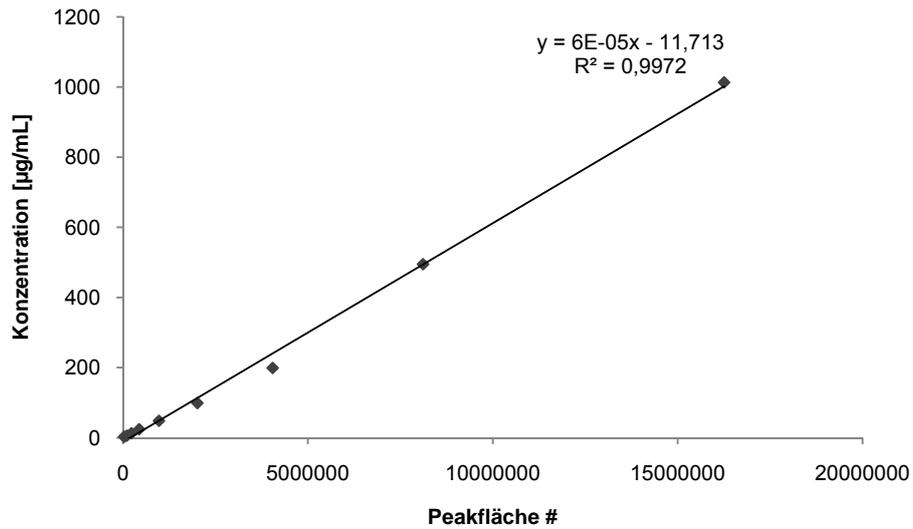


Abbildung 7.7 Mittels Ionenaar RP HPLC erstellte 6H7-Kalibrationsgerade.

7.4 Cyanurchloridaktivierung der Aptamere und Immobilisierung an Amino Magnetic Beads

Viel effizienter als die Immobilisierung an aktivierte Carboxyoberflächen erwies sich die Immobilisierungsmethode über Cyanurchloridaktivierung der Amin funktionalisierten Aptamere und Kopplung an Aminooberflächen (Abbildung 7.8).

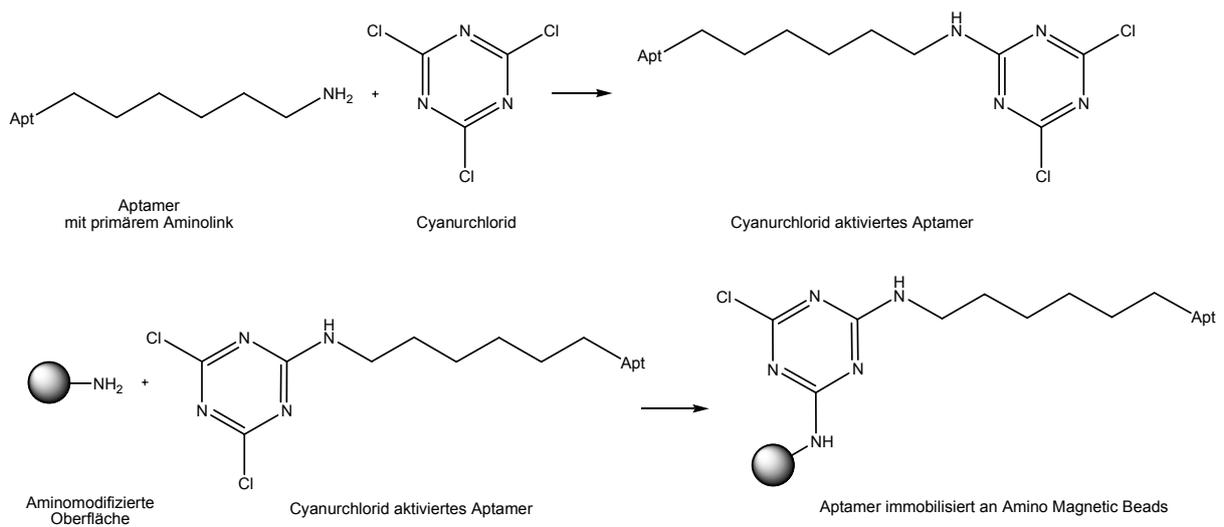


Abbildung 7.8 Cyanurchloridaktivierung der Aptamere mit primärem Aminolink und Immobilisierung an aminomodifizierte Oberflächen.

Nach Van Ness et al. (1991) erfolgt dabei die Aktivierung der Oligonukleotide ausschließlich über die terminale Aminogruppe und nicht über die Basen der Oligonukleotidsequenz, was zu einer gerichteten Immobilisierung führt [110]. Die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur zur Targeterkennung wird dadurch nicht behindert, wobei jedoch ermittelt werden muss, an welchem Ende das Aptamer mit dem Aminolink versehen werden muss, damit die richtige Faltung stattfindet.

Das von Ferguson et al. (1996) vorgestellte Protokoll zur Cyanurchloridaktivierung von Oligonukleotiden [111] wurde in Zusammenarbeit mit Johanna Walter (laufende Dissertation am Institut für Technische Chemie, Universität Hannover [112]) auf Aptamere übertragen und zur Entwicklung Aptamer-basierter Microarrays und Affinitätschromatografie optimiert. Hierbei wurde neben dem Einfluss des molaren Verhältnisses von Aptamer zu Cyanurchlorid auch der Einfluss des Aktivierungspuffers auf die Aptamerimmobilisierung und anschließende Targetbindung untersucht. Unter Variation des molaren Verhältnisses von Aptamer zu Cyanurchlorid (1:0,5; 1:1; 1:5 und 1:100) wurde das 6H7 Aptamer aktiviert an PEI-(Polyethylenimin) Glasoberflächen immobilisiert. Obwohl mit steigender Cyanurchlorid-Konzentration eine Zunahme der Aptamerdichte auf der Glasoberfläche beobachtet wurde, stellte sich für die Effizienz der Targetbindung ein Verhältnis von 1:5 als Optimum dar. Das nach Ferguson et al. vorgestellte Protokoll sieht eine Cyanurchloridaktivierung der Oligonukleotide in 0,1 M Boratpuffer, pH 8,3 vor. Bei der Untersuchung des Puffereinflusses auf die Aktivierung und folglich auf die Ligand-Target-Bindung wurde der Boratpuffer mit dem Selektionspuffer für His-Tag Aptamere (PBS-T) verglichen. Hierbei wurde zwar eine höhere Ligandendichte nach Aktivierung in Borat-Puffer erhalten, aber das in PBS-T aktivierte Aptamer zeigte nach der Immobilisierung eine höhere Affinität gegenüber dem Target [112]. Das optimierte Aktivierungsprotokoll ist in Kapitel 6.7 beschrieben.

Die Anwendung des optimierten Protokolls auf die Aptamerchromatografie erfolgte auf Basis von Amin funktionalisierten Magnetpartikeln. Hierzu wurden die Aptamere 6H5 und 6H7 mit Cyanurchlorid aktiviert und an die Magnetpartikel immobilisiert. Zur Prüfung der Funktionalität der so hergestellten Aptamer-Beads wurden die 6H5 funktionalisierten Beads 2 h mit dem aufgereinigten Protein PFEI in PBS-T inkubiert. Nach Waschen mit PBS-T+NaCl wurde mit PBS-T + 1 M Imidazol eluiert. Zur Kontrolle der spezifischen Bindung wurde das Protein auch mit Magnetpartikeln ohne Aptamerfunktionalisierung inkubiert. Das Ergebnis dieser Versuche ist Abbildung 7.9, links dargestellt. Es wird eine Bindung des Proteins an das Aptamer festgestellt, wobei eine schwache Bindung auch bei den Kontrollbeads zu sehen ist (Spur 6 und 3: Elution 1). Um die unspezifische Adsorption des Proteins an die Magnetic Beads zu unterbinden, wurde ein erneuter Versuch gestartet, wobei die Beads nach dem Binden des Proteins in der vorletzten Waschfraktion mit 1 M KCl in PBS-T+NaCl gewaschen wurden. Die Analyse per SDS-PAGE zeigte, dass das Protein ausschließlich an das Aptamer gebunden wurde (vgl. Spur 10 und 13, Abbildung 7.9, rechts).

Um den Effekt der Aptamermodifizierung auf die Funktionalität des immobilisierten Aptamers aufzuklären, wurde das 6H7-Aptamer am 3'-Ende mit einem Aminolink (C7-NH₂) versehen, wie oben beschrieben an Magnetpartikel gekoppelt und mit dem Zielmolekül inkubiert. Es konnte jedoch keine Proteinbindung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Ohne die richtige Orientierung ist also ein Gelingen einer funktionalen Aptamerimmobilisierung nicht möglich.

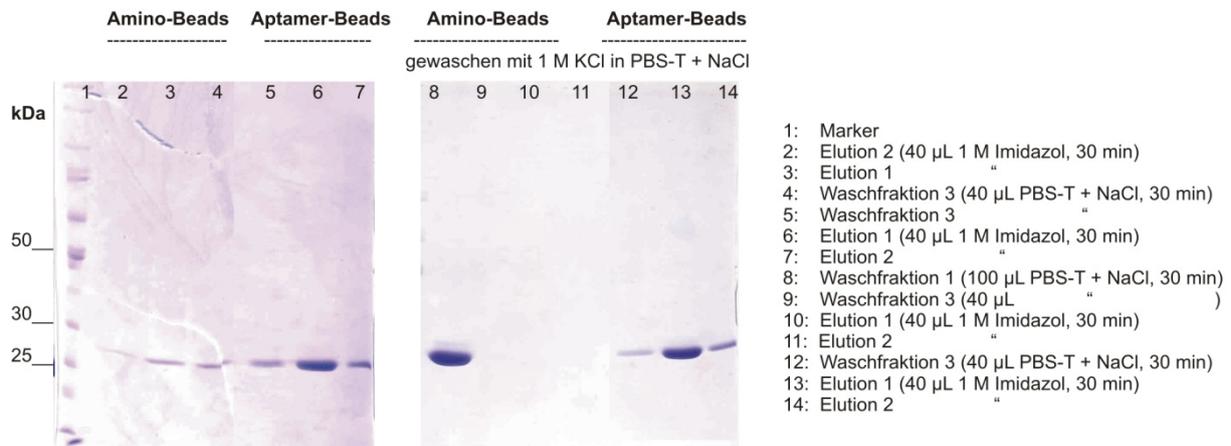


Abbildung 7.9 SDS-PAGE-Analyse der Bindung und Elution von PFEI an über Cyanurchloridaktivierung an Amino Magnetic Beads immobilisiertem Aptamer (12 %ige Gele, Coomassie-Färbung). Zur Kontrolle der spezifischen Bindung wurden auch Amino Beads ohne Aptamer mit dem Protein inkubiert. Links: Waschen nur mit PBS-T+NaCl. Rechts: Waschen mit PBS-T+NaCl + 1 M KCl in der zweiten Waschfraktion.

7.5 Optimierung der Aptamerchromatografie auf Basis von aminomodifizierten Magnetpartikeln

Nach Testung unterschiedlicher Oberflächen und Funktionalitäten konnten die aminogelinkten Aptamere über Cyanurchloridaktivierung an Amino Magnetic Beads erfolgreich immobilisiert und zur Proteinbindung eingesetzt werden. Um die optimalen chromatografischen Bedingungen festzustellen, muss nun die Ligandendichte, aber vor allem die gebundene und eluierte Targetmenge bestimmt werden. Denn entscheidend für den Erfolg der Chromatografie ist nicht die Ligandendichte, sondern die Targeterkennung. Die Ligandendichte wurde durch Konzentrationsbestimmung der Fraktionen mittels Nanodrop ermittelt (siehe Kapitel 6.2).

Da die hohe Imidazolkonzentration im Elutionspuffer (1 M) die herkömmlichen Proteintests wie BCA, Coomassie, und Lowry störte und ein Umpuffern zeit- und kostenaufwendig und mit hohen Proteinverlusten verbunden war, musste zur Bestimmung der eluierten Proteinmenge zunächst eine alternative Analysemethode entwickelt werden (Abschnitt 7.5.1).

Zur Optimierung der Aptamerchromatografie wurden dann die Immobilisierungszeit, der Einfluss der Aptamerkonzentration, die Protein-Aptamer-Interaktionszeit sowie der Einfluss des Elutionspuffers untersucht. Hierbei wurden die beiden gegen His-Tag gerichteten Aptamere 6H5 und 6H7 verglichen. Als Modellprotein wurde das über Metallchelatmembran aufgereinigte Enzym PFEI verwendet. Schließlich wurden die Aptamer-Beads in der Aufreinigung von Proteinen aus dem Zelllysat eingesetzt.

7.5.1 Etablierung eines geeigneten Analyseverfahrens zur Bestimmung der Proteine neben Imidazol

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in imidazolhaltigen Puffern wurden verschiedene Analysemethoden getestet. Hierbei wurde PFEI als Modellprotein eingesetzt.

Größenausschlusschromatografie

Zunächst wurde versucht, die Konzentration des Proteins im Elutionspuffer über die Gelausschlusschromatografie zu ermitteln. Hierzu wurde unter Verwendung eines 35 mM Phosphat-Puffers als Eluent (pH 7,5) jeweils 10 μ L Probe auf eine PSS Proteoma 300 Å-Säule aufgetragen, wobei die Flussrate und Laufzeit variiert wurden. Die Auftrennung zwischen dem Protein und Imidazol gelang jedoch nicht, da die Ausschlussgrenze der Säule anscheinend nicht klein genug war, um den Pufferzusatz vom Proteinpeak zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt).

Kapillarelektrophorese

Des Weiteren wurden Versuche zur kapillarelektrophoretischen Konzentrationsbestimmung des Proteins durchgeführt. In Eriksson et al. (2001) ist das Enzym Alkalische Phosphatase unter anderem mit Hilfe der Kapillarzonenelektrophorese (CZE: *Capillary Zone Electrophoresis*) charakterisiert worden [113]. Die hier beschriebenen Bedingungen wurden für das Enzym PFEI angepasst. Das PFEI konnte als ein scharfer Proteinpeak nachgewiesen werden (Abbildung 7.10). Auch eine Standardkurve konnte erstellt werden (Abbildung 7.11).

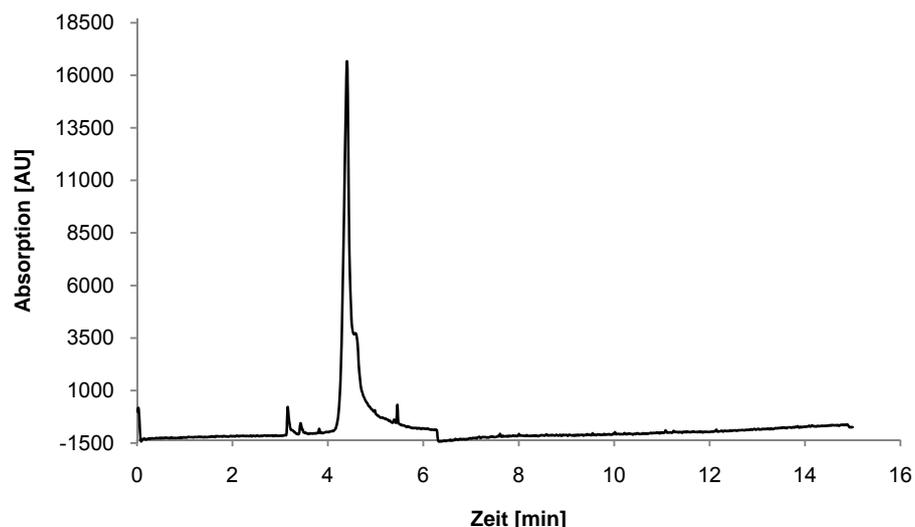


Abbildung 7.10 Elektropherogramm von PFEI in PBS-T. Kapillare: 50 μ m * 40 cm fused silica; Puffer: 0,02 M Tricine, 0,04 M NaCl, pH 8,5; Druckinjektion: 0,5 psi, 10 sec; Spannung: 20 kV; Temperatur: 22 °C.

In 1 M Imidazol änderte sich jedoch die Retentionszeit des Proteins und der Protein-Peak wurde vom Imidazolpeak überlagert. Bei allen PFEI-Konzentrationen wurden ähnliche Elektropherogramme erhalten (beispielhaft dargestellt in Abbildung 7.12). Deshalb wurden für die Messung weitere phosphat-, borat- und citrathaltige Laufpuffer getestet. Auch Zusätze wie SDS und Hydroxyethylcellulose wurden verwendet (MEKC: *Micellar electrokinetic chromatography*). Es konnte aber keine Auftrennung erzielt werden.

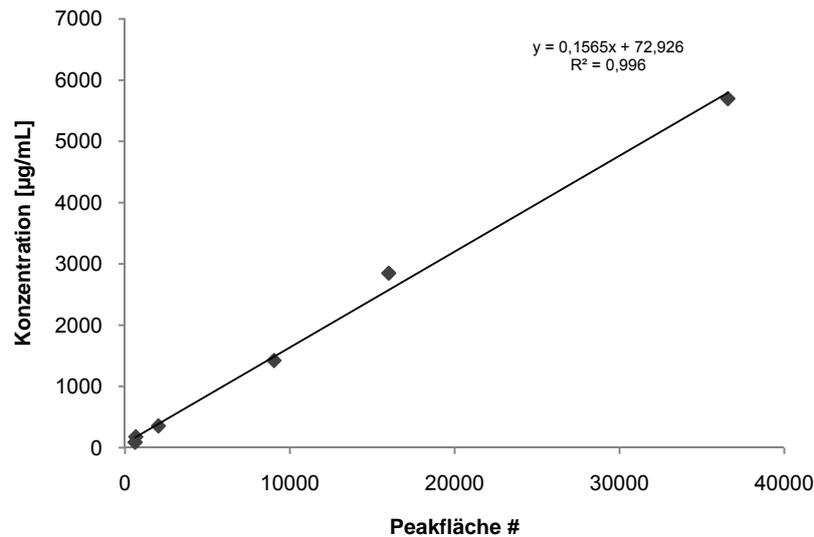


Abbildung 7.11 Mittels CE erstellte Standardkurve PFEI-Standardkurve.

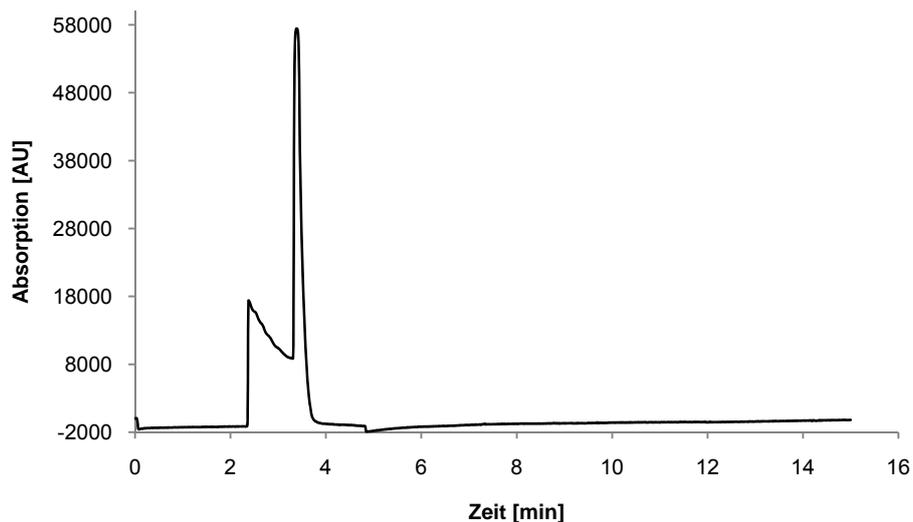


Abbildung 7.12 Elektropherogramm von PFEI in PBS-T + 1 M Imidazol. Kapillare: 50 µm * 40 cm fused silica; Puffer: Tricine; Druckinjektion: 0,5 psi, 10 sec; Spannung: 20 kV; Temperatur: 22 °C.

Densitometrisch-quantitative Bestimmung der Proteine in Imidazol nach SDS-PAGE

Bisher konnte die Bindung und Elution der His-getaggten Proteine an die Aptamere nur auf dem SDS-Gel nachgewiesen werden. Deshalb wurde beschlossen, in Anlehnung an Tomaszewska-Gras et al. (2002) und Wehinger et al. (1970) das Protein im Elutionspuffer densitometrisch auf dem SDS-Gel mittels Coomassie-Färbung zu quantifizieren [114, 115]. Hierzu wurde das SDS-Gel als digitales Bild mit einer Auflösung von 600 dpi eingescannt und mit dem Programm AlphaEaseFC Stand Alone analysiert (Abbildung 7.13). Zur weiteren Auswertung und zur grafischen Darstellung wurden die Daten anschließend in das Microsoft Excel Programm importiert.



Abbildung 7.13 Screenshot der Benutzeroberfläche des AlphaEaseFC Stand Alone Programms.

Da zur Bestimmung der Proteinmenge auf dem Gel ein Standard notwendig ist, wurde ein Proteingemisch aus Transferrin, BSA, Trypsinogen und Lysozym hergestellt und als Massenstandard getestet. Hier wurde festgestellt, dass die einzelnen Proteine bei gleicher Konzentration von dem Coomassie-Farbstoff unterschiedlich stark gefärbt werden und sich solch ein Gemisch nicht als Massenstandard eignet.

Die Quantifizierung musste also bezogen auf einen einzelnen geeigneten Proteinstandard erfolgen. Zur Ermittlung des Standards wurde erst anhand des MicroBCA Tests die Konzentration des aufgereinigten und umgepufferten PFEI-Enzyms bestimmt. Dann wurden in jede Tasche eines SDS-Gels die oben genannten Proteine und das Enzym in der gleichen Menge aufgetragen. Bei der anschließenden densitometrischen Untersuchung der einzelnen Proteinbanden wurde ermittelt, dass BSA mit der gleichen Intensität wie PFEI durch Coomassie gefärbt wird. Dies wurde mit einem zweiten Gel bestätigt, indem die beiden Proteine in drei verschiedenen Konzentrationen einzeln und als Gemisch aufgetragen wurden

(siehe Gelbild in Abbildung 7.13). Die Auswertung des Gels ist in Tabelle 7.2 wiedergegeben. Es wird festgestellt, dass sich das Enzym mit dieser Methode gut quantifizieren lässt. Der Vorteil von BSA ist auch, dass sich dessen Molekulargewicht um ca. 35 kDa von PFEI unterscheidet und somit als interner Standard bei den Elutionsfraktionen verwendet werden kann.

Die Untersuchung der Sensitivität und des linearen Arbeitsbereichs ergab, dass bei einem Probenauftrag von 20 µL (Gel mit 10 Taschen) zwischen 6,25 und 200 µg/mL BSA eine Standardkurve erstellt werden konnte (Abbildung 7.14). Die SDS-PAGE Analysemethode wurde somit zum quantitativen Nachweis von Proteinen neben Imidazol etabliert.

Tabelle 7.2 Berechnung der Konzentrationen für BSA und PFEI einzeln und im Gemisch aus den Intensitäten für BSA in Spur 5 (200 µg/mL), 6 (100 µg/mL) und 7 (50 µg/mL) (siehe obere Bande auf dem Gelbild in Abbildung 7.13).

Spur	eingesetzt [µg/mL]	Peakfläche #	berechnet µg/mL
2	200 PFEI	6969	204,5
3	100 PFEI	4249	123,5
4	50 PFEI	2097	59,3
5	200 PFEI	6943	203,7
6	100 PFEI	3796	110,0
7	50 PFEI	2140	60,6
8	200 BSA	6710	196,8
9	100 BSA	3143	90,5
10	50 BSA	1338	36,7

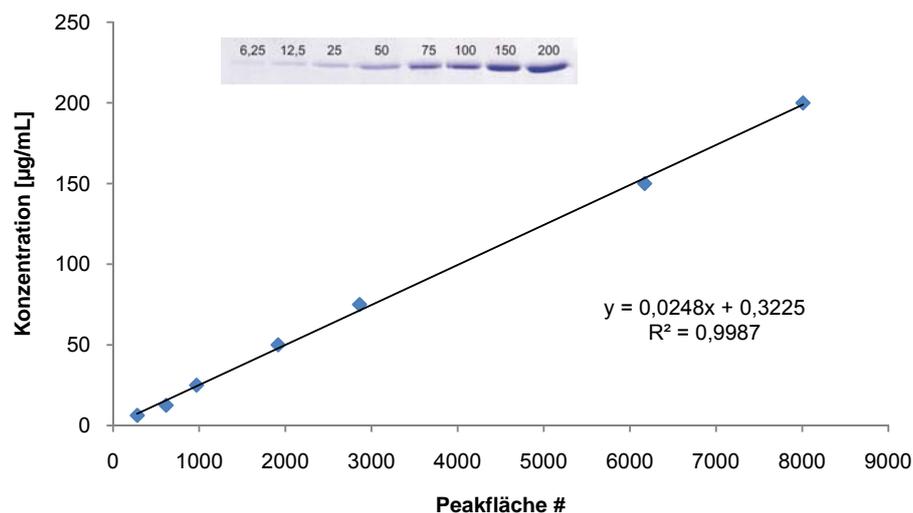


Abbildung 7.14 Mittels SDS-PAGE densitometrisch ermittelte BSA-Kalibrationsgerade.

7.5.2 Bestimmung der Aptamer-Immobilisierungszeit

Bei der schrittweisen Optimierung der Aptamerchromatografie wurde zunächst die optimale Zeit für die Immobilisierung der Aptamere bestimmt. Folgende Zeiten wurden dabei betrachtet: 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 22 h. Für jeden Zeitpunkt wurden jeweils 3 x 100 μ L Beads in eine Mikrotiterplatte eingeführt. Um den Überstand zu entfernen, wurde die Platte auf einen Magnetblock gesetzt, so dass die Magnetpartikel auf dem Plattenboden festgehalten und nicht mit heraus pipettiert wurden. Nach Waschen mit PBS wurden die Beads mit je 100 μ L 6H5 (1455 μ g/mL) bzw. 6H7 (1331 μ g/mL) in PBS versetzt und bei Raumtemperatur unter Schütteln bei 900 rpm inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde drei Mal für 10 min mit 100 μ L PBS gewaschen. Durch Subtraktion der Konzentration in den Überständen und Waschfraktionen von den eingesetzten Probelösungen wurde die jeweils immobilisierte Aptamermenge ermittelt (Abbildung 7.15).

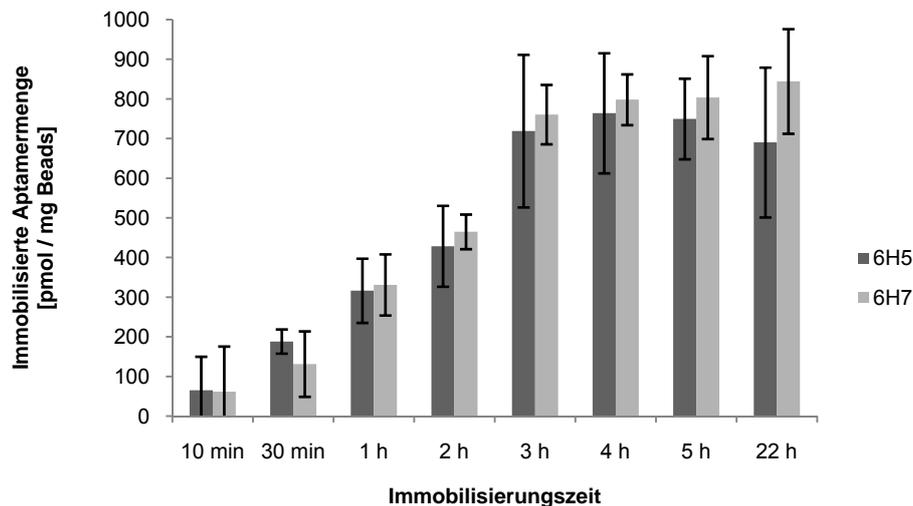


Abbildung 7.15 Bestimmung der Immobilisierungszeit der Aptamere 6H5 und 6H7 an Amino Magnetic Beads.

Die Immobilisierung nach Cyanurchloridaktivierung verläuft unabhängig vom Aptamer. Nach einer Reaktionsdauer von 2 h wird mehr als die Hälfte der maximalen Ligandendichte erreicht und nach 3 h ist die Reaktion beendet. Für den Einsatz in der Affinitätschromatografie ist jedoch nicht die Ligandendichte, sondern die Affinität der Beads zum Targetmolekül entscheidend. Deshalb wurde der Einfluss der Immobilisierungszeit auf die Proteinbindung untersucht. Hierzu wurden die Beads in einer 1 mg/mL PFEI-Probe für 2 h inkubiert. Nach dem Waschen wurde das gebundene Protein mit Imidazol eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der Proteine im Elutionspuffer wurde nach dem in Abschnitt 7.5.1 ermittelten Protokoll durchgeführt.

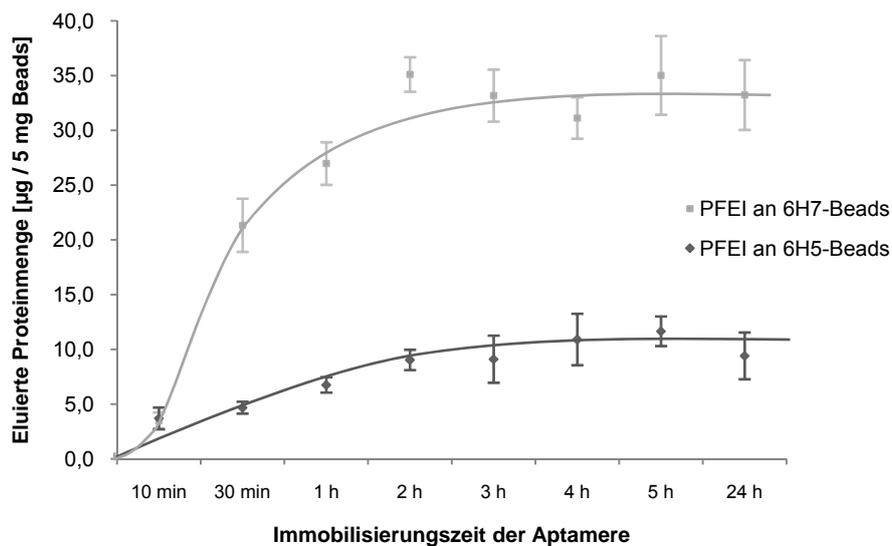


Abbildung 7.16 Abhängigkeit der Proteinbindung von der Immobilisierungszeit der Aptamere.

Abbildung 7.16 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen. Im Gegensatz zur Aptamerdichte wird nach 2 h Immobilisierungszeit nur noch ein geringer Anstieg der eluierten Proteinmenge festgestellt. Offensichtlich wird ab einer bestimmten Ligandendichte die Targetbindung begrenzt. Vermutlich behindern die immobilisierten Aptamere aufgrund sterischer und elektrostatischer Wechselwirkungen sich gegenseitig in der Ausbildung ihrer dreidimensionalen Struktur und somit in der Targeterkennung. Durch diese Wechselwirkungen könnte auch die Zugänglichkeit des Targets an die Bindungsstelle des Aptamers beeinträchtigt werden. Infolge dieser Ergebnisse wird in weiteren Versuchen für beide Aptamere eine Immobilisierungszeit von 2 h als optimal angenommen.

7.5.3 Abhängigkeit der Aptamerdichte von der Immobilisierungskonzentration

Nach Ermittlung der Immobilisierungszeit sollte der Einfluss der Aptamerkonzentration auf die Ligandendichte geprüft werden. Hierfür wurden die Aptamere in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und für 2 h inkubiert. Anhand der Absorptionmessung von Überständen und Waschfraktionen wurden die immobilisierten Aptamerdichten errechnet.

In Abbildung 7.17 sind die eingesetzten Aptamerkonzentrationen und die resultierenden Aptamerdichten dargestellt. Unabhängig vom Aptamer nimmt mit steigender Anfangskonzentration die Belegungsdichte auf der Beadoberfläche zunächst zu, erreicht ein Maximum bei ca. 1500 µg/mL und nimmt dann wieder ab. Eine Erklärung für diese Abnahme könnte die intermolekulare Reaktion der aktivierten Aptamere untereinander sein, die eventuell in solch hohen Konzentrationen zu Basenpaarbindungen zwischen den Einzelsträngen führt und eine Immobilisierung der Oligonukleotide verhindert.

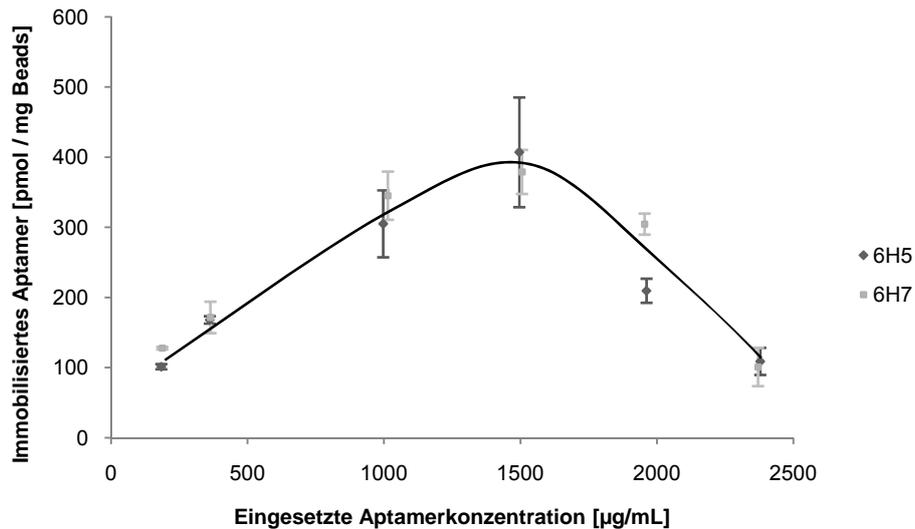


Abbildung 7.17 Abhängigkeit der Aptamerimmobilisierung von der eingesetzten Aptamerkonzentration.

Die Affinitäten der Aptamer-Beads in Abhängigkeit von den Anfangskonzentrationen wurden anhand der Proteinbindung überprüft. Im Gegensatz zur Aptamerimmobilisierung ist in Abbildung 7.18 eine deutliche Sättigungskurve für beide Aptamere zu erkennen. Ab einer Aptamerkonzentration von 500 µg/mL wird keine nennenswerte Zunahme der Affinität festgestellt. Dieses Resultat stützt die oben genannte Vermutung, dass durch die steigende Ligandendichte die Zugänglichkeit des His-Tag Proteins an die Bindungsstelle des Aptamers durch benachbarte Aptamer-moleküle erschwert wird und somit entgegen der Erwartung keine Erhöhung der Affinität gegenüber dem Protein auftritt.

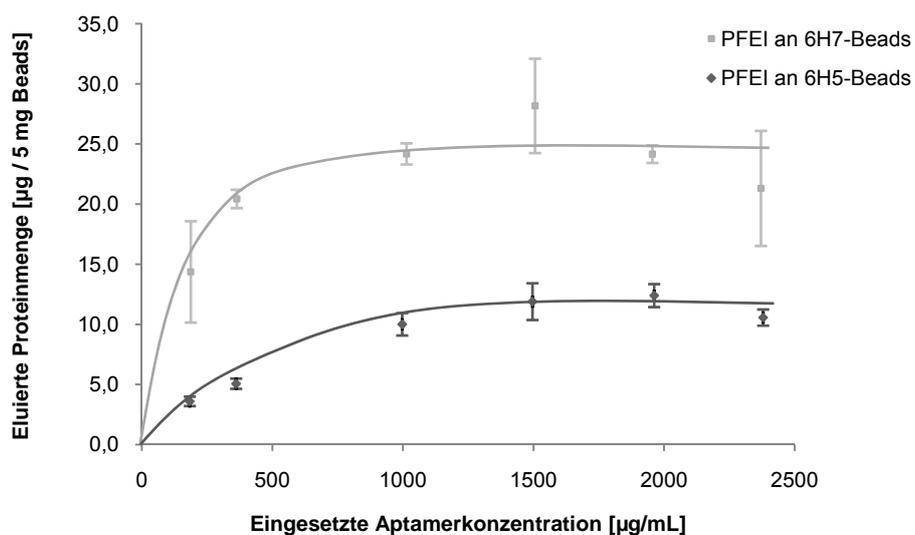


Abbildung 7.18 Einfluss der eingesetzten Aptamerkonzentration auf die Proteinbindung.

Aus diesen Experimenten wurde sowohl für 6H5 als auch für 6H7 eine Aptamerkonzentration von 1 mg/mL als Optimum ermittelt und für die weiteren Optimierungsversuche eingesetzt.

7.5.4 Variation der Protein-Aptamer-Interaktionszeit

Zur Verwirklichung einer effizienten Affinitätschromatografie ist die Kontaktzeit des Targetmoleküls mit dem matrixgebundenen Liganden ein entscheidender Faktor. Ist die Interaktionszeit zu kurz, kommt es nicht zu einer Bindung des Zielmoleküls und die Kapazität der Affinitätsmatrix wird nicht vollständig ausgeschöpft. Inkubiert die komplexe Targetmischung (z. B. das Zelllysate) jedoch zu lange mit der stationären Phase, führt dies möglicherweise zur Denaturierung des Zielmoleküls und zu einer verkürzten Lebensdauer der Matrix.

Um die beste Protein-Aptamer-Interaktionszeit herauszufinden, wurden aktivierte 6H5 und 6H7-Lösungen (1 mg/mL) für 2 h mit den Amino-Beads (100 μ L) inkubiert. Unter Variation der Interaktionszeit wurde anschließend eine 1 mg/mL PFEI-Probe an die Beads gebunden und eluiert (Abbildung 7.19). Bis zu 2 h Interaktionszeit ist ein Anstieg in der Proteinbindung zu erkennen. Bei längeren Inkubationszeiten nimmt die gebundene Proteinmenge wieder ab. Der Grund für die Abnahme der Proteinbindung mit der Zeit liegt höchstwahrscheinlich an der Instabilität des Enzyms, das sogar in 50 % Glycerin gelagert werden muss, um ein Ausfallen zu verhindern.

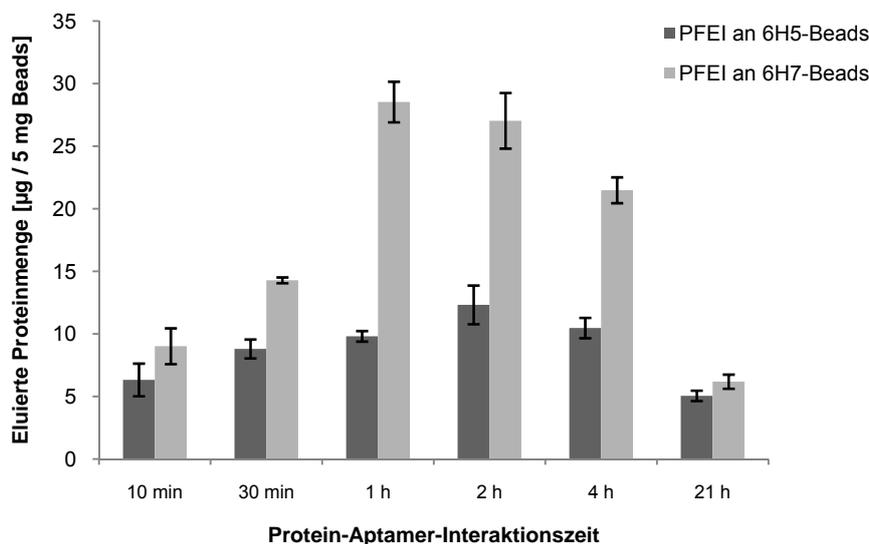


Abbildung 7.19 Auswirkung der Protein-Aptamer-Interaktionszeit auf die Proteinbindung.

7.5.5 Optimierung der Elutionsbedingungen

Bisher wurde, wie in der Patentschrift US 2005/0142582 A1 angegeben, mit PBS-T + 1 M Imidazol eluiert. Es sollte nun untersucht werden, ob mit einer geringeren Imidazol-Konzentration das Protein von den Beads verdrängt werden kann, um so eventuell in ein für Standardproteintests kompatiblen Bereich zu gelangen und auch das Umpuffern des aufgereinigten Proteins zu vereinfachen. Hierzu wurden die Aptamer-Beads mit 1 mg/mL PFEI-Lösung inkubiert und gewaschen. Zur Elution von PFEI wurden PBS-T-Puffer mit Imidazolkonzentrationen von 100, 250, 500, 750 und 1000 mM eingesetzt. Um eine maximale Elution des Proteins zu bewirken, ist 1 M Imidazol notwendig (Abbildung 7.20).

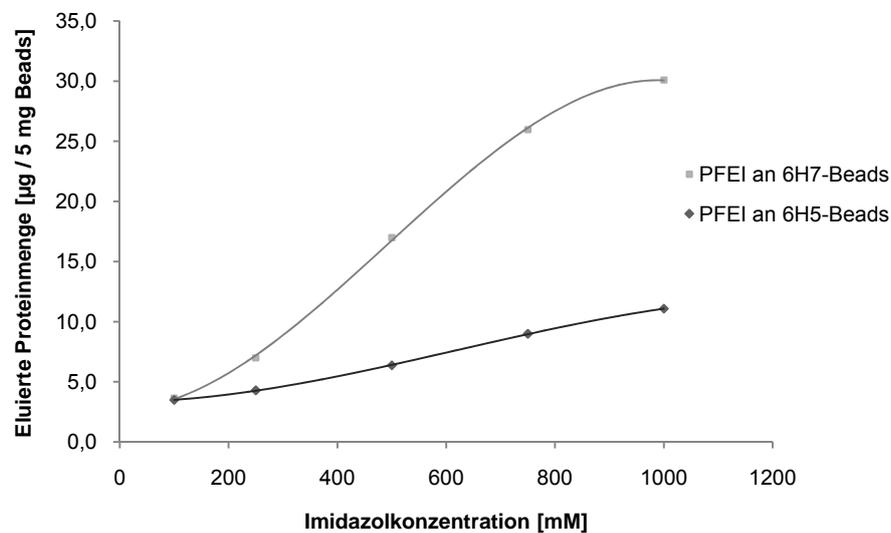


Abbildung 7.20 Eluierte Proteinmenge in Abhängigkeit von der Imidazolkonzentration.

7.6 Charakterisierung der Aptamerbeads

Nach Optimierung der Aptamerimmobilisierung, Proteinbindung und -elution wurden nun zur Charakterisierung der Aptamerbeads die maximalen Bindungskapazitäten und die jeweiligen Dissoziationskonstanten anhand der Frontalanalyse ermittelt. Hierzu wurden die Amino-Magnetic Beads mit 6H5 bzw. 6H7 funktionalisiert. Das aufgereinigte Enzym PFEI wurde in Konzentrationen von 0,1, 0,3, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 mg/mL auf die Beads aufgetragen und für 2 h inkubiert. Nach dem Waschen der Partikel zur Entfernung des unspezifisch gebundenen Proteins wurde mit Imidazol eluiert. Abbildung 7.21 zeigt die Isothermen für die Adsorption von PFEI an die beiden Aptamerbeads. Die PFEI-Isotherme an 6H7-Beads weist gegenüber der Isotherme an 6H5-Beads neben einer höheren Kapazität auch eine höhere Affinität zur stationären Phase auf.

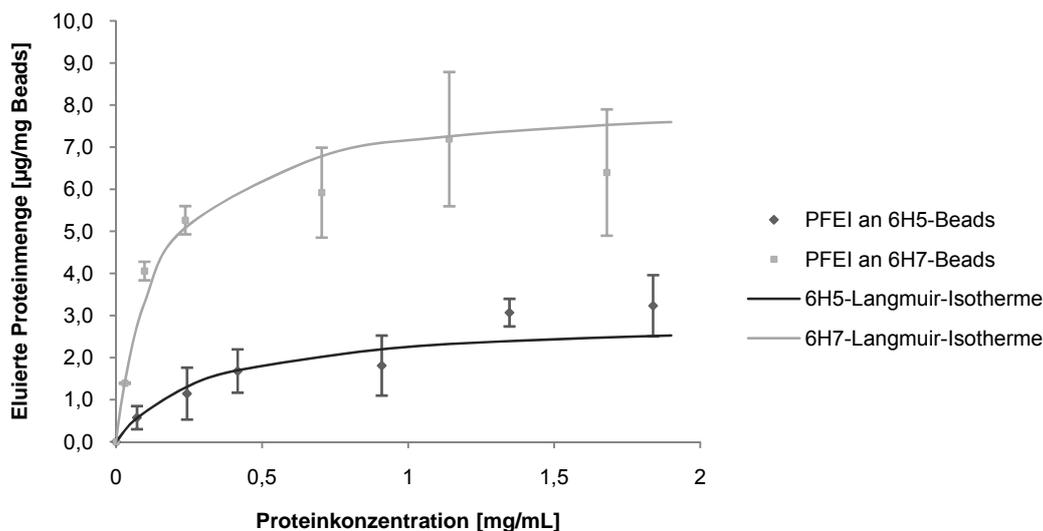


Abbildung 7.21 Bindungsverhalten von PFEI an Aptamer-Beads.

Unter Verwendung der Langmuir-Gleichung wurden aus der linearisierten Darstellung der Werte die maximalen Bindungskapazitäten und Dissoziationskonstanten kalkuliert (Tabelle 7.3).

Obwohl gleiche Ligandendichten bei beiden Aptamerbeads erreicht werden, ist die maximale Bindungskapazität der 6H7-Beads um den Faktor 2,8 erhöht. Während also bei den 6H5-Beads jedes vierte Aptamer-molekül das Protein bindet, liegt das Verhältnis bei 6H7-Beads bei 0,66. Mit Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich liegt das Gleichgewicht zwischen Bildung und Zerfall des Aptamer-Protein-Komplexes auf der Seite der Komplexbildung, wobei für 6H7-Beads eine etwa doppelt so große Affinität festgestellt wird wie für die 6H5-Beads. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde aus den Microarray-Experimenten [112]. In Tabelle 7.4 sind für die beiden Aptamerbeads die Wiederfindungsraten ermittelt worden. Mit Wiederfindungsraten über 75 % sind beide Aptamerbeads in der Aufreinigung von His-Tag-Proteinen effizient einsetzbar.

Tabelle 7.3 Parameter der für die Aptamerchromatografie ermittelten Isothermen.

	6H5-Beads	6H7-Beads
Ligandendichte [pmol/mg Beads]	400	400
q_{max} [µg/mg Beads]	2,9	8,2
q_{max} [pmol/mg Beads]	94	263
Kapazität / Ligandendichte	0,24	0,66
K_{Diss} [M]	9,7 x 10 ⁻⁶	4,6 x 10 ⁻⁶

Tabelle 7.4 Berechnung der Wiederfindungsraten für die Aptamer-Beads mittels Gelauswertung. Jeweils 100 μL Beads (5 mg) wurden mit PFEI beladen und eluiert. Die Konzentrationen der Überstände, der einzelnen Wasch- und Elutionsfraktionen wurden elektrophoretisch bestimmt.

	6H5-Beads	6H7-Beads
Probe [μg]	150	100
Überstand [μg]	123,5	51,5
Summe Waschfraktion 1-3 [μg]	12,3	8,2
Beladung [μg]	14,2	40,3
Summe Elution 1-3 [μg]	10,9	30,1
Wiederfindungsrate [%]	77	75

7.7 Anwendung der Aptamerchromatografie: Aufreinigung von His-Tag Proteinen aus Zelllysaten

Die bisher vorgestellten Versuche wurden mit einem aufgereinigten His-Tag Protein durchgeführt. Um die Anwendung der entwickelten Aptamerchromatografie auf reale Proben zu demonstrieren, wurden die beiden Aptamerbeads (6H5 und 6H7) zur Aufreinigung der His-getaggten Enzyme PFEI (6H5), pNBE (6H5) und Bste (6H7) aus dem Zelllysate eingesetzt (siehe Abbildung 7.22). In den Elutionen (Spur 4, 8 und 13) erkennt man, dass die Enzyme in hoher Reinheit (> 93 %) isoliert werden konnten. Hier wird außerdem festgestellt, dass die Affinität der Aptamere zu den einzelnen Enzymen unterschiedlich ist (vgl. Spur 4 und 8). Eine Erklärung hierfür könnte in der Zugänglichkeit des His-Tags für das Aptamer liegen. Wird die durch die Tertiärstruktur des Targetproteins der Zugang zum His-Tag eingeschränkt, kann die Bindung zum Protein nicht stattfinden.

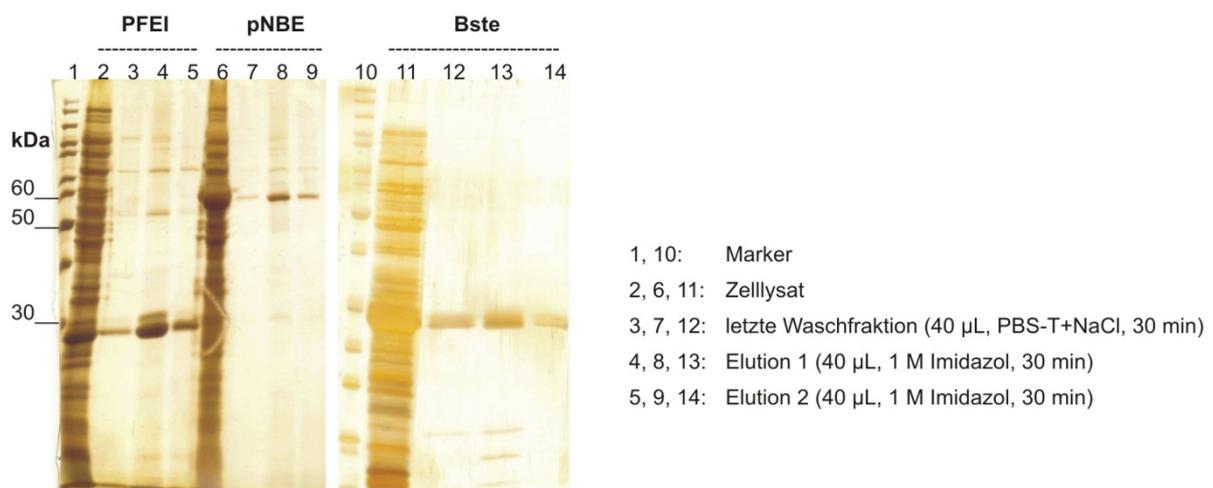


Abbildung 7.22 SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung von His-getaggten Proteinen aus den Zelllysaten über Aptamerchromatografie (12 %ige Gele, Silber-Färbung). Die Aptamere 6H5 und 6H7 wurden über Cyanurchloridaktivierung an aminofunktionalisierte Magnetpartikel immobilisiert. Die 6H5-Beads wurden zur Aufreinigung von PFEI und pNBE und 6H7 zur Aufreinigung von Bste verwendet.

Zwei unverzichtbare Faktoren für eine effiziente Chromatografie sind die Wiederverwendbarkeit und Langzeitstabilität der stationären Phase. Diese wurden für die Aptamerchromatografie anhand der Aufreinigung von PFEI aus dem Zelllysats untersucht.

7.7.1 Untersuchung der Wiederverwendbarkeit der Aptamerbeads

Um die Wiederverwendbarkeit der entwickelten Aptamerchromatografie zu untersuchen, wurden die beiden Aptamere 6H5 und 6H7 an Amino Magnetic Beads immobilisiert und mehrfach zur Aufreinigung von PFEI aus dem Zelllysats eingesetzt. Die eluierte Proteinmenge nach jeder Verwendung wurde densitometrisch bestimmt (Abbildung 7.23). Hierbei wird nach 6-facher Verwendung eine Abnahme der eluierten Proteinmenge von 44 % bei 6H5- und 32 % bei 6H7-Beads festgestellt. Zum Teil hängt dieser Kapazitätsverlust damit zusammen, dass der Pipettierroboter während des Pipettierens der Magnetpartikel von well zu well Partikel verliert und letztlich weniger Partikel zur Verfügung stehen als zum Anfang des Experiments. Zum anderen ist die nicht vollständige Regeneration der Partikel nach der Elution für die sinkende Bindungskapazität verantwortlich. Vermutlich binden die Imidazolmoleküle wie bei den Metallchelatoberflächen so stark an die Aptamere, dass sie durch das Protein nicht komplett verdrängt werden können. Deshalb sollte nach effektiveren Regenerationspuffern gesucht werden.

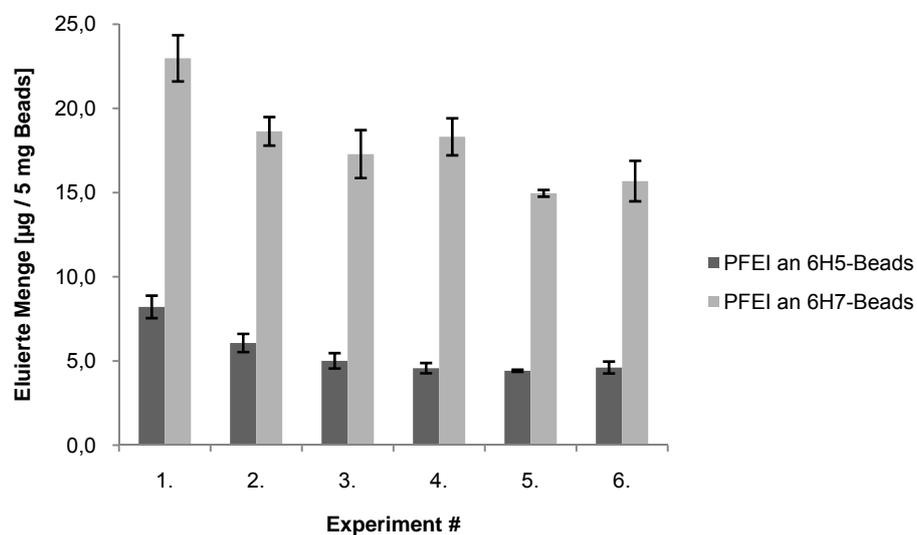


Abbildung 7.23 Wiederholte Aufreinigung von PFEI aus dem Zelllysats mittels Aptamerbeads.

7.7.2 Untersuchung der Langzeitstabilität der immobilisierten Aptamere

Ob und wie lange die Aptamerbeads gelagert werden können, wurde anhand von Magnetpartikeln untersucht, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Aptamer modifiziert, mindestens einmal verwendet und nach Äquilibrieren mit dem Bindungspuffer bei 4 °C aufbewahrt wurden. Als Proteinlösung wurde 1 mg/mL aufgereinigtes PFEI verwendet. Die Ergebnisse der Stabilitätstests sind in Abbildung 7.24 wiedergegeben. Verglichen wurden dabei die Konzentrationen in den ersten Elutionsfraktionen. Die Funktionalität der Aptamerbeads wird durch Lagerung nicht beeinträchtigt und eine Aufbewahrung bei 4 °C über 6 Monate stellt kein Problem dar. Die Bindungskapazität bleibt relativ konstant. Die etwas niedrigere Bindungskapazität bei den 107 Tage alten Aptamerbeads resultiert aus dem mehrfachen Einsatz dieser Beads in der Proteinaufreinigung, alle anderen wurden vor der Durchführung des Stabilitätstests lediglich einmal verwendet.

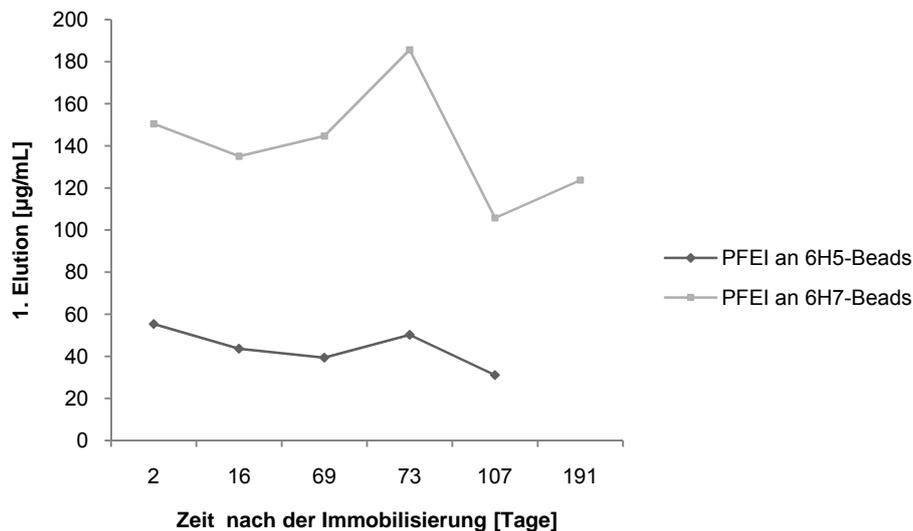


Abbildung 7.24 Untersuchung zur Langzeitstabilität der Aptamerbeads. Getestet wurden Magnetpartikel, die zu den angegebenen Immobilisierungszeitpunkten mindestens einmal verwendet wurden. Die Beads von vor 107 Tagen wurden mehrmals benutzt.

7.8 Versuche zur Entwicklung Membran-basierter Aptamerchromatografie

Um die Vorteile von Membranadsorbentien in der Aptamerchromatografie ausnutzen zu können, wurde versucht, eine Membran-basierte Aptamerchromatografie zu entwickeln. Hierzu wurde eine regenerierte Cellulose Membran verwendet (Abbildung 7.25).

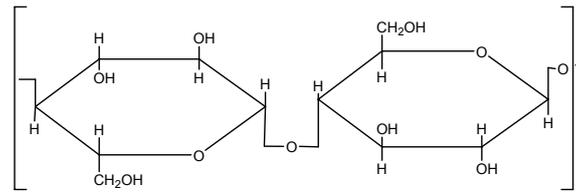


Abbildung 7.25 Struktur von Cellulose.

Diese wurde nach Kroll et al. (2007) mit primären Amino-Gruppen funktionalisiert [116]. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Kapitel 6.8 beschrieben. Dabei wurden zunächst die terminalen Hydroxygruppen der regenerierten Cellulosemembran mit dem Ethylenglycoldiglycidylether (EGDGE) in Epoxygruppen überführt (Abbildung 7.26). Die Epoxy-Membranen wurden anschließend mit 1,6-Hexandiamin (HDA) umgesetzt (Abbildung 7.27). Zur Überprüfung der Funktionalität der hergestellten Aminomembran wurde der Acid Orange II-Test durchgeführt (vgl. Abschnitt 6.8). Die Dichte der auf der Membranoberfläche befindlichen Aminogruppen wurde mit Hilfe einer Kalibrationskurve berechnet und betrug $2,5 \mu\text{mol/g}$ bzw. 15 nmol/cm^2 .

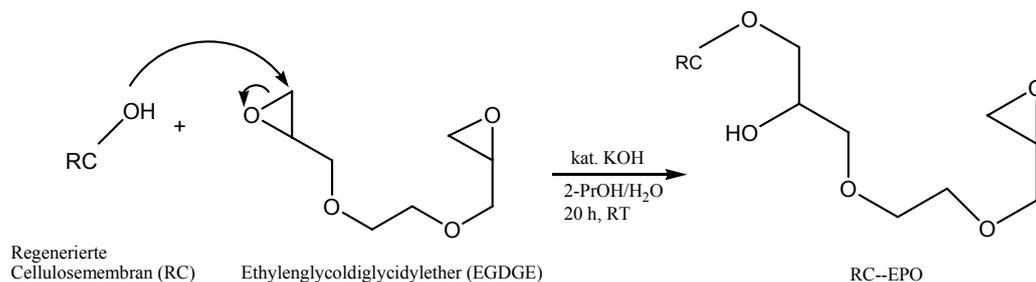


Abbildung 7.26 Einführung von Epoxygruppen an eine regenerierte Cellulose Membran.

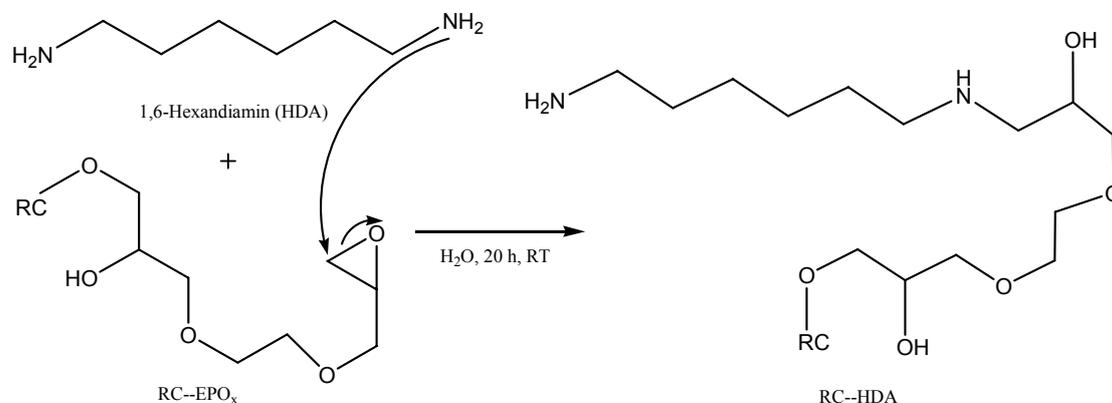


Abbildung 7.27 Aminfunktionalisierung der RC-Membran.

Um die Eignung der hergestellten Aminomembran für den Einsatz in der Aptamer-basierten Affinitätschromatografie zu überprüfen, wurde wie bei den NH₂-Magnetic Beads verfahren. Hierzu wurde eine 8,67 cm² Membran mit 200 µL aktiviertem 6H7-Aptamer (973 µg/mL) versetzt und 2 h inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde die immobilisierte Aptamermenge mit 34 µg (2,7 nmol) bestimmt, was einer Konzentration von 0,31 nmol/cm² entspricht.

Zur Untersuchung der Aptamermembran wurden 200 µL aufgereinigte Bgl-His-Probe (4 mg/mL) auf die Membran gegeben und für 2 h inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS-T+NaCl wurde mit PBS-T+Imidazol und 0,05 % SDS eluiert. Es wurde auch eine aminofunktionalisierte Membran ohne Aptamer als Kontrolle getestet.

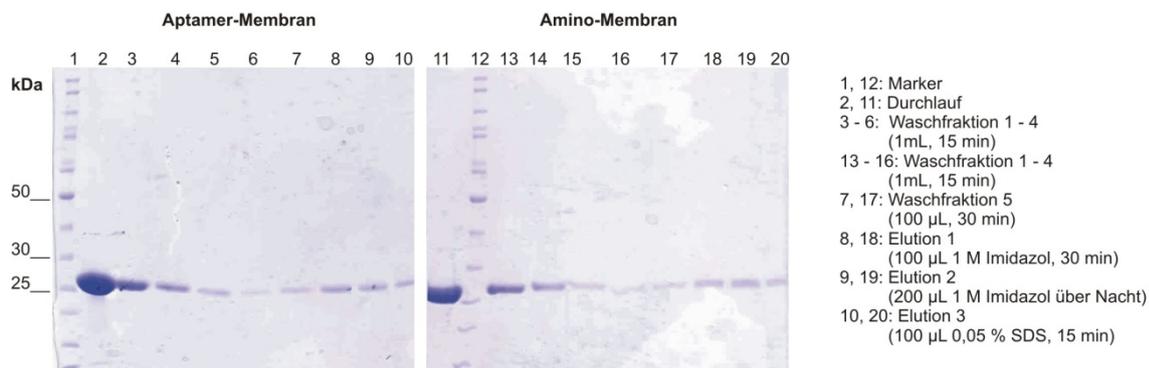


Abbildung 7.28 SDS-PAGE-Analyse der Bindung und Elution von Bgl-His an Aptamer-Membran und Amino-Membran (12 %ige Gele, Coomassie-Färbung).

Die Analyse der Proteinfractionen (Abbildung 7.28) zeigt keinen Unterschied zwischen der Aptamer- und der Aminomembran. Das Protein scheint, eher an die Membran als an das Aptamer gebunden zu haben. Um die unspezifische Bindung an der Membran zu verhindern, wurde nach der für die aminofunktionalisierten Microarrays etablierten Vorschrift vorgegangen [112]. Hierzu wurde eine 4,34 cm² Aminomembran mit 100 µL 6H7-Aptamerlösung (973 µg/mL) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Umpolung der Membranoberfläche wurde die Membran in einer Lösung von 0,55 g Bernsteinsäureanhydrid + 34 mL DMSO + 2 mL Boratpuffer (pH 8,3) für 10 min inkubiert. Nach dem Waschen mit ddH₂O (2 x 1 min) wurde die Membran mit 10 mg/mL BSA in PBS-T blockiert. Um die Faltung des immobilisierten Aptamers zu gewährleisten, wurde die Membran 1 min in kochendes Wasser gehalten und anschließend für 30 min in PBS-T bei Raumtemperatur geschüttelt. Diese Schritte wurden auch mit einer Kontroll-Membran durchgeführt. Als Proteinprobe wurde ein aufkonzentrierter Bgl-His-Überstand verwendet. Abbildung 7.29 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs.

Der Vergleich der Fraktionen per SDS-PAGE weist keinen Unterschied zwischen den beiden Membranen auf. Das zur Blockierung verwendete BSA wird ebenfalls ausgewaschen.

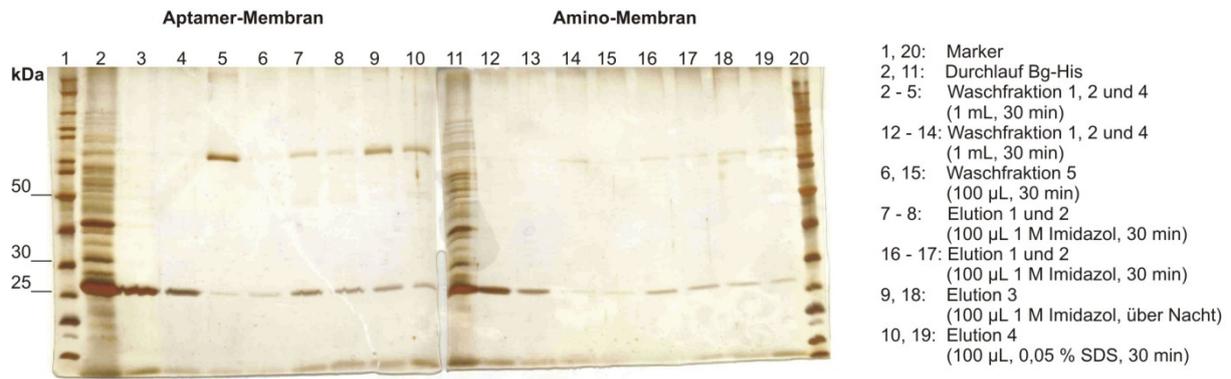


Abbildung 7.29 SDS-PAGE-Analyse der Bindung und Elution von Bgl-His an eine mit Bernsteinsäureanhydrid umgepolte und mit BSA blockierte Aptamer bzw. Amino-Membran (12 %ige Gele, Silber-Färbung).

Auf Membranbasis konnte somit bisher keine Aptamerchromatografie entwickelt werden. Die Gründe hierfür könnten sein: Die Konzentration der Aminogruppen auf der Membranoberfläche ist zu gering. Die Aminogruppen sind aufgrund der porösen Struktur für die Aptamere schwer zugänglich. Der Aminolinker ist zu kurz, so dass das Aptamer mit der Membran in Wechselwirkung tritt und die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur behindert wird. Die poröse Struktur könnte auch den Zugang des Targetproteins an das immobilisierte Aptamer beeinträchtigen. All diese Ursachen müssten in zukünftigen Arbeiten einzeln untersucht werden.

8 Aptamerchromatografie: Zusammenfassung und Ausblick

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Aptamer-basierte Affinitätschromatografie entwickelt. Hierfür wurden die gegen His-Tag gerichteten Aptamere 6H5 und 6H7 aus der Patentschrift US 2005/0142582 A1 als Modellliganden verwendet. Beide Aptamere wurden mit einem C6-NH₂-Linker am 5'-Ende verwendet. Nach Überprüfung der Funktionalität dieser Aptamere mittels SPR Spektroskopie wurden verschiedene Matrices mit unterschiedlichen Modifizierungen zur Immobilisierung der Aptamere unter Erhalt ihrer Aktivität getestet. Die Reaktion mit Epoxy und Aldehyd Gruppen führte zwar zur Immobilisierung der Aptamere an die Matrix, die immobilisierten Aptamere wiesen aber keine Aktivität auf. Die reaktionsfreudigen Gruppen reagieren nicht nur mit dem terminalen Aminolink, sondern auch mit den Funktionen innerhalb der Basensequenz, was zu einer ungerichteten Kopplung führt und die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur, die zur Targeterkennung notwendig ist, behindert.

Viel gerichteter erfolgt hingegen die Bindung an Carboxyoberflächen, die mit EDC aktiviert wurden. Hierbei wurde festgestellt wurde, dass C- und IDA-Membranen nicht über EDC-NHS aktiviert werden können. Vermutlich sind die Carboxyllinker auf den Membranen aufgrund ihrer Länge für eine EDC-NHS Aktivierung nicht geeignet und reagieren bei einer Aktivierung eher untereinander als mit dem Aptamer. Die Aptamere konnten aber in einer Ein-Schritt-Reaktion an Carboxyl Magnetpartikel immobilisiert und zur Aufreinigung von His-Tag Proteinen eingesetzt werden.

Die besten Resultate wurden über die Immobilisierung der Cyanurchlorid-aktivierten Aptamere an Amino Magnetpartikel erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung hierbei ausschließlich über den terminalen Aminolink erfolgt und die Aptamermodifizierung eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Aptamerchromatografie spielt. Während bei der Immobilisierung über die 5'-Aminomodifizierung die Funktionalität des 6H7-Aptamers nicht beeinträchtigt wurde, fand beim 3'-modifizierten Aptamer keine Targetbindung statt. Auf Basis von Amino Magnetpartikeln wurde die Aptamerchromatografie optimiert. Tabelle 8.1 fasst die Ergebnisse der Optimierung zusammen. Anschließend wurde die entwickelte Aptamerchromatografie unter Verwendung von PFEI als Modellprotein charakterisiert (Tabelle 8.2) und die Anwendbarkeit in realen Proben durch Aufreinigung von His-getagten Esterasen aus den Zelllysaten erfolgreich demonstriert.

Die immobilisierten Aptamere konnten über 6 Monate ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert werden. Die Aptamerbeads können mehrfach wiederverwendet werden, wobei aber eine Abnahme der Bindungskapazität festgestellt wird. Anscheinend bindet wie bei der Metallchelatchromatografie das Imidazol so stark an das Aptamer, dass es von dem Protein nicht verdrängt werden kann. Es müssen nähere Untersuchungen zur Regeneration der Aptamerbeads durchgeführt werden. Dazu könnten Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten getestet werden. Da die Oligonukleotide durch Erhitzen reversibel denaturiert werden, könnte

das Imidazol eventuell auf diesem Wege entfernt werden. Ein Kochen der Magnetpartikel würde aber zum Verblocken und zum verminderten Magnetismus führen. Diese einfache Regenerationsmethode könnte aber bei einer Aptamerchromatografie auf Membranbasis Anwendung finden.

Tabelle 8.1 Optimierte Aufreinigungsbedingungen für His-getaggte Proteine über Aptamerchromatografie.

Verwendetes Aptamer	6H5 und 6H7
Modifizierung	5' C6-NH ₂
Aktivierung	Cyanurchlorid in PBS, 1 h
Matrix	Amino Magnetic Beads
Immobilisierungskonzentration	1 mg/mL
Immobilisierungsdauer	2 h
Proteinbindung	His-Tag
Zeit für die Targetbindung	2 h
Waschpuffer	1 M KCl
Elutionspuffer	1 M Imidazol

Tabelle 8.2 Charakterisierung der auf Basis von Amino Magnetpartikeln entwickelten Aptamerchromatografie. PFEI wurde als Modellprotein verwendet.

	6H5-Beads	6H7-Beads
Ligandendichte [pmol/mg Beads]	400	400
q_{max} [pmol/mg Beads]	94	263
Kapazität / Ligandendichte	0,24	0,66
K_{Diss} [M]	9,7 x 10 ⁻⁶	4,6 x 10 ⁻⁶
Wiederfindungsrate [%]	77	75

Der Versuch die Aptamerchromatografie auf Membranbasis aufzubauen gelang bisher nicht. Hier könnten längere Amino Spacer wie PEI an die Membran angebracht werden, um den Abstand zur Membranoberfläche zu vergrößern und die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur der Aptamere zu ermöglichen.

Die Aptamertechnik bietet eine gute Alternative zu den herkömmlichen Affinitätsmethoden. Im Vergleich zu der Metallchelate Chromatografie ist zwar die Prozesszeit bei der Aufreinigung von His-Tag Proteinen über Aptamere deutlich erhöht, dieses Problem könnte jedoch durch Selektion von Aptameren mit höherer Affinität gelöst werden. Durch Entwicklung von Aptameren gegen Antikörper könnte in Zukunft die bisher auf der Protein A oder Protein G Basis durchgeführte Immunoaffinitätschromatografie durch Aptamertechnologie ersetzt werden.

9 Anhang

9.1 Standardanalyseverfahren

Gelelektrophorese zur Detektion von Proteinen

Das Prinzip der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) beruht auf der Trennung von Proteingemischen im elektrischen Feld nur nach ihrem Molekulargewicht. Hierzu werden die Proteingemische bei 95°C durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol, das als Reduktionsmittel eingesetzt wird, denaturiert und entfaltet. Das SDS maskiert dabei die Eigenladung der Proteine, so dass sich ein relativ konstantes Verhältnis von Masse zu Ladung ergibt. Das β -Mercaptoethanol spaltet eventuell vorhandene Disulfidbrücken. Somit hängt die Trennung der Proteine nur noch von ihren Molmassen und nicht mehr von ihrer Größe und Form im nativen Zustand ab. In Tabelle 9.1 ist die Zusammensetzung der verwendeten Gele aufgestellt.

Puffer:

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS; pH 8,3 (1x TGS)

SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer): 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA (Na-Salz), 5 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau in 90 mL ddH₂O gelöst. Direkt vor der Benutzung werden 10 % 2-Mercaptoethanol zugesetzt.

Die Elektrophorese wurde zunächst für 30 min bei einer Spannung von 100 V und anschließend für 60-90 min bei 200 V betrieben.

Die Proteinbanden auf dem Gel werden mit Coomassie- oder Silber-Färbemethode visualisiert. Die Coomassie-Färbung ist in Kapitel 3.3 beschrieben.

Silber-Färbung:

Die Silberfärbung ist die empfindlichste unspezifische Färbemethode. Die Nachweisgrenze liegt unter 1 ng pro Bande. Sie ist insbesondere zur Überprüfung der Reinheit eines Proteins geeignet. Der Nachteil der Silberfärbung besteht darin, dass sie nicht quantifizierbar ist. Verschiedene Proteine färben unterschiedlich stark. Die Silberionen werden dabei an Aminosäureseitenketten gebunden und anschließend reduziert.

Tabelle 9.1 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.

	Sammelgel (6 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (15 %)
Acrylamid (40 %)	731 μ L	2,92 mL	3,65 mL
Bisacrylamid (2 %)	390 μ L	1,56 mL	1,95 mL
Tris (1,5 M) pH 8,8	-	2,8 mL	2,8 mL
Tris (1,5 M) pH 6,8	760 μ L	-	-
SDS (1 %)	300 μ L	1 mL	1 mL
H ₂ O	3,82 mL	1,72 mL	0,6 mL
TEMED	10 μ L	20 μ L	20 μ L
APS (25 %)	10 μ L	20 μ L	20 μ L

Durchführung:

- Das Gel wurde für 30 min in dem Entfärber/Fixierer unter Schütteln inkubiert. Dann wurde es zweimal kurz mit ddH₂O gewaschen.
- Anschließend wurde das Gel für 2,5 min in *Farmers Reducer* (1 Spatelspitze K₃[Fe(CN)₆], 1 Spatelspitze Na₂S₂O₃ in ca. 100 mL ddH₂O) geschwenkt und solange mit ddH₂O gewaschen, bis es vollständig entfärbt wurde.
- Zur Komplexierung von Silberionen wurde das Gel für 30 min in einer frisch zubereiteten 0,1 %-igen AgNO₃-Lösung inkubiert.
- Es wurde danach für jeweils 30 s mit ddH₂O und anschließend mit 2,5 %-iger Na₂CO₃-Lösung gewaschen.
- Zur Entwicklung wurde das Gel in 100 mL 2,5 %-iger Na₂CO₃-Lösung und 400 μ L CH₂O-Lösung solange inkubiert, bis deutliche Banden sichtbar wurden.
- Gestoppt wurde die Färbung durch Schwenken des Gels für 10 min in 5 %-iger CH₃COOH.
- Das Gel wurde danach in Wasser gelagert werden.

Absorptionsmessung bei 280 nm

Die Konzentration von Standardproteinen wurde durch Absorptionsmessung der Probenfraktionen bei 280 nm bestimmt, indem mit dem jeweiligen Protein eine Standardkurve erstellt wurde.

BCA-Test

Die Methode basiert auf der kolorimetrischen Detektion von Proteinen unter Komplexierung von Cu¹⁺ durch BCA (engl. *bicinchonic acid*). Dabei werden Cu²⁺-Ionen von Proteinen im alkalischen Milieu zu Cu¹⁺ reduziert, die von zwei BCA-Molekülen umgeben werden. Dieser wasserlösliche, violett gefärbte Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm, welches proportional zur Proteinkonzentration ist.

Durchführung:

- Zuerst wurde eine BSA-Verdünnungsreihe als Standard erstellt. Die zu untersuchenden Proben wurden gegebenenfalls verdünnt.
- Es wurden 150 μL Probe bzw. BSA-Standard und 150 μL vom nach Herstellerangaben hergestellten BCA-Reagenz in die wells einer Mikrotiterplatte pipettiert und für 30 s geschüttelt.
- Die Mikrotiterplatte wurde abgedeckt für 2 h bei 37°C inkubiert.
- Nach Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur wurde bei 570 nm die Absorption gemessen.

Coomassie-Test

Dieser Test beruht auf der Methode nach Bradford, bei der die Proteine durch Coomassie-Brillantblau-Einlagerung kolorimetrisch quantifiziert werden können. Das Absorptionsmaximum liegt zwischen 465 nm und 595 nm.

Durchführung:

- Zuerst wurden BSA-Standards angesetzt und die Proben verdünnt.
- Dann wurden je nach Konzentrationsbereich 5 μL (100-1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bzw. 150 μL (1-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) von jedem Standard und jeder Probe in die Mikrotiterplatte pipettiert.
- Es wurden 250 μL bzw. 150 μL Coomassie-Reagenz addiert und für 30 s geschüttelt.
- Die Platte wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde die Absorption bei 570 nm gemessen.

9.2 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchonic acid</i>
Bgl-His	β -Glucanase
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BsubE	<i>Bacillus subtilis</i> Esterase

Bste	<i>Bacillus stearothermophilus</i> Esterase
C	<i>Carboxylic acid</i> , schwache Kationenaustauscher Membran
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CE / CZE	<i>Capillary Electrophoresis / Capillary Zone Electrophoresis</i>
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	Diethylaminopropyl-N-Ethylcarbodiimid
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EGDGE	Ethylenglycoldiglycidylether
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
HDA	1,6-Hexandiamin
hGH	<i>Human growth hormone</i>
His	Histidin
HTDSS	<i>High-Throughput Downstream Screening System</i>
IDA	<i>Iminodiacetic Acid</i>
IgG	Imunoglobulin G
IMAC	<i>Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	Luria-Bertani
MA	Membranadsorber
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
NHS	<i>N-Hydroxy Succinimide</i>
NTA	<i>Nitrilotriacetic Acid</i>

OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-T	50 mM K ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
PFEI	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Esterase I
pNBE	<i>Bacillus subtilis</i> p-Nitrobenzylesterase
Q	Quaternäres Ammonium, starke Anionenaustauscher Membran
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	<i>Revolutions Per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Sulfonsäure, starke Kationenaustauscher Membran
SBB	<i>Sodiumborate Buffer</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
TEAA	Triethylammonium-Acetat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TSS	<i>Transformation and storage solution</i>
UV	Ultraviolettes Licht

9.3 Chemikalien

Acetonitril (Fluka, Buchs, CH)

Acrylamid (40 %) (Roth, Karlsruhe)

Agarose (Fluka, Buchs, CH)

anti His Tag (Acris, Hiddenhausen)

APS (Roth, Karlsruhe)

Aptamere (6H5 und 6H7) Synthese durch Operon (Köln)

Bacto-Trypton (Roth, Karlsruhe)

Bisacrylamid (2 %) (Roth, Karlsruhe)

Borsäure (Sigma, Buchs, CH)

Bromphenolblau (Sigma, Buchs, CH)

BSA (Sigma, Buchs, CH)

Cobaltsulfat (Merck, Darmstadt)

Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL 61105 USA)

Cyanurchlorid (Sigma, Buchs, CH)

Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 (Sigma, Buchs, CH)

EDC (Fluka, Buchs, CH)

EDTA (Na-Salz) (Fluka, Buchs, CH)

Ethanol (Merck, Darmstadt)

Ethanolamin (Sigma, Buchs, CH)

Formaldehydlösung (36,5 %) (Fluka, Buchs, CH)

Glycerin (Fluka, Buchs, CH)

Glycin (Sigma, Buchs, CH)

HCl (30%) (Fluka, Buchs, CH)

Hefeextrakt (Fluka, Buchs, CH)

Imidazol (Merck, Darmstadt)

IPTG (AppliChem, Darmstadt)

Kaliumchlorid (Fluka, Buchs, CH)

Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

Kupfersulfat (Merck, Darmstadt)

Lysozym (Sigma, Buchs, CH)

2-Mercaptoethanol (Fluka, Buchs, CH)

11-Mercaptoundecanonic Acid (Aldrich, Buchs, CH)

MgCl₂ (Riedel de Haën, Seelze)

Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL 61105 USA)

Modified Lowry Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL 61105 USA)

Natriumacetat (Riedel de Haën, Seelze)

Natriumchlorid (Fluka, Buchs, CH)

NaHCO₃ (Merck, Darmstadt)

NHS (Fluka, Buchs, CH)

Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Merck, Darmstadt)

Natronlauge (Riedel de Haën, Seelze)

NiSO₄ (Fluka, Buchs, CH)

PhastGel Blue R (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)

Protein Ladder, 10-200 kDa (Fermentas, St. Leon-Rot)

Rhamnose (Sigma, Buchs, CH)

Silbernitrat (Riedel de Haën, Seelze)

Schwefelsäure (Fluka, Buchs, CH)

SDS (Sigma, Buchs, CH)

TEMED (Roth, Karlsruhe)

Transferrin (Sigma, Buchs, CH)

Tris-Base (Fluka, Buchs, CH)

Trypsinogen (Sigma, Buchs, CH)

Tween 20 (Sigma, Buchs, CH)

ZnSO₄ (Merck, Darmstadt)

9.4 Verwendete Geräte

Autoklav: Systec V-150 (Systec GmbH, Wettenberg)

Brutschrank: CertomatR HK (B. Braun Biotech International, Melsungen)

CE: Beckmann P/ACE MDQ System,

Photodiode Array Detector (Beckmann Coulter, Fullerton, Californien, USA)

Fotometer: Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)

Microplate Reader Benchmark (BIO-RAD, München)

FPLC: BioLogic AVR7-3 (BIO-RAD, München)

Fraktionssammler: Model 2128 (BIO-RAD, München)

HPLC: Merck KgaA, Darmstadt; Hitachi Europe GmbH, München

Pumpe: L-7100

Detektor: L-7455 DAD (Diode Array Detector)

Autosampler: L-7200

Degasser: L-7612

Säulenofen: L-7350

Datenverarbeitung: HSM 4.1

Steuerung: D-7000 Interface

KingFisher: Thermo Scientific KingFisher (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)

Nanodrop: Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc; Wilming-ton, DE, USA)

Reinstwasseranlage: Arium 611 uf uv (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen)

pH-Meter: HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)

Power-Supply (Gelelektrophorese): Electrophoresis Power Supply -EPS 301 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)

SPR: Autolab ESPRIT (EcoChemie, Utrecht, Niederlande)

Thermocycler: Px2 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)

Thermomixer: Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)

Ultraschallbad: Bandelin Sonorex Super RK 510 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin)

Zentrifuge für Eppendorf-Reaktionsgefäße: Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg)

Zentrifuge für Falkontubes und Mikrotiterplatten: Megafuge 1.0 RS (Heraeus Instruments GmbH, Osterode)

10 Literaturverzeichnis

- [1] Y. D. Clonis, Affinity chromatography matures as bioinformatic and combinatorial tools develop, *J Chromatogr A* **2006**, *1101*, 1.
- [2] M. Glad, P. O. Larsson, New methods for separation and recovery of biomolecules, *Curr Opin Biotechnol* **1991**, *2*, 413.
- [3] A. Velayudhan, M. K. Menon, Modeling of purification operations in biotechnology: enabling process development, optimization, and scale-up, *Biotechnol Prog* **2007**, *23*, 68.
- [4] S. P. Fulton, Large-scale processing of macromolecules, *Curr Opin Biotechnol* **1994**, *5*, 201.
- [5] C. Scheich, V. Sievert, K. Bussow, An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography, *BMC Biotechnol* **2003**, *3*, 12.
- [6] L. D. Saraswat, H. Zhang, L. W. Hardy, S. S. Jones, R. Bhikhabhai, C. Brink, A. Bergenstrahle, R. Haglund, S. L. Gallion, Affinity ligand selection from a library of small molecules: assay development, screening, and application, *Biotechnol. Progr.* **2005**, *21*, 300.
- [7] S. Yokoyama, Protein expression systems for structural genomics and proteomics, *Curr Opin Chem Biol* **2003**, *7*, 39.
- [8] S. M. Cramer, G. Jayaraman, Preparative chromatography in biotechnology, *Curr Opin Biotechnol* **1993**, *4*, 217.
- [9] M. Kalyanpur, Downstream processing in the biotechnology industry, *Mol Biotechnol* **2002**, *22*, 87.
- [10] F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, **1998**.
- [11] D. H. Marchand, Chromatography in analytical biotechnology, *Curr Opin Biotechnol* **1994**, *5*, 72.
- [12] G. Sofer, Preparative chromatographic separations in pharmaceutical, diagnostic, and biotechnology industries: current and future trends, *J Chromatogr A* **1995**, *707*, 23.
- [13] A. Jungbauer, Chromatographic media for bioseparation, *J Chromatogr A* **2005**, *1065*, 3.
- [14] J. X. Huang, G. Guiochon, Applications of preparative high-performance liquid chromatography to the separation and purification of peptides and proteins, *J Chromatogr* **1989**, *492*, 431.

- [15] J. R. Ogez, J. C. Hodgdon, M. P. Beal, S. E. Builder, Downstream processing of proteins: recent advances, *Biotechnol Adv* **1989**, 7, 467.
- [16] I. M. Chaiken, Analytical affinity chromatography in studies of molecular recognition in biology: a review, *J Chromatogr* **1986**, 376, 11.
- [17] C. F. Ford, I. Suominen, C. E. Glatz, Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins, *Protein Expr Purif* **1991**, 2, 95.
- [18] J. Thömmes, M. Kula, Membrane chromatography-an integrative concept in the downstream processing of proteins, *Biotechnol. Progr.* **1995**, 11, 357.
- [19] R. Ghosh, Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges, *J. Chromatogr. A* **2002**, 952, 13.
- [20] T. Kawai, K. Saito, W. Lee, Protein binding to polymer brush, based on ion-exchange, hydrophobic, and affinity interactions, *J. Chromatogr. B* **2003**, 790, 131.
- [21] M. Schulte, J. Strube, Preparative enantioseparation by simulated moving bed chromatography, *J Chromatogr A* **2001**, 906, 399.
- [22] A. Uretschlager, A. Jungbauer, Preparative continuous annular chromatography (P-CAC), a review, *Bioprocess Biosyst Eng* **2002**, 25, 129.
- [23] D. Weuster-Botz, D. Hekmat, R. Puskeiler, E. Franco-Lara, Enabling technologies: fermentation and downstream processing, *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2007**, 105, 205.
- [24] E. Klodzinska, D. Moravcova, P. Jandera, B. Buszewski, Monolithic continuous beds as a new generation of stationary phase for chromatographic and electro-driven separations, *J Chromatogr A* **2006**, 1109, 51.
- [25] T. M. Przybycien, N. S. Pujar, L. M. Steele, Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography, *Curr Opin Biotechnol* **2004**, 15, 469.
- [26] N. E. Labrou, Design and selection of ligands for affinity chromatography, *J. Chromatogr. B* **2003**, 790, 67.
- [27] C. Charcosset, Purification of proteins by membrane chromatography, *JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* **1998**, 71, 95.
- [28] M. E. Avramescu, Z. Borneman, M. Wessling, Mixed-matrix membrane adsorbers for protein separation, *J. Chromatogr. A* **2003**, 1006, 171.
- [29] H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins, *J. Biochem. Bioph. Methods* **2001**, 49, 199.
- [30] C. Rao, Purification of large proteins using ion-exchange membranes, *Process Biochem.* **2001**, 37, 247.
- [31] C. Boi, Membrane adsorbers as purification tools for monoclonal antibody purification, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, 848, 19.

- [32] A. Heath, G. Belfort, Synthetic membranes in biotechnology: realities and possibilities, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **1992**, 47, 45.
- [33] D. Roper, E. Lightfoot, SEPARATION OF BIOMOLECULES USING ADSORPTIVE MEMBRANES, *J. Chromatogr. A* **1995**, 702, 3.
- [34] H. Splitt, I. Mackenstedt, R. Freitag, Preparative membrane adsorber chromatography for the isolation of cow milk components, *J Chromatogr A* **1996**, 729, 87.
- [35] H. L. Knudsen, R. L. Fahrner, Y. Xu, L. A. Norling, G. S. Blank, Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification, *J Chromatogr A* **2001**, 907, 145.
- [36] M. Sossna, M. Hollas, J. Schaper, T. Scheper, Structural development of asymmetric cellulose acetate microfiltration membranes prepared by a single-layer dry-casting method, *J. Membr. Sci.* **2007**, 289, 7.
- [37] X. Santarelli, F. Domergue, G. Clofent-Sanchez, M. Dabadie, R. Grissely, C. Cassagne, Characterization and application of new macroporous membrane ion exchangers, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1998**, 706, 13.
- [38] S. Barbe, D. Nussbaumer, W. Demmer, A. Weiss, R. Faber, T. Scheper, Presentation of a Tandem-Sartobind pilot plant as an approach for large scale membrane chromatography, *Desalination* **2006**, 200, 480.
- [39] W. Demmer, D. Nussbaumer, Large-scale membrane adsorbers, *J Chromatogr A* **1999**, 852, 73.
- [40] K. Plate, S. Beutel, H. Buchholz, W. Demmer, S. Fischer-Fruhholz, O. Reif, R. Ulber, T. Scheper, Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography, *J. Chromatogr. A* **2006**, 1117, 81.
- [41] J. X. Zhou, T. Tressel, Basic concepts in Q membrane chromatography for large-scale antibody production, *Biotechnol Prog* **2006**, 22, 341.
- [42] M. Franzreb, M. Siemann-Herzberg, T. J. Hobbey, O. R. Thomas, Protein purification using magnetic adsorbent particles, *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, 70, 505.
- [43] S. Bucak, D. A. Jones, P. E. Laibinis, T. A. Hatton, Protein separations using colloidal magnetic nanoparticles, *Biotechnol Prog* **2003**, 19, 477.
- [44] H. Rackel, **2006**, Enzymimmobilisierung an oberflächenmodifizierten superparamagnetischen Silica-Partikeln, Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- [45] E. B. Altintas, H. Yavuz, R. Say, A. Denizli, Methacryloylamidoglutamic acid having porous magnetic beads as a stationary phase in metal chelate affinity chromatography, *J Biomater Sci Polym Ed* **2006**, 17, 213.

- [46] R. S. Molday, L. L. Molday, Separation of cells labeled with immunospecific iron dextran microspheres using high gradient magnetic chromatography, *FEBS Lett* **1984**, *170*, 232.
- [47] V. N. Morozov, S. Groves, M. J. Turell, C. Bailey, Three minutes-long electrophoretically assisted zeptomolar microfluidic immunoassay with magnetic-beads detection, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 12628.
- [48] N. Ozturk, M. E. Gunay, S. Akgol, A. Denizli, Silane-modified magnetic beads: application to immunoglobulin G separation, *Biotechnol Prog* **2007**, *23*, 1149.
- [49] P. R. Levison, S. E. Badger, J. Dennis, P. Hathi, M. J. Davies, I. J. Bruce, D. Schimkat, Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification, *J Chromatogr A* **1998**, *816*, 107.
- [50] X. Xiao, X. Yang, T. Liu, Z. Chen, L. Chen, H. Li, L. Deng, Preparing a highly specific inert immunomolecular-magnetic beads for rapid detection and separation of *S. aureus* and group G Streptococcus, *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, *75*, 1209.
- [51] O. Olsvik, T. Popovic, E. Skjerve, K. S. Cudjoe, E. Hornes, J. Ugelstad, M. Uhlen, Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology, *Clin Microbiol Rev* **1994**, *7*, 43.
- [52] R. Veyret, A. Elaissari, P. Marianneau, A. A. Sall, T. Delair, Magnetic colloids for the generic capture of viruses, *Anal Biochem* **2005**, *346*, 59.
- [53] K. Sparbier, A. Asperger, A. Resemann, I. Kessler, S. Koch, T. Wenzel, G. Stein, L. Vorweg, D. Suckau, M. Kostrzewa, Analysis of glycoproteins in human serum by means of glycospecific magnetic bead separation and LC-MALDI-TOF/TOF analysis with automated glycopeptide detection, *J Biomol Tech* **2007**, *18*, 252.
- [54] J. Meng, J.-G. Walter, Ö. Kökpinar, F. Stahl, T. Scheper, Automated Microscale His-tagged Protein Purification Using Ni-NTA Magnetic Agarose Beads, *Chemical Engineering and Technology* **2008**, *31*, 1.
- [55] J. R. Whiteaker, L. Zhao, H. Y. Zhang, L. C. Feng, B. D. Piening, L. Anderson, A. G. Paulovich, Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers, *Anal Biochem* **2007**, *362*, 44.
- [56] G. Schlosser, K. Vekey, A. Malorni, G. Pocsfalvi, Combination of solid-phase affinity capture on magnetic beads and mass spectrometry to study non-covalent interactions: example of minor groove binding drugs, *Rapid Commun Mass Spectrom* **2005**, *19*, 3307.
- [57] D. Bozhinova, B. Galunsky, G. Yueping, M. Franzreb, R. Koster, V. Kasche, Evaluation of magnetic polymer micro-beads as carriers of immobilised biocatalysts for selective and stereoselective transformations, *Biotechnol Lett* **2004**, *26*, 343.
- [58] A. Ergin, K. Bussow, J. Sieper, A. Thiel, R. Duchmann, T. Adam, Homologous high-throughput expression and purification of highly conserved *E coli* proteins, *Microb Cell Fact* **2007**, *6*, 18.

- [59] M. J. Davies, D. E. Smethurst, K. M. Howard, M. Todd, L. M. Higgins, I. J. Bruce, Improved manufacture and application of an agarose magnetizable solid-phase support, *Appl Biochem Biotechnol* **1997**, *68*, 95.
- [60] A. A. Neurauter, M. Bonyhadi, E. Lien, L. Nokleby, E. Ruud, S. Camacho, T. Aarvak, Cell isolation and expansion using Dynabeads, *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2007**, *106*, 41.
- [61] Y. Zheng, P. D. Stevens, Y. Gao, Magnetic nanoparticles as an orthogonal support of polymer resins: applications to solid-phase suzuki cross-coupling reactions, *J Org Chem* **2006**, *71*, 537.
- [62] D. L. Robertson, G. F. Joyce, Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA, *Nature* **1990**, *344*, 467.
- [63] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science* **1990**, *249*, 505.
- [64] A. D. Ellington, J. W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* **1990**, *346*, 818.
- [65] T. Mairal, V. C. Ozalp, P. Lozano Sanchez, M. Mir, I. Katakis, C. K. O'Sullivan, Aptamers: molecular tools for analytical applications, *Anal Bioanal Chem* **2008**, *390*, 989.
- [66] S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, Analytical applications of aptamers, *Biosens Bioelectron* **2005**, *20*, 2424.
- [67] S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads, *Anal Chem* **2007**, *79*, 1466.
- [68] H. Schurer, A. Buchynskyy, K. Korn, M. Famulok, P. Welzei, U. Hahn, Fluorescence correlation spectroscopy as a new method for the investigation of aptamer/target interactions, *Biol Chem* **2001**, *382*, 479.
- [69] T. Sakamoto, A. Oguro, G. Kawai, T. Ohtsu, Y. Nakamura, NMR structures of double loops of an RNA aptamer against mammalian initiation factor 4A, *Nucleic Acids Res* **2005**, *33*, 745.
- [70] T. Hianik, V. Ostatna, M. Sonlajtnerova, I. Grman, Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin, *Bioelectrochemistry* **2006**.
- [71] J. H. Lee, H. Kim, J. Ko, Y. Lee, Interaction of C5 protein with RNA aptamers selected by SELEX, *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, 5360.
- [72] R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, High-resolution molecular discrimination by RNA, *Science* **1994**, *263*, 1425.
- [73] A. Tahiri-Alaoui, L. Frigotto, N. Manville, J. Ibrahim, P. Romby, W. James, High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands, *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, e45.

- [74] P. Porschewski, M. A. Grattinger, K. Klenzke, A. Erpenbach, M. R. Blind, F. Schafer, Using aptamers as capture reagents in bead-based assay systems for diagnostics and hit identification, *J Biomol Screen* **2006**, *11*, 773.
- [75] C. S. Ferreira, C. S. Matthews, S. Missailidis, DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers, *Tumour Biol* **2006**, *27*, 289.
- [76] S. D. Patil, D. G. Rhodes, D. J. Burgess, DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review, *Aaps J* **2005**, *7*, E61.
- [77] E. N. Brody, L. Gold, Aptamers as therapeutic and diagnostic agents, *J Biotechnol* **2000**, *74*, 5.
- [78] D. Mann, C. Reinemann, R. Stoltenburg, B. Strehlitz, In vitro selection of DNA aptamers binding ethanalamine, *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *338*, 1928.
- [79] T. M. Gronewold, S. Glass, E. Quandt, M. Famulok, Monitoring complex formation in the blood-coagulation cascade using aptamer-coated SAW sensors, *Biosens Bioelectron* **2005**, *20*, 2044.
- [80] R. Kirby, E. J. Cho, B. Gehrke, T. Bayer, Y. S. Park, D. P. Neikirk, J. T. McDevitt, A. D. Ellington, Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins, *Anal Chem* **2004**, *76*, 4066.
- [81] R. A. Potyrailo, R. C. Conrad, A. D. Ellington, G. M. Hieftje, Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors, *Anal Chem* **1998**, *70*, 3419.
- [82] K. Stadtherr, H. Wolf, P. Lindner, An aptamer-based protein biochip, *Anal Chem* **2005**, *77*, 3437.
- [83] J. R. Collett, E. J. Cho, J. F. Lee, M. Levy, A. J. Hood, C. Wan, A. D. Ellington, Functional RNA microarrays for high-throughput screening of anti-protein aptamers, *Anal Biochem* **2005**, *338*, 113.
- [84] G. Mayer, A. Jenne, Aptamers in research and drug development, *BioDrugs* **2004**, *18*, 351.
- [85] C. K. O'Sullivan, Aptasensors--the future of biosensing? *Anal Bioanal Chem* **2002**, *372*, 44.
- [86] S. L. Clark, V. T. Remcho, Aptamers as analytical reagents, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1335.
- [87] C. Ravelet, C. Grosset, E. Peyrin, Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers, *J Chromatogr A* **2006**, *1117*, 1.
- [88] R. K. Mosing, M. T. Bowser, Microfluidic selection and applications of aptamers, *J Sep Sci* **2007**, *30*, 1420.

- [89] T. S. Romig, C. Bell, D. W. Drolet, Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1999**, 731, 275.
- [90] M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, A DNA aptamer as a new target-specific chiral selector for HPLC, *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 8672.
- [91] M. Michaud, E. Jourdan, C. Ravelet, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, Immobilized DNA aptamers as target-specific chiral stationary phases for resolution of nucleoside and amino acid derivative enantiomers, *Anal Chem* **2004**, 76, 1015.
- [92] C. Ravelet, R. Boulkedid, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, J. Fize, E. Peyrin, A L-RNA aptamer chiral stationary phase for the resolution of target and related compounds, *J Chromatogr A* **2005**, 1076, 62.
- [93] J. Ruta, C. Grosset, C. Ravelet, J. Fize, A. Villet, A. Ravel, E. Peyrin, Chiral resolution of histidine using an anti-D-histidine L-RNA aptamer microbore column, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, 845, 186.
- [94] R. B. Kotia, L. Li, L. B. McGown, Separation of nontarget compounds by DNA aptamers, *Anal Chem* **2000**, 72, 827.
- [95] T. U. Vo, L. B. McGown, Selectivity of quadruplex DNA stationary phases toward amino acids in homodipeptides and alanyl dipeptides, *Electrophoresis* **2004**, 25, 1230.
- [96] J. A. Charles, L. B. McGown, Separation of Trp-Arg and Arg-Trp using G-quartet-forming DNA oligonucleotides in open-tubular capillary electrochromatography, *Electrophoresis* **2002**, 23, 1599.
- [97] M. A. Rehder-Silinski, L. B. McGown, Capillary electrochromatographic separation of bovine milk proteins using a G-quartet DNA stationary phase, *J Chromatogr A* **2003**, 1008, 233.
- [98] T. U. Vo, L. B. McGown, Effects of G-quartet DNA stationary phase destabilization on fibrinogen peptide resolution in capillary electrochromatography, *Electrophoresis* **2006**, 27, 749.
- [99] A. C. Connor, L. B. McGown, Aptamer stationary phase for protein capture in affinity capillary chromatography, *J Chromatogr A* **2006**, 1111, 115.
- [100] Q. Deng, I. German, D. Buchanan, R. T. Kennedy, Retention and separation of adenosine and analogues by affinity chromatography with an aptamer stationary phase, *Anal Chem* **2001**, 73, 5415.
- [101] M. B. Murphy, S. T. Fuller, P. M. Richardson, S. A. Doyle, An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification, *Nucleic Acids Res* **2003**, 31, e110.

- [102] S. Cho, S. Lee, W. Chung, Y. Kim, Y. Lee, B. Kim, Microbead-based affinity chromatography chip using RNA aptamer modified with photocleavable linker, *Electrophoresis* **2004**, 25, 3730.
- [103] W. Chung, M. Kim, S. Cho, S. Park, J. Kim, Y. Kim, B. Kim, Y. Lee, Microaffinity purification of proteins based on photolytic elution: Toward an efficient microbead affinity chromatography on a chip, *Electrophoresis* **2005**, 26, 694.
- [104] H. A. Oktem, G. Bayramoglu, V. C. Ozalp, M. Y. Arica, Single-Step Purification of Recombinant *Thermus aquaticus* DNA Polymerase Using DNA-Aptamer Immobilized Novel Affinity Magnetic Beads, *Biotechnol Prog* **2007**, 23, 146.
- [105] Ö. Kökpınar, D. Harkensee, C. Kasper, T. Scheper, R. Zeidler, O. W. Reif, R. Ulber, Innovative modular membrane adsorber system for high-throughput downstream screening for protein purification, *Biotechnol. Progr.* **2006**, 22, 1215.
- [106] O.-W. Reif, **1994**, Präparative und analytische Methoden in der Hochleistungs-Membran Chromatographie und Kapillarelektrophorese, Dissertation, Universität Hannover
- [107] K. Suck, J. Walter, F. Menzel, A. Tappe, C. Kasper, C. Naumann, R. Zeidler, T. Scheper, Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems, *J. Biotechnol.* **2006**, 121, 361.
- [108] M. B. Doyle, S. A. Murph, Aptamers and methods for their in vitro selection and uses thereof, *Patent Application Publication* **2005**, US 2005/0142582 A1.
- [109] M. Gilar, Analysis and purification of synthetic oligonucleotides by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection, *Anal Biochem* **2001**, 298, 196.
- [110] J. Van Ness, S. Kalbfleisch, C. R. Petrie, M. W. Reed, J. C. Tabone, N. M. Vermeulen, A versatile solid support system for oligodeoxynucleotide probe-based hybridization assays, *Nucleic Acids Res* **1991**, 19, 3345.
- [111] J. A. Ferguson, T. C. Boles, C. P. Adams, D. R. Walt, A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression, *Nat Biotechnol* **1996**, 14, 1681.
- [112] J.-G. Walter, **2008**, Neue Materialien und Methoden in der Protein-Microarray-Technologie, Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- [113] H. J. Eriksson, G. W. Somsen, W. L. Hinrichs, H. W. Frijlink, G. J. de Jong, Characterization of human placental alkaline phosphatase by activity and protein assays, capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **2001**, 755, 311.
- [114] J. Tomaszewska-Gras, J. Kijowski, F. Schreurs, Quantitative determination of titin and nebulin in poultry meat by SDS-PAGE with an internal standard, *MEAT SCIENCE* **2002**, 62, 61.

- [115] H. Wehinger, M. Alebouyeh, [Quantitative densitometric determination of hemoglobin A2 following micro-zone electrophoresis with cellulose acetate foil], *Klin Wochenschr* **1970**, 48, 701.
- [116] S. Kroll, L. Meyer, A. Graf, S. Beutel, J. Gokler, S. Doring, U. Klaus, T. Scheper, Heterogeneous surface modification of hollow fiber membranes for use in micro-reactor systems, *JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE* **2007**, 299, 181.
- [117] C. Kasper, O. W. Reif, R. Freitag, Evaluation of affinity filters for protein isolation, *Bioseparation* **1996**, 6, 373.
- [118] K. H. Gebauer, **1996**, Stofftransport und Kinetik in der Protein-Chromatografie am Beispiel neuer Membran-Adsorbentien, Dissertation, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
- [119] F. Anton, **2005**, Einfluss der Temperatur auf das Wachstums- und Produktionsverhalten von CHO^{SFS}hGH-Zellen und Charakterisierung eines neuen Bioreaktors, Diplomarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- [120] E. Henke, **2001**, Untersuchungen zur Erweiterung der Substratspezifität von Carboxylester-Hydrolasen, Dissertation, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
- [121] T. Weiß, **1999**, Neue Membrantechnologien zur Isolierung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke Methodenentwicklung für den industriellen Einsatz, Dissertation, Universität Hannover
- [122] K. Plate, **2003**, Großtechnische Gewinnung hochwertiger Minorkomponenten aus Süßmolke unter Verwendung von Membrantechnologie, Dissertation, Universität Hannover
- [123] M. G. Buring, **2008**, laufende Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Öznur Kökpınar
Geburtsdatum	18.03.1977
Geburtsort	Gölbasi, Türkei

Schulbildung

1990 – 1997	Johannes Kepler Gymnasium in Garbsen mit Abitur
1988 – 1990	Orientierungsstufe in Garbsen
1983 – 1988	Grundschule in Gölbasi, Türkei

Studium

10/1997 – 11/2004	Studium der Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
-------------------	--

Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover:
Membranadsorbersysteme zur Proteinaufreinigung im Mikrolitermaßstab

12/2004 – 02/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/Doktorandin am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
-------------------	--

Publikationen

Innovative Modular Membrane Adsorber System for High-Throughput Downstream Screening for Protein Purification; Öznur Kökpinar, Daniela Harkensee, Cornelia Kasper, Thomas Scheper, Robert Zeidler, Oscar-Werner Reif, Roland Ulber; *Biotechnology Progress*; 2006; 22, 1215-1219

Fast Screening for the Purification of Proteins Using Membrane Adsorber Technology; Daniela Harkensee, Öznur Kökpinar, Johanna-Gabriela Walter, Cornelia Kasper, Sascha Beutel, Oscar-Werner Reif, Thomas Scheper, Roland Ulber; *Engineering in Life Science*; 2007, 7 (4), 388-394

Automated Microscale His-tagged Protein Purification Using Ni-NTA Magnetic Agarose Beads; Jin Meng, Johanna-Gabriela Walter, Öznur Kökpinar, Frank Stahl, Thomas Scheper; *Chemical Engineering and Technology*; 2008, 31 (3), 1-7

Membranadsorbersysteme in der Proteinaufreinigung: *Screening* Möglichkeiten; Öznur Kökpinar, Johanna-Gabriela Walter, Fabienne Anton, Andrea Mönster, Cornelia Kasper, Frank Stahl, Thomas Scheper; *Chemie Ingenieur Technik*; 2008, 80 (6), 1-6

Systematic Investigation of Optimal Aptamer Immobilization for Protein Microarray Applications; Johanna-Gabriela Walter, Öznur Kökpinar, Frank Stahl, Thomas Scheper; *Analytical Chemistry*; DOI: 10.1021/ac801081v