



# Etablierung eines Capture-Schrittes für die Herstellung eines rekombinanten Enzyms

Bachelorarbeit vorgelegt von  
Stephan Weyand

HAW Hamburg  
Fakultät Life Sciences  
Departement Biotechnologie

Wintersemester 2011/2012  
16.02.2012

Erstprüfer: Prof. Dr. Birger Anspach  
Zweitprüfer: Dr. Christoph Reich

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Betreuern, Prof. Dr. Birger Anspach und Dr. Christoph Reich bedanken, die mir während den gesamten Arbeiten stets hilfreich zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Abteilung Prozessentwicklung von Richter-Helm Biologics, die mir die Möglichkeit boten, diese Arbeit anzufertigen.

Desweiteren will ich mich recht herzlich bei Herrn Romain Dabre und der Firma Tosoh bedanken, die mich durch die Bereitstellung von Anionenaustauscheradsorbentien tatkräftig unterstützten.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten.

# Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis .....	4
II	Tabellenverzeichnis .....	5
1	Zusammenfassung .....	6
2	Einleitung .....	7
3	Eigenschaften des Zielproteins .....	8
4	Material und Methoden .....	9
4.1	Material .....	9
4.1.1	Verwendete Ionenaustauscher und Affinitätsträger .....	11
4.1.2	Ionenaustauscher .....	11
4.1.3	Affinitätsträger .....	13
4.1.4	Chromatographieanlagen .....	14
4.1.5	Verwendete Probe .....	14
4.2	Methoden .....	15
4.2.1	SDS-PAGE .....	15
4.2.2	Batch Versuche .....	16
4.2.3	Chromatographie .....	17
4.2.4	CIP .....	17
4.2.5	Aktivitätsassay .....	18
5	Ergebnisse und Diskussion .....	20
5.1	Stabilität des Zielproteins nach mehrmaligen Einfrierzyklen .....	20
5.2	Stabilität des Zielproteins bei -20°C Lagertemperatur .....	20
5.3	DNA Cellulose, Heparin und Q-Sepharose als Capturealternativen via Batch-Versuchen .....	22
5.4	AX Capture: Einfluss der Resinmenge, Kontaktzeit und Verdünnung via Batch-Versuchen .....	24
5.5	AX Capture: Einfluss der Probenmatrix auf das Bindungsverhalten von BSA via Chromatographieanlage .....	28
5.6	AX Capture: pH Scouting via Chromatographieanlage .....	29
5.7	AX Capture: Resin Scouting via Chromatographieanlage .....	32
5.8	AX Capture: Variation der Flussrate via Chromatographieanlage .....	38
5.9	Optimierter Capture-Schritt via Chromatographieanlage .....	41
5.10	Kostenrechnung Kalkulation .....	46
6	Fazit .....	47
III	Literaturverzeichnis .....	50
IV	Anhang .....	53

# I **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Protein Molecular Weight Standard (P-66499).....	16
Abbildung 2: Diagramm; Aktivitätsverlust gegen die Lagerzeit.....	21
Abbildung 3: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Capture-Alternativen; Batch Versuche.....	23
Abbildung 4: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; 250 µL Slurry; Batch Versuche.....	24
Abbildung 5: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; 50 µL Slurry; Batch Versuche.....	25
Abbildung 6: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; 250 µL Slurry, Load 1:2 verdünnt; Batch Versuche.....	26
Abbildung 7: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Verdünnungsreihe der Probe; Batch Versuche.....	27
Abbildung 8: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Matrixeffekte; B000 AX04 R001-R003.....	28
Abbildung 9: Elutionspeaks; pH-Scouting; B000 A2 S001 L001-L008.....	30
Abbildung 10: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; pH-Scouting; B000 A2 S001 L003-L007.....	31
Abbildung 11: Elutionspeaks; Resin-Scouting; B000 A2 S002 S003.....	34
Abbildung 12: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S002 L001-L003.....	35
Abbildung 13: Elutionspeaks; Resin-Scouting; B000 A2 S004-S005.....	36
Abbildung 14: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S004 L001-L002.....	37
Abbildung 15: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Flussrate; B000 A4 AX06 R001-R002.....	39
Abbildung 16: Chromatogramm; Flussrate; B000 A4 AX06 R001.....	39
Abbildung 17: Chromatogramm; Flussrate; B000 A4 AX06 R002.....	40
Abbildung 18: Chromatogramm; optimierter Lauf; B000 A4 AX06 R003.....	42
Abbildung 19: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; optimierter Lauf; B000 A4 AX06 R003.....	43
Abbildung 20: SDS-PAGE mit Silber-Färbung; optimierter Lauf; B000 A4 AX06 R003.....	43
Abbildung 21: Chromatogramm; Einfluss der Matrix; B000 A2 AX04 R001.....	56
Abbildung 22: Chromatogramm; Einfluss der Matrix; B000 A1 AX04 R002.....	56
Abbildung 23: Chromatogramm; Einfluss der Matrix; B000 A1 AX04 R003.....	57
Abbildung 24: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; pH-Scouting; B000 A2 S001 L001-L003.....	57
Abbildung 25: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L001.....	58
Abbildung 26: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L002.....	58
Abbildung 27: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L003.....	59
Abbildung 28: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; pH-Scouting; B000 A2 S001 L004-L006.....	59
Abbildung 29: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L004.....	60
Abbildung 30: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L005.....	60
Abbildung 31: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L006.....	61
Abbildung 32: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; pH-Scouting; B000 A2 S001 L007.....	61
Abbildung 33: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L007.....	62
Abbildung 34: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L001.....	62
Abbildung 35: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L002.....	63
Abbildung 36: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L003.....	63
Abbildung 37: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting.....	64
Abbildung 38: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L004.....	64
Abbildung 39: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L005.....	65
Abbildung 40: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L006.....	65
Abbildung 41: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S002 L007.....	66
Abbildung 42: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L007.....	66
Abbildung 43: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S003 L005-L006.....	67
Abbildung 44: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S003 L005.....	67
Abbildung 45: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S003 L006.....	68
Abbildung 46: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S003 L007.....	68
Abbildung 47: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S003 L007.....	69
Abbildung 48: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S004 L001.....	69
Abbildung 49: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S004 L002.....	70
Abbildung 50: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S005 L001-L002.....	70
Abbildung 51: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S005 L001.....	71
Abbildung 52: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S005 L002.....	71

## II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräteliste .....	9
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial .....	9
Tabelle 3: Chromatographie-Puffer.....	10
Tabelle 4: Säulen und Resins .....	11
Tabelle 5: Chromatographieanlagen .....	14
Tabelle 6: Fermentationsmedium .....	14
Tabelle 7: Reagenzien für das Aktivitätsassay .....	18
Tabelle 8: Pipettierschema für den Aktivitätsassay.....	18
Tabelle 9: Legende für die Auswertung des Aktivitätsassays .....	19
Tabelle 10: Aktivitätsassay; Einfrierzyklen .....	20
Tabelle 11: Aktivitätsassay; Lagerungsdauer.....	21
Tabelle 12: Probennomenklatur; Kontaktzeit, Resinmenge, Verdünnung.....	24
Tabelle 13: Laufnomenklatur; pH-Scouting.....	30
Tabelle 14: Laufnomenklatur; Resin-Scouting.....	33
Tabelle 15: Parameter; optimierter Lauf .....	41
Tabelle 16: Massenbestimmung; optimierter Lauf.....	44
Tabelle 17: Aktivitätsassay; optimierter Lauf .....	44
Tabelle 18: Aktivitätsbestimmung; optimierter Lauf .....	45
Tabelle 19: Aktivitätsassay; Überprüfung .....	55

## 1 Zusammenfassung

Durch die Produktion einer Nuklease soll ein Mittel geschaffen werden, das einer Vielzahl von Aufreinigungsprozessen zu effektiveren und vereinfachten Strategien verhilft. Die Nuklease ist in der Lage DNA-bedingte Viskosität durch Hydrolyse der DNA zu reduzieren. Desweiteren können biotechnologische Produkte von DNA-Kontaminationen auf effektive Weise befreit werden.

Das Ziel der Bachelorarbeit ist die Etablierung eines Capture-Schrittes dieser rekombinanten, sekretierten Nuclease, der für die großtechnische Produktion qualifiziert sein muss. Der Fokus liegt auf der Produkt- und Aktivitätswiederfindungsrate des Zielproduktes. Die Verwendung der SDS-PAGE zur Konzentrationsbestimmung und die Verwendung eines Aktivitätsassays zur Aktivitätsquantifizierung erwiesen sich dabei, wie auch schon in vorangegangenen Arbeiten, als hilfreiche und wirkungsvolle Instrumente.

Durch den betriebenen Aufwand der pH-, Adsorbentien-, und Probenmatrixoptimierung konnten Informationen gesammelt werden die zur sukzessiven Optimierung des Capture-Schrittes beitragen.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass der Einsatz von Anionenaustauschern zur Aufreinigung des Zielproteins, wie oft in der Literatur beschrieben, prinzipiell funktioniert. Die Gegenüberstellung verschiedener Anionenaustauscheradsorbentien, die Ermittlung eines geeigneten pH-Wertes, sowie die Erkenntnisse über die Fermentationsmatrix sind wichtige erste Schritte zur Etablierung eines großtechnischen Prozesses.

Einige kritische Punkte, wie die Suche nach stabilisierenden Komponenten in der Produktlösung und die problematischen Lagerbedingungen konnten aufgedeckt werden und können in zukünftigen Arbeiten mit dem Zielprotein gezielt adressiert werden.

## 2 Einleitung

Diese Bachelorarbeit geht aus einem firmeninternen Projekt bei *Richter-Helm Biologics* hervor. Ziel des Projektes ist die Prozessentwicklung eines sekretierten Enzyms<sup>1</sup>, welches DNase- und RNase-Aktivität aufweist. Dieses kann als Hilfsmittel bei verschiedenen Downstreamprozessen Anwendung finden. Vor allem dann, wenn die durch DNA-bedingte Viskosität zu Problemen im Prozess führt oder meist rekombinante Proteine von DNA und RNA dekontaminiert werden müssen. Die Verwendung von Nukleasen ist ein preiswertes Mittel, um dieser Forderung gerecht zu werden (BENEDIK und STRYCH, 1998).

Innerhalb dieses Projektes ist es das Ziel dieser Bachelorarbeit einen geeigneten Capture-Schritt für das Zielprotein zu etablieren. Diese Arbeit baut auf einer vorangegangenen Bachelorarbeit (MIR, 2012) auf, die sich mit der Optimierung der Fermentationsausbeute des Zielproteins beschäftigte. Da das Zielprotein von dem Expressionsstamm direkt in das Medium sekretiert wird, stellt der Capture-Schritt eine erste Aufreinigung und Konzentrierung des Zielproteins aus dem Fermentationsmedium dar. Der Vorteil der Sekretion des Zielproteins in das Medium ist der dadurch erleichterte Aufreinigungsprozess. Denn durch die Sekretion entfällt der Schritt der Zellyse und der damit vermehrt auftretende Aufwand Störfaktoren, wie z.B. andere Proteine von dem Zielprotein trennen zu müssen. Zusätzlich ist das sekretierte Enzym nicht der Gefahr von intrazellulären Proteasen ausgesetzt. Die Sekretion verhindert zudem eine zu hohe Aktivität des Zielproteins innerhalb der Zelle, was eine Gefahr für das genetische Material der Expressionskultur darstellen und zum vorzeitigen Absterben der Kultur führen kann.

Da der Capture-Schritt im Rahmen einer Produktion im großtechnischen Maßstab eingesetzt werden soll, wurde im Zuge dieser Bachelorarbeit versucht mittels einer pH-, Resin-, Probenmatrix- und Methodenoptimierung einen effektiven Capture-Schritt zu entwickeln, der das Potential hat einer industriellen Produktion gerecht zu werden. Mit Hilfe der SDS-PAGE und eines Aktivitätsassays kann dabei nicht nur die Konzentration des gereinigten Produktes bestimmt werden, sondern auch dessen enzymatische Aktivität.

---

<sup>1</sup> im weiteren Verlauf der Arbeit als „Zielprotein“ bezeichnet

### 3 Eigenschaften des Zielproteins

Das Zielprotein schneidet RNA und DNA in doppel- und einzelsträngiger Form in Basenpaare von 6-8 Basen Länge. Um das Protein zu aktivieren werden 2-wertige Kationen benötigt; bevorzugt  $Mg^{2+}$ . Sein Temperaturoptimum liegt zwischen 35 °C und 37 °C und arbeitet in einem Bereich von 0 °C - 42 °C. Das Protein ist in einem pH-Bereich von 6 - 10 aktiv, wobei das Optimum bei pH 8 liegt. Das Enzym besteht aus 2 jeweils 27 kDa großen Untereinheiten. Der isoelektrische Punkt des Zielproteins liegt bei ca. pH 6,9 (BENEDIK und STRYCH, 1998). Die cDNA-Sequenz des Zielproteins stammt aus *Serratia marcescens*.

Für den Erfolg der Aufreinigung wird ein Aktivitätsassay (Kapitel 4.2.5) verwendet, das die enzymatische Aktivität des Zielproteins misst.

Die Bachelorarbeit baut auf vorangegangenen Arbeiten bei *Richter-Helm Biologics* auf (Ergebnisse sind lokal auf dem Server von *Richter-Helm Biologics* hinterlegt), durch die bereits eine basale Aufreinigungsstrategie für das Zielprotein entwickelt werden konnte. Die chromatographische Methode des Capture-Schrittes wurde mit dem Adsorbens *Fractogel EMD TMAE (M)* durchgeführt. Die Produktwiderfindungsrate lag bei 20 % und die Aktivitätswiderfindungsrate bei 10 %.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

Tabelle 1: Geräteliste

Gerät	Hersteller	Produktname
Chromatographie-Anlage	GE Healthcare Life Sciences	ÄKTA Explorer
Chromatographie-Anlage	GE Healthcare Life Sciences	ÄKTA Purifier
Electrophoresis Power Supply	Amersham Pharmacia Biotec	EPS 601
Imaging System	Biorad	ChemiDoc XRS
PH-/Leitfähigkeits-Meter	Metler Toledo	MPC227
Photometer	Perkin Elmer	UV/VIS Spectrometer EZ 301
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte	Pipetus
Schüttelwasserbad	hilab	GFL 1083
Schüttler	HASSA Laborbedarf	STS CAT
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer 5437
Tischzentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5415
Überkopfschüttler	Dynal	MX-1
Waage	Sartorius	LP6200S

Die in Tabelle 1 aufgeführten Geräte wurden durchgängig verwendet.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Substanz	Hersteller
1 M Natronlauge	Merck
25% Salzsäure	Merck
33% Natronlauge	Merck
72% Perchlorsäure	Sigma-Aldrich
BIS-TRIS	Merck
BSA $\geq$ 96%	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
MES SDS Running Buffer	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natrium Citrate	Merck
NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen
NuPAGE MES SDS Running Buffer	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent (10X)	Invitrogen
Protein Molecular Weight Standards (P-6649)	Molecular Probes
SilverXpress Silver Staining Kit	Invitrogen
Simply Blue SafeStain	Invitrogen
Sonicated salmon sperm DNA	Sigma-Aldrich
TRIS	Merck

Das in Tabelle 2 aufgeführte Verbrauchsmaterial wurde durchgängig verwendet.

**Tabelle 3: Chromatographie-Puffer**

	Bezeichnung	Zusammensetzung	pH
<b>Anion Exchange</b>	AX-Puffer-A1	50 mM TRIS	9,0
	AX-Puffer-B1	50 mM TRIS; 500 mM NaCl	9,0
	AX-Puffer-A2	25 mM TRIS	7,5
	AX-Puffer-B2	25 mM TRIS; 1 M NaCl	7,5
	AX-Puffer-A3	50 mM TRIS; 70 mM BIS-TRIS	7,0
	AX-Puffer-B3	50 mM TRIS; 70 mM BIS-TRIS; 1 M NaCl	7,0
<b>DNA Cellulose</b>	DC-Puffer-A	50 mM Na Citrate	4,0
	DC-Puffer-B	50 mM Na Citrate; 1 M NaCl	4,0
<b>Heparin</b>	HE-Puffer-A	40 mM TRIS; 2 mM MgCl <sub>2</sub>	7,5
	HE-Puffer-B	40 mM TRIS; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 M NaCl	7,5

Tabelle 3 zeigt die verwendeten Equilibrierungspuffer (Puffer-A) und Elutionspuffer (Puffer-B). Die Proteinelution erfolgt ausschließlich mit der Verwendung von Natriumchlorid. Die verwendeten AX-Puffer-A1 und -B1 gehen aus vorigen Arbeiten bei *Richter-Helm Biologics* mit dem Zielprotein hervor. Die AX-Puffer-A2 und -B2 wurden zum Teil im Batch (Kapitel 4.2.2) verwendet, da der Elutionspuffer eine höhere NaCl-Konzentration enthält als der AX-Puffer-B1. Mit der dadurch höheren Ionenstärke sollte eine komplette Elution der Proteine von den Adsorbentien im Batch (ohne Onlineanalytik) gewährleistet werden. Während des pH-Scoutings wurde ein BIS-TRIS-Puffer verwendet, da dieser über einen größeren pH-Bereich Pufferwirkung aufweist als die AX-Puffer-A1 und -A2. Aus dem pH-Scouting sind die AX-Puffer-A3 und -B3 hervorgegangen. Die Verwendung der DC-Puffer geht auf eine Veröffentlichung über die Aufreinigung einer Nuclease zurück (TAKESHITA et al., 1995). Die HE-Puffer stammen aus einem Protokoll von Pall (PALL, „Heparin HyperD® M Affinity Chromatography Sorbent“).

### 4.1.1 Verwendete Ionenaustauscher und Affinitätsträger

Tabelle 4: Säulen und Resins

Hersteller	Resin	Volumen	Höhe	Durchmesser	Art
BioRad	UNOsphere Q	1 mL	1,92 cm	0,82 cm	AX
GE Healthcare	DEAE Sepharose FF	1 mL	1,92 cm	0,82 cm	AX
GE Healthcare	DNA Cellulose (native DNA)	-Pulver-			AF
GE Healthcare	Q Sepharose XL	1 mL	1,92 cm	0,82 cm	AX
GE Healthcare	Q Sepharose	-Slurry-			AX
Invitrogen	POROS 50 HQ	1 mL	1,92 cm	0,82 cm	AX
Merck	Fractogel EMD TMAE Hicap (M)	1 mL	1,92 cm	0,82 cm	AX
TOSOH	Heparin Hyper D M	-Slurry-			AF
TOSOH	Toyopearl Super Q 650 M	1 mL	1,92 cm	0,82 cm	AX
TOSOH	Toyopearl QAE 550 C	1 mL	3,00 cm	0,64 cm	AX
TOSOH	Toyopearl DEAE 650 M	1 mL	3,00 cm	0,64 cm	AX
TOSOH	Toyopearl Gigacap Q 650 M	1 mL	3,00 cm	0,64 cm	AX
TOSOH	Toyopearl Q 600C AR	1 mL	3,00 cm	0,64 cm	AX

Chromatographieträger unterscheiden sich in vielen Faktoren. Sie werden nach der Art der Bindung unterschieden. Die Materialien unterscheiden sich in der Porengrößenverteilung, der Partikelgröße, den funktionellen Gruppen und in der Matrix, an die die funktionellen Gruppen gebunden sind. Desweiteren können funktionelle Gruppen nicht nur direkt an die Matrix gebunden werden, sondern auch über z.B. lange polymere Ketten mit der Matrix verknüpft sein. Alle diese Eigenschaften können je nach Anforderung des Capture-Schrittes Einfluss auf den Erfolg der Bindung des Zielproteins an das Adsorbens haben. Tabelle 4 zeigt die verwendeten Säulen und Adsorbentien.

In dieser Bachelorarbeit werden Anionenaustauscher und zwei spezifische Affinitätsresins verwendet. Die Idee des Einsatzes der Ionenaustauscher und der Affinitätsadsorbentien für den Capture-Schritt stammt aus einem Protokoll zur Aufreinigung einer Nuclease (MOLIN et al., 1992).

### 4.1.2 Ionenaustauscher

Die für diese Bachelorarbeit verwendeten Ionenaustauschadsorbentien sind ausschließlich starke und schwache Anionenaustauscher (Tabelle 4). Die für den Ionenaustausch zuständigen funktionellen Gruppen geben dem Ionenaustauscher die Eigenschaften eines starken oder schwachen Anionenaustauschers. Ein starker Anionenaustauscher ist über einen großen pH-Bereich stabil, bleibt also ionisiert, wohingegen ein schwacher Anionenaustauscher mit der

Änderung des pH-Wertes durchaus Protonen abgeben kann und damit nicht über den kompletten pH-Bereich voll geladen bleibt. DEAE- also Diethylaminoethylgruppen ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}^+(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$ ) sind schwache Anionenaustauscher. TMAE- also Trimethylaminoethyl- bzw. Q- also quaternäre Ammoniumverbindungen ( $-\text{O}-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) dagegen sind starke Anionenaustauscher. Die funktionellen Gruppen sind kovalent mit der Resinmatrix verbunden. Die verwendeten Resins bestehen entweder aus einer Polystyrol- oder Polysaccharidmatrix wie z.B. Agarose oder Dextran. (GE HEALTHCARE, „Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing“). Agarose Chromatographieträger werden unter dem Handelsnamen Sepharose vertrieben.

Das *UNOsphere Q* Resin ist also wie oben angesprochen ein starker Anionenaustauscher. Die Resinmatrix besteht aus hydrophilen, sphärischen, polymeren Beads. Die Beads besitzen einen durchschnittlichen Durchmesser von 120  $\mu\text{m}$ .

Die *DEAE Sepharose FF* besteht aus quervernetzter Agarose. Die Quervernetzung wurde so optimiert, dass nach Herstellerangaben exzellente Flusseigenschaften erreicht werden können. „FF“ steht dabei für Fast Flow. Die Durchmesser der Beads liegen zwischen 45 und 165  $\mu\text{m}$  (GE HEALTHCARE, „CM Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow, DEAE Sepharose Fast Flow, Q Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow“).

Die *Q Sepharose XL* besitzt zusätzlich zu der stark quervernetztem Agarosematrix lange kovalent gebundene Dextranketten mit den daran gebundenen funktionellen Gruppen. Die Dextranketten sollen dazu führen, dass die funktionellen Gruppen des Resins besonders gut freiliegen und damit gut für tauschbare Ionen zugänglich sind. Die durchschnittliche Partikelgröße beträgt 90  $\mu\text{m}$  (GE HEALTHCARE, „Q Sepharose XL, Q Sepharose XL virus licensed, SP Sepharose XL“).

*Poros 50 HQ* ist ein mit quaternären Ammoniumverbindungen oberflächenbedecktes Resin. Dieses besitzt eine quervernetzte Polystyrolmatrix, die sogenannte Durchflusspartikel darstellt. Die Partikel besitzen einen Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$  (POROS, „POROS® 50 HQ, DEAE, and PI, Perfusion Chromatography®“).

Das *Fractogel EMD TMAE Hicap (M)* besteht aus synthetischen polymeren Methacrylatverbindungen. Lange polymere Ketten („Tentakeln“), welche kovalent an die Matrix gebunden sind, tragen die funktionellen Gruppen, was sterische Behinderungen auf ein Minimum reduziert. Die Beads weisen eine Größenverteilung von 40 - 90  $\mu\text{m}$  auf. Das „Hicap“ deutet auf eine verbesserte Kapazität im Gegensatz zu dem gewöhnlichen *Fractogel EMD TMAE* hin (EMD CHEMICALS INC., „Fractogel® EMD Process Media“).

Die *Toyopearl* Resins besitzen eine hydroxylierte polymere Methacrylbasis. Die Zahlen in den Verkaufsnamen der Adsorbentien weisen dabei auf die Porengröße hin, sind also ein Maß für die Quervernetzung der Basis. 650 steht für 1000 Å, 600 für 750 Å und 550 für 400 – 500 Å. Das „M“ in der Resinsbezeichnung steht für eine Partikelgröße von 40 - 90 µm und das „C“ für eine Größe von 90 - 120 µm (TOSOH, „Ion Exchange Chromatographie“).

Das *Toyopearl Gigacap Q 650 M* Resin verweist zusätzlich darauf, dass es speziell für chromatographische Bedürfnisse entworfen wurde, welche Ansprüche an hohe Durchflussraten haben (TOSOH, „TOYOPEARL GigaCap® Q-650M“).

Das *Toyopearl QAE 550 C* Resin besitzt ebenfalls eine quaternäre funktionelle Ammoniumgruppe. Diese ist allerdings mit einer Ethyl-gruppe an die Matrix gebunden (TOSOH, „Ion Exchange Chromatographie“).

Das *Toyopearl Q 600 C AR* Resin verweist durch das „AR“<sup>2</sup> auf eine besonders hohe Laugenresistenz (TOSOH, „TOYOPEARL® Q-600C AR“).

#### 4.1.3 Affinitätsträger

Zusätzlich zu den oben beschriebenen gekauften Säulen wurden *DNA Cellulose (native DNA)* von *GE Healthcare* und *Heparin HyperD M* von *Pall* im Batch verwendet. Diese Adsorbentien sind keine Anionenaustauscher, sondern zählen zu der Gruppe der Affinitätsmedien. Der Vorteil von Affinitätsadsorbentien besteht in der hohen Selektivität, also in der spezifischen Affinität zwischen Ligand und Protein. Die gewählten Affinitätsadsorbentien besitzen Liganden aus DNA oder DNA-ähnlichen Strukturen. Eine Vielzahl von Proteinen interagiert innerhalb der Zelle mit DNA. Da das Zielprotein DNase-Aktivität aufzeigt, sollte Affinität gegenüber den Liganden bestehen.

Das *Heparin HyperD M* Resin weist eine Affinität gegenüber Endonucleasen und einer ganzen Reihe weiterer DNA- RNA-abhängiger Enzyme auf (PALL, „Heparin HyperD® M Affinity Chromatography Sorbent“). Die angesprochene Affinität des Adsorbens beruht auf der DNA-ähnlicher Struktur des Polysaccharides Heparin.

Die *DNA Cellulose* erlaubt es Proteine zu trennen, die in prokaryontischen Zellen mit DNA interagieren (FOX et al., 1997).

---

<sup>2</sup> AR – Alkaline Resistant

#### 4.1.4 Chromatographieanlagen

Tabelle 5: Chromatographieanlagen

Bezeichnung	A1	A2	A4
Anlagentyp	Äkta Purifier	Äkta Explorer	Äkta Purifier
Durchmesser Mischkammer	2 mm	0,6 mm	2 mm
Innendurchmesser Tubing	1 mm	0,5 mm	0,75 mm
Durchmesser UV Zelle	2 mm	2 mm	2 mm

Tabelle 5 zeigt die verwendeten Chromatographieanlagen und deren signifikantesten Unterschiede. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die Anlagen bei *Richter-Helm Biologics* so ausgelegt sind, dass die Ergebnisse untereinander vergleichbar sind. Die Wahl der verwendeten Chromatographieanlage hing größtenteils von der Verfügbarkeit der Anlage ab. Die unterschiedliche Auslegung der Anlagentypen wurde bei der Diskussion an relevanten Stellen berücksichtigt.

#### 4.1.5 Verwendete Probe

Die verwendete Probe (1 Liter) ist ein abzentrifugierter Fermentationsüberstand, der aus einer Bachelorarbeit hervorgegangen ist (MIR, 2012). Die Probe ist in dieser Arbeit und auf dem lokalen Server von *Richter-Helm Biologics* unter „U01“ dokumentiert. Der pH-Wert der verwendeten Probe liegt bei 6,88. Die Leitfähigkeit beträgt 29,2 mS. Als die ersten Arbeiten mit der Probe beginnen konnten, lagerte diese schon 13 Tage bei -20 °C.

Tabelle 6: Fermentationsmedium

Substanz	Konzentration [g/l]
Glycerin	25,0
Hefeextrakt	14,0
Soja Pepton	27,0
NaCl	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,65
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,85
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5
Desmophen	0,1
Kanamycin	0,05
pH-Wert	7,0 ± 0,1

Tabelle 6 zeigt die Zusammensetzung der Medienbestandteile des Fermentationsmediums.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 SDS-PAGE

Für die SDS-Page wurde das *NuPAGE* System von *Invitrogen* und der Electrophoresis Power Supply von *Amersham Pharmacia Biotec* genutzt. Es wurden ausschließlich 4-12 %ige BIS-TRIS Fertiggele, mit 15 oder 26 Taschen, von *Invitrogen* verwendet. Die Proben wurden mit *NuPAGE Sample Reducing Agent (10X)* und *NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)* behandelt. Dadurch, dass nur reduzierende BIS-TRIS Gele angefertigt wurden ist die Produktbande auf den Gelen bei 27 kDa zu finden. Nach der Zugabe der Agenzien wurden die Proben homogenisiert, für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und wieder homogenisiert. In jede Tasche wurden 15 µL Probenansatz und damit 9,75 µL Probe pipettiert. Es wurde *NuPAGE® MES SDS Running Buffer* verwendet. Die angelegte Spannung betrug über einen Zeitraum von 30 min 200 V.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele jeweils dreimal mit 200 mL Reinstwasser für 1 min bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt und 5 min gewaschen.

Um die Gele mit Coomassie zu färben, wurden sie in 100 mL *Simply Blue SafeStain* - Färbelösung von *Invitrogen* überführt und wieder 1 min in der Mikrowelle erhitzt. Nach 45 min wurde die Färbelösung verworfen und die Gele dreimal für 10 min in Reinstwasser entfärbt. Die Silberfärbung wurde mit dem *SilverXpress® Silver Staining Kit* von *Invitrogen* durchgeführt (INVITROGEN, „SilverXpress® Silver Staining Protocol“).

Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem Imaging System *ChemiDoc XRS* und der dazugehörigen Software *Quantatiy One* von *BioRad*. Die *Quantatiy One* Reports sind lokal auf dem Server von *Richter-Helm Biologics* hinterlegt.

Um ein aufwendiges Proteinassay wie z.B. das Bradfordassay zu vermeiden wurden die SDS-Gele zur Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet. Die Konzentrationsbestimmung der Gele erfolgte mit einem optischen Verfahren. Das Verfahren beruht auf einem linearen Anstieg der Bandenstärke bei Proteinkonzentrationserhöhungen, mit einer Coomassiefärbung. Dazu wurde eine BSA-Standardreihe von 10 oder 20 bis 200 µg/ml und das Programm *Image Lab* von *BioRad* verwendet.

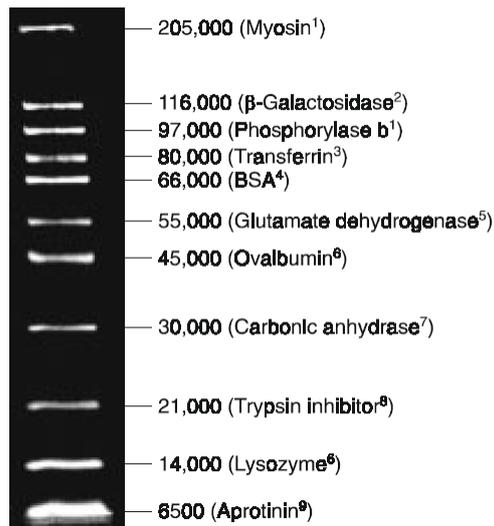


Abbildung 1: Protein Molecular Weight Standard (P-66499)

Der verwendete Marker *Protein Molecular Weight Standards (P-6649)* (Abbildung 1) von der Firma *Invitrogen* deckt einen Bereich von 6500 bis 205000 Dalton ab (INVITROGEN: „Protein Molecular Weight Standards (P-6649)“). Der Marker wurde ebenso behandelt, wie die Proben.

#### 4.2.2 Batch Versuche

Die Slurry<sup>3</sup> wurde in 2 mL Mikroreaktionsgefäße oder 15 mL und 50 mL Reaktionsgefäße gegeben und dreimal mit dem 4-fachen Slurryvolumen des jeweiligen Puffer-A (Tabelle 3) über einen Zeitraum von 5 min im Überkopfschüttler equilibriert. Die Gefäße wurden mit 13000 rpm, was einer Beschleunigung von 15600 g entspricht, mit der *Centrifuge 5415* von *Eppendorf* abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Proben zu dem Resin gegeben und für 10 min in den Überkopfschüttler gestellt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde mit identischem Volumen des A-Puffers gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Proteine mit dem wieder gleichen Volumen B-Puffer dissoziiert. Diese befinden sich nach nochmaliger Zentrifugation im Überstand. Das Resin wurde mit 2 CV<sup>4</sup> 1 M NaOH gereinigt und in 20 mM NaOH gelagert.

<sup>3</sup> Slurry – Resin in Lagerlösung

<sup>4</sup> CV – Column Volume

### 4.2.3 Chromatographie

Die Chromatographie wurde mit dem *ÄKTA Purifier*- und *ÄKTA Explorer*-System von *GE Healthcare* durchgeführt. Die Programmierung, Dokumentation und Auswertung der Läufe<sup>5</sup> erfolgte mit dem dazugehörigen Programm *UNICORN 5*. Die Methoden der einzelnen Läufe befinden sich detailliert im Anhang (*IV.a Methoden der Chromatographie-Läufe*). Die kompletten Reports sind unter nachfolgendem Schema auf dem lokalen Server von *Richter-Helm Biologics* hinterlegt.

Die Läufe sind wie folgt benannt:

- Bxxx steht für die Projektnummer
- Ax steht für die Chromatographieanlage
- AX xx steht für die Art der Chromatographie (hier: Anionexchange) und die verwendete Säule
- Rxxx steht für die Nummer des Chromatographie-Laufes
- Beispiel: B000 A4 AX06 R001 (Projekt B000; Chromatographieanlage Äkta 4; Anionenaustauschersäule 06; Lauf 001)

Scouting Läufe sind wie folgt benannt:

- Bxxx steht für die Projektnummer
- Ax steht für die Chromatographieanlage
- Sxxx steht für die Scoutingmethode
- Lxxx steht für die einzelnen Läufe innerhalb einer Scoutingmethode
- Beispiel: B000 A2 S002 L002 (Projekt B000; Chromatographieanlage Äkta 2; Scoutingmethode 002 ; Lauf 002)

Die Proben wurde mit der Probenpumpe *P-960* von *GE Healthcare*, die in allen verwendeten Anlagen integriert ist, auf die Säule appliziert.

### 4.2.4 CIP

Die Säulen wurden nach den Läufen mit 10 CV 0,5 M NaOH Lösung gereinigt. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Lösung durch 10 CV 20 mM NaOH verdrängt, in welcher die Säule gelagert werden konnte. Sollte die Säule direkt wiedergenutzt werden, so wurde die 0,5 M NaOH mit 10 CV Reinstwasser verdrängt.

---

<sup>5</sup> Lauf - gängiger Begriff bei *Richter-Helm Biologics*; Durchführung eines Trennungsvorgangs mittels Chromatographiesystem

### 4.2.5 Aktivitätsassay

Für den Erfolg der Aufreinigung des Zielproteins wird ein Aktivitätsassay verwendet.

**Tabelle 7: Reagenzien für das Aktivitätsassay**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Reagenz A	1mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 mg/mL BSA; 50 mM TRIS; pH 8
Reagenz B	1mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 mg/mL BSA; 50 mM TRIS; 1mg/mL sonicated salmon sperm DNA (Sigma); pH 8
Perchlorsäure	4%-ige Perchlorsäure Lösung

Das Aktivitätsassay misst die enzymatische Aktivität des Zielproteins. In Tabelle 7 sind die für das Aktivitätsassay benötigten Chemikalien aufgeführt. Das Magnesiumchlorid dient der Aktivierung des Enzyms. Das BSA<sup>6</sup> dient der Stabilisierung. Das Assay konnte zwar nicht mit der von dem Hersteller empfohlenen DNA durchgeführt werden, trotzdem sind die Einheiten mit denen des Herstellers vergleichbar, wie eine Überprüfung des Aktivitätsassays mit dem Originalprodukt und mit Originalprodukt versetzten Proben gezeigt hat (Anhang IV.b).

**Tabelle 8: Pipettierschema für den Aktivitätsassay**

Reagenz	Probe [mL]	Blank [mL]
Reagenz B	2,5	2,5
Enzym Lösung (Probe)	0,125	-
Reagenz A	-	0,125

Die Proben wurden, wie Tabelle 8 zeigt, pipettiert und bei 37 °C in einem Wasserbad erhitzt. Nach 15, 30, 45 und 60 Minuten wurden jeweils 0,5 mL Probe entnommen und auf 0,5 mL 4 %ige Perchlorsäure-Lösung gegeben um die Aktivität des Zielproteins zu stoppen und um langkettige DNA-Fragmente zu fällen. Die Proben wurden homogenisiert und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Die durch die Perchlorsäure gefällte DNA wurde abzentrifugiert und der Überstand bei 260 nm gegen den Blank vermessen. Die Auswertung erfolgte nach der Assaybeschreibung des Herstellers. Eine hohe Enzymaktivität führte zu einer hohen Konzentration an DNA-Fragmenten und damit zu einer hohen Absorption, da das Zielprotein DNase- RNase-Aktivität besitzt und die DNA-Fragmente, im Gegensatz zu hochmolekularer DNA, nicht von dem Fällungsvorgang betroffen waren.

<sup>6</sup> BSA – Bovine Serum Albumin

Die Aktivität wurde wie Tabelle 9 und die nachfolgende Formel zeigen berechnet.

**Tabelle 9: Legende für die Auswertung des Aktivitätsassays**

<b>A</b>	Absorption der Messlösung bei der Zeit t
<b>30</b>	Eine Unit ist bei 30 min definiert
<b>V</b>	Volumen der Messlösung
<b>2</b>	Verdünnungsfaktor der Messlösung
<b>F</b>	Verdünnungsfaktor der Probe
<b>t</b>	Inkubationszeit der Messlösung
<b>v</b>	Probenvolumen
<b>1000</b>	Umrechnungsfaktor mL zu $\mu$ L

$$\frac{Unit}{\mu l} = \frac{A * 30 * V * 2 * F}{t * v * 1000}$$

Bei dem Aktivitätsassay ist darauf zu achten, dass Reagenz B unmittelbar vor der Durchführung des Assay neu anzusetzen ist. Die Verwendung von altem Reagenz B führt zu einer Absorption von deutlich über 1,000 A, auch bei der Blank-Probe. Dies liegt daran, dass die gelöste DNA in dem Puffer nicht stabil ist.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Stabilität des Zielproteins nach mehrmaligen Einfrierzyklen

Um überprüfen zu können, ob ein Aktivitätsverlust nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen der Probelösung vorliegt, wurde die Probelösung nach 1-3 Zyklen auf ihre Aktivität mit dem Aktivitätsassay untersucht (Kapitel 4.2.5). Die Proben werden bei -20 °C eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut.

Tabelle 10: Aktivitätsassay; Einfrierzyklen

	Dilution Factor	Sample Volume [mL]	Total Volume [mL]
<b>1 X aufgetaut</b>	4000	0,125	2,625
<b>2 X aufgetaut</b>	4000	0,125	2,625
<b>3 X aufgetaut</b>	4000	0,125	2,625

t in min	1 X aufgetaut		2X aufgetaut		3 X aufgetaut	
	Absorbance [A]	Unit/μL	Absorbance [A]	Unit/μL	Absorbance [A]	Unit/μL
<b>15</b>	0,32	107,52	0,298	100,128	0,301	101,136
<b>30</b>	0,619	103,992	0,585	98,28	0,588	98,784
<b>45</b>	0,98	109,76	0,927	103,824	0,894	100,128
<b>60</b>	1,294	108,696	1,191	100,044	1,213	101,892
<b>∅</b>		<b>107,492</b>		<b>100,569</b>		<b>100,485</b>

Leider kann die Aktivität von frischer, noch nicht eingefrorener Probe nicht bestimmt werden, da die Probe, wie in Kapitel 4.1.5 bereits erwähnt, schon 13 Tage vor Beginn der Laborarbeiten lagerte. Die Ergebnisse der Tabelle 10 zeigen einen geringen Aktivitätsverlust auf, allerdings nur vom ersten Einfrierzyklus bis zum zweiten. Danach scheint die Aktivität stabil zu bleiben. Der Aktivitätsverlust von 107 Units/μL auf 100 Units/μL ist zwar nicht gravierend, trotzdem ist ein mehrmaliges Auftauen der Probe nicht zu empfehlen. Dank dieser Erkenntnis wurde ausschließlich mit einmalig aufgetauter Probe gearbeitet.

### 5.2 Stabilität des Zielproteins bei -20°C Lagertemperatur

Um feststellen zu können ob ein Aktivitätsverlust bei -20 °C Lagertemperatur über einen gewissen Lagerzeitraum vorliegt, werden die Ergebnisse verschiedener Aktivitätsassays der verwendeten Probe verglichen. Tabelle 11 und Abbildung 2 zeigen 3 aufgetaute Aliquoten nach einer Lagerungsdauer von 13, 26 und 70 Tagen.

Tabelle 11: Aktivitätsassay; Lagerungsdauer

	Dilution Factor	Sample Volume [mL]	Total Volume [mL]
End of Fermentation + 13d	4000	0,125	2,625
End of Fermentation + 26d	4000	0,125	2,625
End of Fermentation + 70d	2000	0,125	2,625

t in min	End of Fermentation + 13d		End of Fermentation + 26d		End of Fermentation + 70d	
	Absorbance [A]	Unit/ $\mu$ L	Absorbance [A]	Unit/ $\mu$ L	Absorbance [A]	Unit/ $\mu$ L
15	0,32	107,52	0,195	65,52	0,233	39,144
30	0,619	103,99	0,376	63,168	0,421	35,364
45	0,98	109,76	0,594	66,528	0,628	35,168
60	1,294	108,7	0,752	63,168	0,813	34,146
$\emptyset$		107,4925		64,596		35,9555

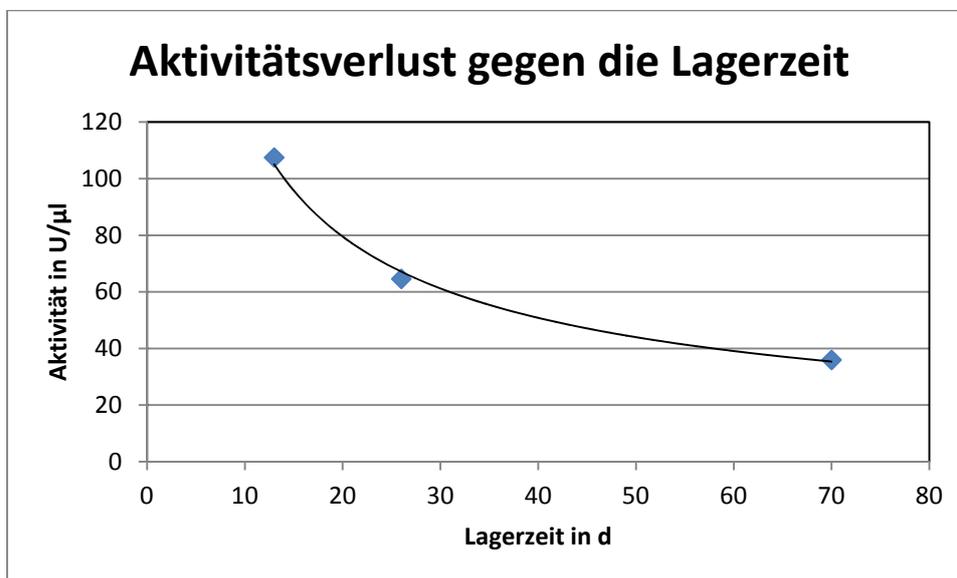


Abbildung 2: Diagramm; Aktivitätsverlust gegen die Lagerzeit

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt einen dramatischen Aktivitätsverlust. Nach 70 Tagen Lagerungsdauer liegt die Aktivität des Zielproteins nur noch bei knapp 33 % Prozent von der Aktivität der ersten Messung nach 13 Tagen. Daraus ergibt sich für zukünftige Arbeiten mit dem Enzym, dass immer mit möglichst frischer Probe gearbeitet werden sollte. Außerdem müssen die Lagerbedingungen optimiert werden. Dies kann entweder durch die Lagerung bei anderen Temperaturen oder mit der Etablierung eines geeigneten Lagerungspuffers geschehen.

### 5.3 DNA Cellulose, Heparin und Q-Sepharose als Capturealternativen via Batch-Versuchen

Der Impuls zwei spezifische Affinitätsresins als Capturealternativen zu dem in vorangegangenen Arbeiten verwendeten Resin *Fractogel EMD TMAE (M)* zu untersuchen, ist die Eigenschaft, dass das DNA Cellulose Resin durchaus affin gegenüber DNAsen ist (TAKESHITA et al., 1995). Das Adsorbens *Heparin HyperD M* wird verwendet, weil das Resin ebenfalls Affinität gegen DNA/RNA-bindende Enzyme aufweist, wie bereits in Kapitel 4.1 gezeigt ist. Zusätzlich zu den beiden Affinitätsresins wird ein weiterer Anionenaustauscher, die *Q-Sepharose*, auf seine Eignung als Captureresin untersucht. Die Wahl fällt auf die *Q-Sepharose*, da sie im Gegensatz zu dem vorher verwendeten *Fractogel EMD TMAE (M)* eine Agarosematrix und keine Matrix aus Polymethacrylatverbindungen besitzt. Außerdem unterscheiden sich die funktionellen Gruppen der beiden Adsorbentien. Durch diese Unterschiede wird eine Steigerung der Affinität des Zielproteins an das Resin erhofft. Für die *DNA Cellulose* werden die DC-Puffer-A und -B, für das *Heparin* die HE-Puffer-A und -B und für die *Q-Sepharose* die AX-Puffer-A2 und -B2 verwendet (Tabelle 3). Die Pufferwahl der HE-Puffer-A und B und der DC-Puffer-A und -B ist in Kapitel 4.1 beschrieben. Der AX-Puffer-B2 wurde verwendet um mit einem 1 molaren NaCl Anteil in diesem Batchversuch, ohne Onlineanalytik der Leitfähigkeit und der Proteinelution (UV<sub>280</sub>-Messung), sicherstellen zu können, dass alle Proteine von dem Adsorbens eluieren. Die Probe wird, aufgrund der Erfahrungen der vorangegangenen Arbeiten, mit dem jeweiligen A-Puffer 1:4 verdünnt. Die Auswirkungen der Verdünnung der Probe werden im Kapitel 5.4 separat untersucht. Es werden jeweils 250 µL Slurry von der *Q-Sepharose* und *Heparin* und außerdem 0,78 g *DNA Cellulose* (ungelöstes Resin) verwendet. Es wird viermal jeweils 1 mL verdünnte Probe geladen. Die restliche Durchführung der Versuche ist in Kapitel 4.2.2 beschrieben.

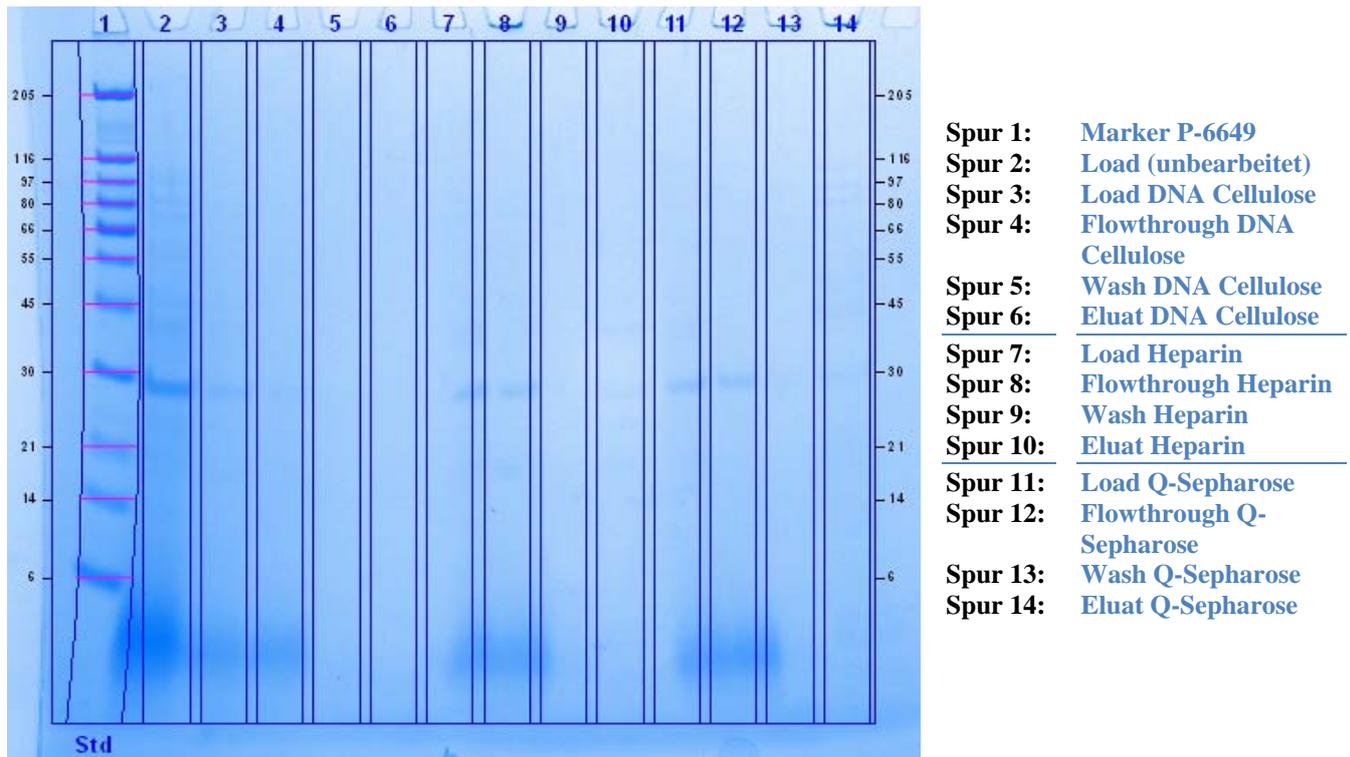


Abbildung 3: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Capture-Alternativen; Batch Versuche; Vergleich Q-Sepharose und Affinitätsträger

Abbildung 3 zeigt die Aufträge, Durchlauf- Wasch- und Elutionsfraktionen der getesteten Adsorbentien. Bei allen 3 Resins ist der größte Teil des Produkts (bei 27 kDA) im Durchlauf wiederzufinden. Auf Spur 10 und 14, also in den Elutionsfraktionen des *Heparins* und der *Q-Sepharose*, sind geringe Produktbanden zu sehen. Die beiden Affinitätsmedien haben nur eine ineffektive Anbindung gezeigt, da im Vergleich zum Auftrag auf Spur 3 und 7 in den Elutionsfraktionen auf Spur 6 und 10 kaum Produkt wiederzufinden ist. Auch die *Q-Sepharose* leistet bei den verwendeten Parametern keine starke Anbindung an das Zielprotein, wie die schwache Produktbande der Elutionsfraktion auf Spur 14 zeigt. Wegen der Erfahrung aus den vorangegangenen Arbeiten, dass Anionenaustauscher im Capture prinzipiell funktionieren, wurde die Idee eine Affinitätschromatographie als Capture-Schritt zu etablieren wieder verworfen und sich trotz des mäßigen Ergebnisses der *Q-Sepharose* auf Anionenaustauscher als Capturemedien konzentriert. Warum die Affinitätsträger nicht den gewünschten Effekt zeigten ist schwer zu sagen. Aufgrund der 1:4 Verdünnung mit dem HE-Puffer-A hat die Probenlösung für den Heparinträger einen pH-Wert der höher als 6,9 (isoelektrischer Punkt des Zielproteins) ist. Damit ist das Zielprotein negativ geladen. Aufgrund der stark negativen Ladung von Heparin (TILBEURGH, 1994) hat dies vielleicht die Anbindung verhindert.

## 5.4 AX Capture: Einfluss der Resinmenge, Kontaktzeit und Verdünnung via Batch-Versuchen

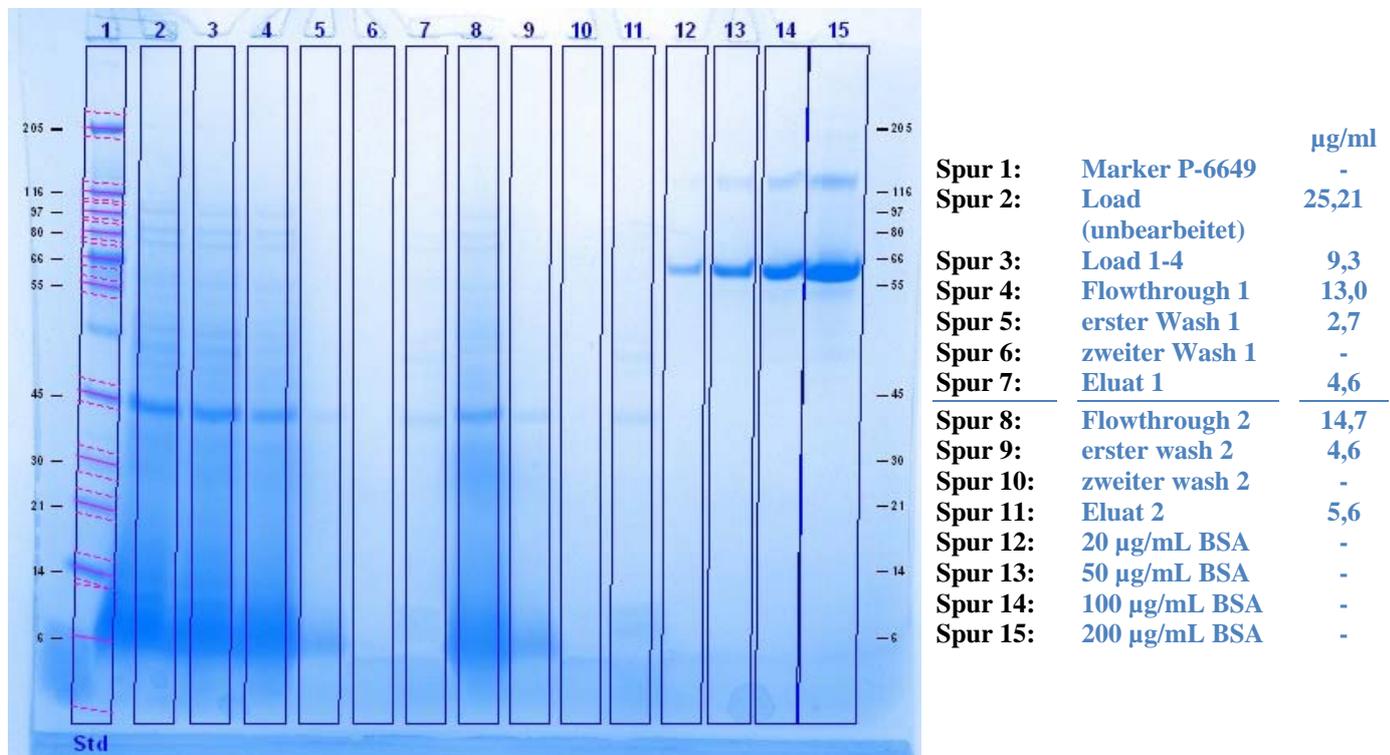
Ob die Produktwiederfindungsrate in den Elutionsfraktionen mit erhöhter Resinmenge, Kontaktzeit oder Verdünnungsrate gesteigert werden kann, wird mit weiteren Batchversuchen überprüft. Dazu wird das Resin *Fractogel EMD TMAE HiCap (M)* verwendet. Da dieses Material auch in vorangegangenen Arbeiten verwendet wurde, wurden auch die entsprechenden AX-Puffer-A1 und B1 verwendet.

Tabelle 12 verdeutlicht die verschiedenen Probenansätze dieser Versuchsreihe. Die Batchversuche werden wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben durchgeführt.

**Tabelle 12: Probenomenklatur; Kontaktzeit, Resinmenge, Verdünnung**

	2 min Kontakt	10 min Kontakt
250 $\mu$ L Slurry <sup>1</sup>	Probe 1	Probe 2
50 $\mu$ L Slurry <sup>1</sup>	Probe 3	Probe 4
250 $\mu$ L Slurry <sup>2</sup>	Probe 5	Probe 6

<sup>1</sup> Probe mit NaOH auf pH 9 gestellt  
<sup>2</sup> Probe 1:2 mit AX Puffer A1 verdünnt



**Abbildung 4: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; 250  $\mu$ L Slurry; Batch Versuche, Vergleich bei 2- und 10-min Kontaktzeit**

Abbildung 4 zeigt den Einfluss der längeren Kontaktzeit. Zusätzlich zu den einzelnen Fraktionen, ist auf das Gel ein BSA Größenstandard aufgetragen, um die Produktkonzentration optisch ermitteln zu können. Die Produktkonzentration ist in  $\mu\text{g/mL}$  neben der Abbildung 4 aufgeführt. Bei den 250  $\mu\text{L}$  Slurry-Proben ist kein Unterschied zwischen der 2- und 10-minütigen Kontaktzeit zu erkennen. Die Durchlauf- Wasch- und Elutionsfraktionen sind nahezu identisch. Dies bestätigen auch die optisch ermittelten Konzentrationen. Hier muss angemerkt werden, dass die Vielzahl der vermessenen Proben außerhalb des Bereiches der BSA-Kalibriergerade (20 - 200  $\mu\text{g/mL}$ ) liegen. Es verwundert deshalb nicht, dass die Daten der Probe 1 und 2 nicht genau übereinstimmen.

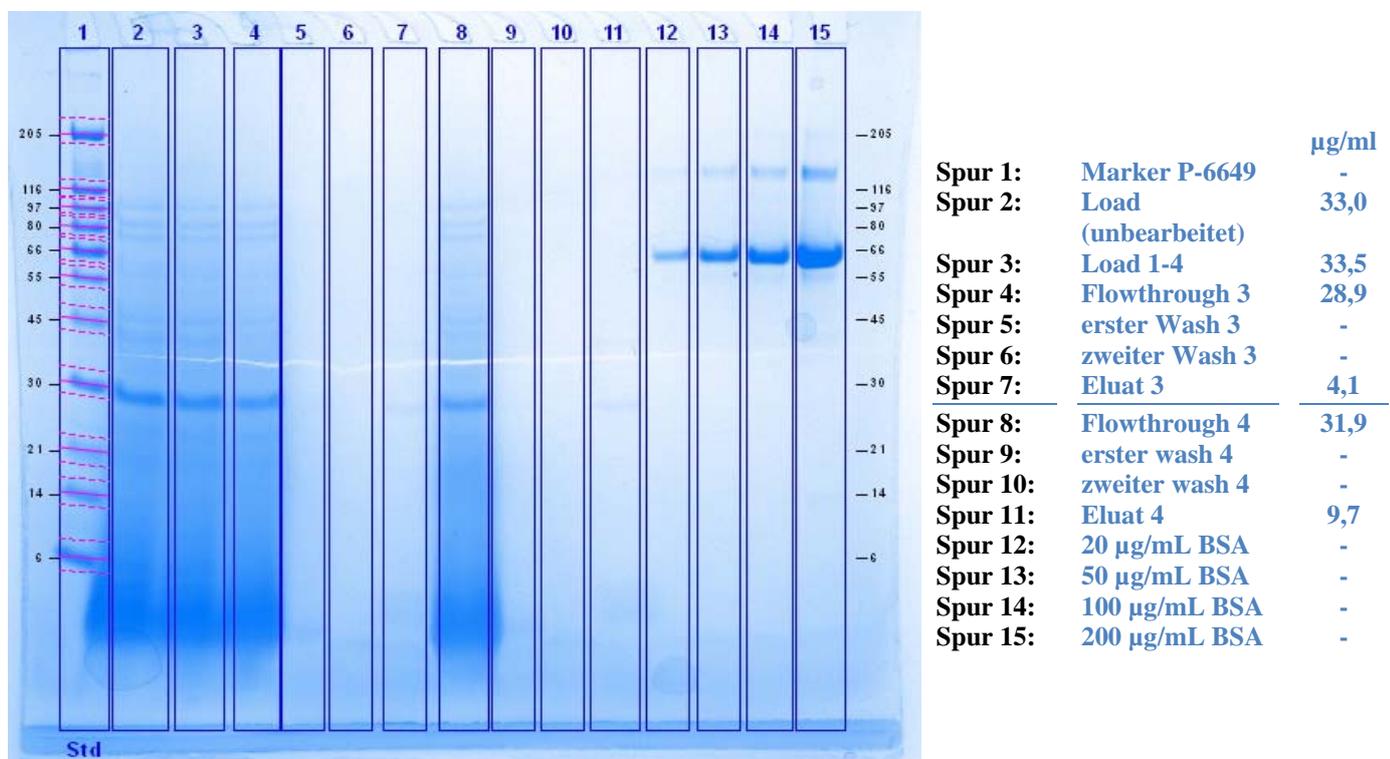


Abbildung 5: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; 50  $\mu\text{L}$  Slurry; Batch Versuche; Vergleich bei 2- und 10-min Kontaktzeit

Auf Abbildung 5 ist das SDS Gel mit den beiden 50  $\mu\text{L}$  Slurry-Proben abgebildet. Hier scheint die Kontaktzeit, im Gegensatz zu den 250  $\mu\text{L}$  Proben, wie man an den berechneten Produktkonzentrationen in den Elutionsfraktionen erkennen kann, eine Rolle zu spielen. Nach 10 min Kontaktzeit ist die Konzentration deutlich höher, was auf das geringere Verhältnis von Resin zu Produkt als bei Probe 1 und 2 zurückzuführen ist. Durch die angesprochene geringere Resinkonzentration ist es unwahrscheinlicher, dass funktionelle Gruppen des Resins auf Produkt in dem Probenansatz treffen. Auch hier liegen die beiden Werte zwar wieder außerhalb des kalibrierten Bereiches. Trotzdem ist die gemessene Konzentration bei Probe 4,

also der 10-minütigen Kontaktzeit, mehr als doppelt so groß wie die bei 2-minütiger Kontaktzeit, was zumindest als qualitativer Hinweis ernst zu nehmen ist.

Außerdem wird deutlich, dass die Gele untereinander nur qualitativ zu vergleichen sind. Trotz standardisierten Vorgehens bei der Bearbeitung der Gele kommt es zu gewissen Schwankungen was die Intensität der Färbung der Proteine, des Hintergrundes und die Ausleuchtung betrifft. Obwohl teils identische Proben auf verschiedenen Gelen aufgetragen wurden, können sich solche Schwankungen, in der später berechneten Produktkonzentration äußern. Auf Abbildung 5 liegt die berechnete Konzentration der Probe „Load (unbearbeitet)“ bei 25,2 µg/ml, hingegen auf Abbildung 6 bei 33 µg/ml.

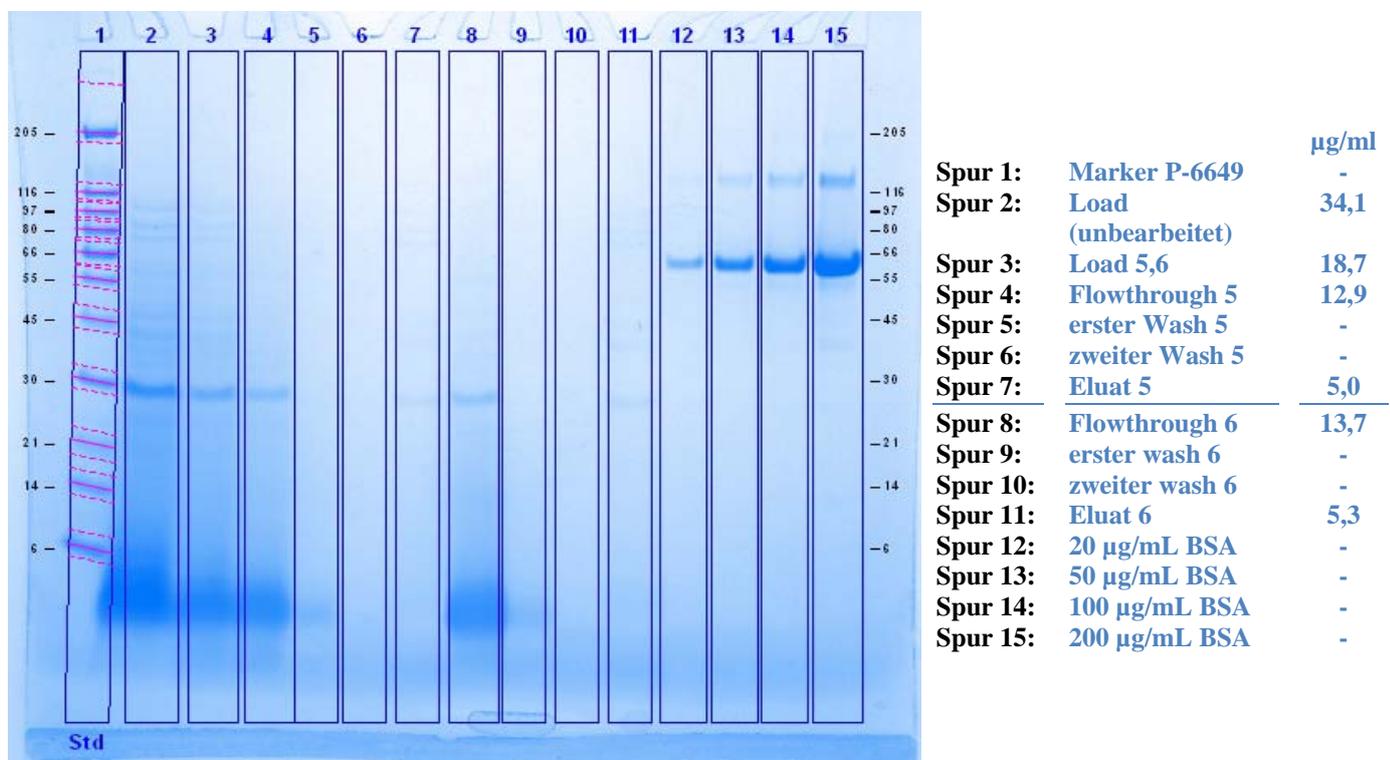
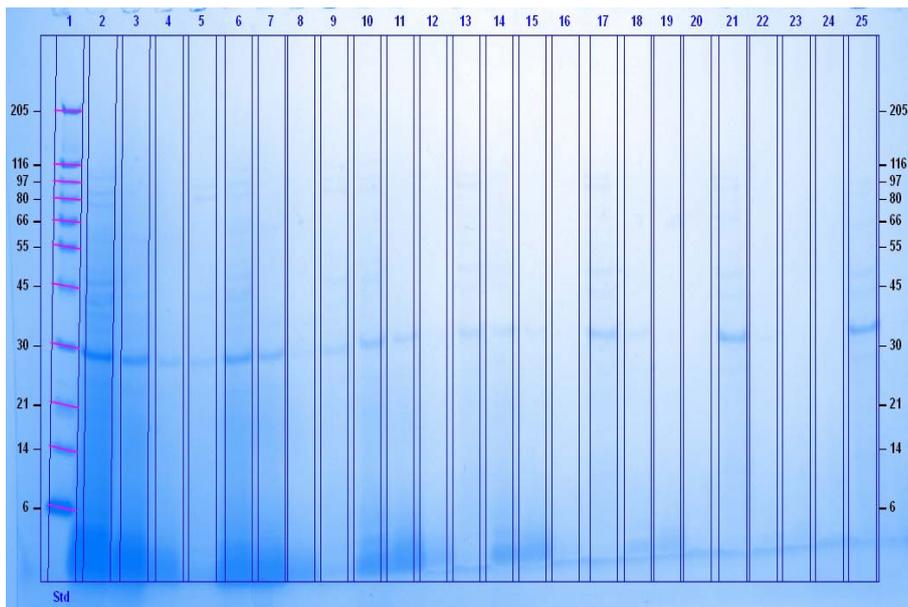


Abbildung 6: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; 250 µL Slurry, Load 1:2 verdünnt; Batch Versuche; Vergleich bei 2- und 10-min Kontaktzeit

Die Abbildung 6 zeigt die 2 Proben mit 250 µL Slurry und dem 1:2 verdünnten Auftrag. Es sind im Gegensatz zu dem unverdünnten Auftrag keine Unterschiede festzustellen. Die Kontaktzeit scheint unter diesen Versuchsbedingungen auch keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Zielproteins zu haben.

Um das Bindungsverhalten mit höheren Verdünnungsstufen zu untersuchen, wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Dafür wird die Probe 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 und 1:32 mit AX-Puffer-A1 verdünnt. Die Ansätze werden jeweils mit NaOH auf einen pH-Wert von 9 gestellt.

Es wurde pro Probenansatz 1 mL Slurry verwendet. Abbildung 7 zeigt das SDS Gel mit den Ergebnissen der Versuchsreihe. Da das Verhältnis von Resin zu Probelösung mit höherer Verdünnungsstufe immer kleiner wird, beträgt die hier gewählte Kontaktzeit 30 min um sicherzustellen, dass auch bei einer hohen Verdünnungsstufe die Kapazität des Resins voll ausgenutzt wird.



<b>Spur 1:</b>	<b>Marker P-6649</b>
<b>Spur 2:</b>	<b>Load unverdünnt</b>
<b>Spur 3:</b>	<b>Flowthrough unverdünnt</b>
<b>Spur 4:</b>	<b>Wash unverdünnt</b>
<b>Spur 5:</b>	<b>Elute unverdünnt</b>
<b>Spur 6:</b>	<b>Load 1:2</b>
<b>Spur 7:</b>	<b>Flowthrough 1:2</b>
<b>Spur 8:</b>	<b>Wash 1:2</b>
<b>Spur 9:</b>	<b>Elute 1:2</b>
<b>Spur 10:</b>	<b>Load 1:4</b>
<b>Spur 11:</b>	<b>Flowthrough 1:4</b>
<b>Spur 12:</b>	<b>Wash 1:4</b>
<b>Spur 13:</b>	<b>Elute 1:4</b>
<b>Spur 14:</b>	<b>Load 1:8</b>
<b>Spur 15:</b>	<b>Flowthrough 1:8</b>
<b>Spur 16:</b>	<b>Wash 1:8</b>
<b>Spur 17:</b>	<b>Elute 1:8</b>
<b>Spur 18:</b>	<b>Load 1:16</b>
<b>Spur 19:</b>	<b>Flowthrough 1:16</b>
<b>Spur 20:</b>	<b>Wash 1:16</b>
<b>Spur 21:</b>	<b>Elute 1:16</b>
<b>Spur 22:</b>	<b>Load 1:32</b>
<b>Spur 23:</b>	<b>Flowthrough 1:32</b>
<b>Spur 24:</b>	<b>Wash 1:32</b>
<b>Spur 25:</b>	<b>Elute 1:32</b>

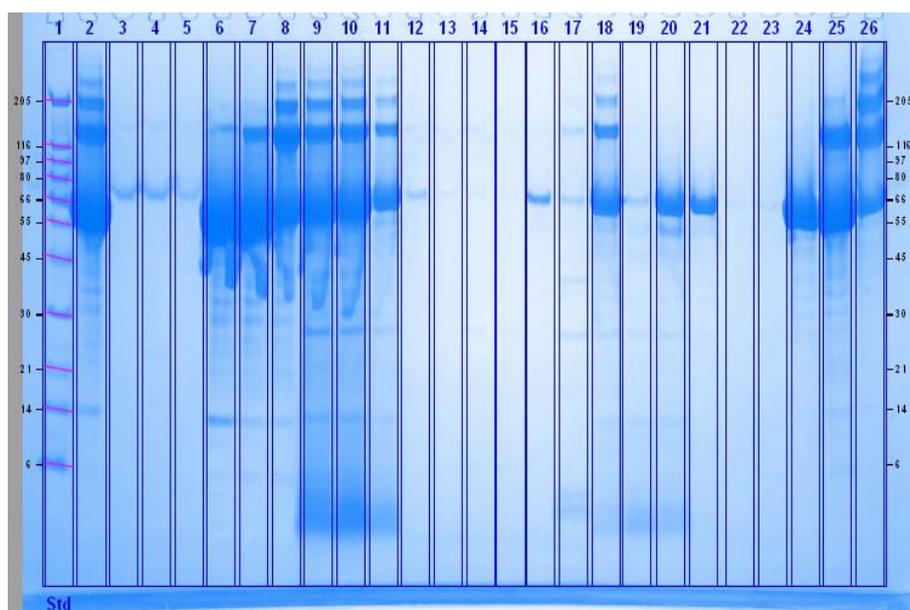
Abbildung 7: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Verdünnungsreihe der Probe; Batch Versuche

Je höher die Verdünnungsstufe ist, desto größer ist die Produktbande im Eluat und desto geringer sind die Produktbanden in den Wasch- und Durchlauffractionen. Vergleicht man auf Abbildung 7 die Spur 5, also die Elutionsfraktion der unverdünnten Probe, mit Spur 25, der Elutionsfraktion der 1:32 verdünnten Probe, so erkennt man eine deutlich prominentere Produktbande auf Spur 25. Eine hohe Verdünnungsstufe der Probe hat also einen positiven Einfluss auf das Bindungsverhalten des Zielproteins. Der AX-Puffer-A1 besitzt eine Leitfähigkeit von kleiner 1 mS. Die unverdünnte Probe weist eine Leitfähigkeit von 29,2 mS auf. Durch stärkere Verdünnungen mit AX-Puffer-A1 wird die Ionenstärke der Probelösung immer weiter gesenkt. Durch eine geringe Ionenstärke der Probe resultieren bessere Bedingungen für einen Ionenaustausch des Zielproteins. Die gewonnenen Ergebnisse sind wichtige Hinweise. Alle weiteren Versuche werden mit einer 1:30 Verdünnung der Probe

durchgeführt. Außerdem kann sich eine lange Kontaktzeit, wegen der daraus resultierenden höheren Bindungswahrscheinlichkeit, positiv auf Bindungsverhalten auswirken.

## 5.5 AX Capture: Einfluss der Probenmatrix auf das Bindungsverhalten von BSA via Chromatographieanlage

Das Bindungsverhalten des Produktes an das Resin kann auch durch die Probenmatrix negativ beeinflusst werden. Um dieser Vermutung nachzugehen, wird das Bindungsverhalten von BSA in AX-Puffer-A1 mit dem von BSA in der Probenmatrix verglichen. Dazu werden 15 mg BSA in 15 mL AX-Puffer-A1 und in 15 mL der Probenmatrix gelöst. Die Probenmatrix ist auf pH 9 gestellt, also entsprechend dem pH Wert von AX-Puffer-A1. Die Abbildung 8 zeigt von Spur 2 - 8 den Lauf B000 A2 AX04 R001, in dem BSA in AX-Puffer-A1 gelöst ist. Von Spur 9 - 17 ist der Lauf B000 A1 AX04 R002 zu sehen. Hier wurde das BSA in der Probenmatrix gelöst. Von Spur 18 - 26 sind die Fraktionen des Laufes B000 A1 AX04 R003 aufgetragen. Bei diesem Lauf wird BSA wieder in der Probenmatrixgelöst und zusätzlich 1:4 mit AX-Puffer-A1 verdünnt. Für die 3 Läufe ist die *Fractogel EMD TMAE Hicap (M)*-Säule verwendet. Die Methoden der Läufe sind im Anhang IV.a beschrieben. Die Chromatogramme der Läufe befinden sich im Anhang IV.c.



<b>Spur 1:</b>	<b>Marker P-6649</b>
<b>Spur 2:</b>	<b>B000 A2 AX04 R001; Load</b>
<b>Spur 3:</b>	<b>Flowthrough A1</b>
<b>Spur 4:</b>	<b>Wash B11</b>
<b>Spur 5:</b>	<b>Wash B7</b>
<b>Spur 6:</b>	<b>Elute C5</b>
<b>Spur 7:</b>	<b>Elute C6</b>
<b>Spur 8:</b>	<b>Elute C7</b>
<b>Spur 9:</b>	<b>B000 A1 AX04 R002; Load</b>
<b>Spur 10:</b>	<b>Flowthrough 2</b>
<b>Spur 11:</b>	<b>Wash 5</b>
<b>Spur 12:</b>	<b>Wash 7</b>
<b>Spur 13:</b>	<b>Elute 14</b>
<b>Spur 14:</b>	<b>Elute 15</b>
<b>Spur 15:</b>	<b>Elute 16</b>
<b>Spur 16:</b>	<b>Elute 17</b>
<b>Spur 17:</b>	<b>Elute 20</b>
<b>Spur 18:</b>	<b>B000 A1 AX04 R003; Load</b>
<b>Spur 19:</b>	<b>Flowthrough 4</b>
<b>Spur 20:</b>	<b>Flowthrough 5</b>
<b>Spur 21:</b>	<b>Wash 7</b>
<b>Spur 22:</b>	<b>Wash 10</b>
<b>Spur 23:</b>	<b>Elute 16</b>
<b>Spur 24:</b>	<b>Elute 17</b>
<b>Spur 25:</b>	<b>Elute 19</b>
<b>Spur 26:</b>	<b>Elute 21</b>

Abbildung 8: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Matrixeffekte; B000 AX04 R001-R003; Vergleich von BSA in AX-Puffer-A1, BSA in Probenmatrix und BSA in Probenmatrix 1:4 mit AX-Puffer-A1 verdünnt

Auf Spur 6 - 8 der Abbildung 8 sind Elutionsfraktionen von B000 A2 AX04 R001 zu sehen. Im Vergleich zu den anderen Elutionsfraktionen ist hier ein deutlich größerer Anteil von BSA, bei ca. 66,5 kDA zu erkennen. Beim Lauf B000 A1 AX04 R002 ist ein großer BSA-Anteil im Durchlauf auf Spur 10 wiederzufinden; im Gegensatz zu B000 A2 AX04 R001 auf Spur 3. Das zeigt deutlich, dass die Probenmatrix einen negativen Einfluss auf das Bindungsverhalten von BSA an *Fractogel EMD TMAE (M)* hat. Die 1:4 Verdünnung mit AX-Puffer-A1 von dem Lauf B000 A1 AX04 R003 zeigt wie schon zuvor gesehen, im Kapitel 5.4 einen positiven Einfluss. Auf Spur 23 - 26 ist zu sehen, dass im Vergleich zu Spur 13 - 17 ein größerer Anteil BSA an die Säule bindet und wieder eluiert.

Das Ergebnis lässt vermuten, dass die Probenmatrix auch das Bindungsverhalten des Zielproteins negativ beeinflusst. Ein möglicher Grund für die schwächere Bindung in dem Fermentationsüberstand, ist die Leitfähigkeit von 29,2 mS. Außerdem weist das Fermentationsmedium eine  $K_2HPO_4$ -Konzentration von 8,65 g/L und eine  $KH_2PO_4$ -Konzentration von 6,85 auf (Tabelle 6). Die dadurch hohe Konzentration an kosmotropen  $PO_4^{3-}$ -Anionen kann zur Komplexbildung von Proteinen führen (CACACE et al., 1997), was für einen Ionenaustausch ungünstige Bedingungen schaffen kann.

Zu diesen Läufen muss angemerkt werden dass B000 A2 AX04 R001 nicht an derselben Chromatographieanlage wie B000 A1 AX04 R002\_R003 durchgeführt wurden. Die Anlage A2 besitzt eine kleinere Mischkammer und kleinere Schlauchdurchmesser als die Anlage A1. Die unterschiedliche Anlagenauslegung allein kann allerdings nicht der Grund für die divergenten Ergebnisse der einzelnen Läufe sein.

## 5.6 AX Capture: pH Scouting via Chromatographieanlage

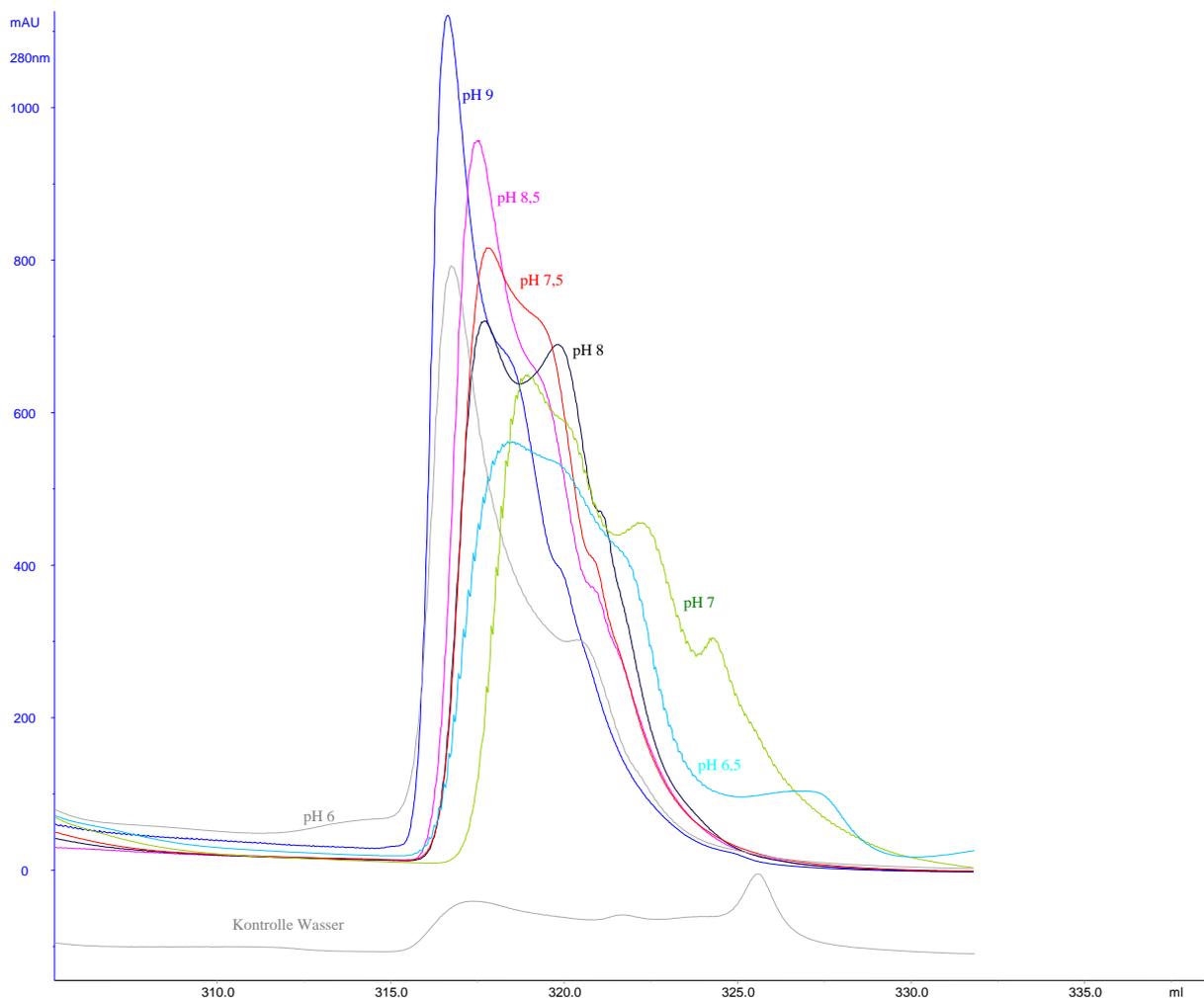
Als nächster logischer Schritt soll der optimale pH-Wert für den Capture-Schritt ermittelt werden. Zu diesem Zweck wird ein pH-Scouting durchgeführt. Dafür ist die Scoutingfunktion von *UNICORN 5.11* verwendet. Außerdem ist die BufferPrep-Funktion verwendet, für die lediglich ein 0,07 M BIS-TRIS-Puffer, ein 0,05 M TRIS-Puffer, eine 0,1 M HCl-Lösung, eine 2 M NaCl-Lösung und Wasser an das Pumpensystem der *Äkta Explorer* angeschlossen werden muss. Die vorher geschriebene BufferPrep-Funktion sorgt für die korrekte pH-Einstellung der einzelnen Läufe. Es wird ein pH-Bereich von 6 - 9, in 0,5-er Schritten, beginnend bei pH 6 untersucht. Für die Scouting-Läufe wird die 1 mL *Fractogel EMD TMAE Hicap (M)*-Säule verwendet. Die Probe ist, wegen der Erkenntnisse aus Kapitel 5.4, 1:30 mit

AX-Puffer-A1 verdünnt. Das Probenvolumen der verdünnten Ansätze liegt bei 300 mL. Der pH-Wert der Probe liegt wegen der starken Verdünnung mit AX-Puffer-A1 bei dem des Puffers, also bei einem pH-Wert von 9.

**Tabelle 13: Laufnomenklatur; pH-Scouting**

Lauf	pH-Wert	Load
B000 A2 S001 L001	6,0	Probe 1:30 mit AX-Puffer-A1
B000 A2 S001 L002	6,5	Probe 1:30 mit AX-Puffer-A1
B000 A2 S001 L003	7,0	Probe 1:30 mit AX-Puffer-A1
B000 A2 S001 L004	7,5	Probe 1:30 mit AX-Puffer-A1
B000 A2 S001 L005	8,0	Probe 1:30 mit AX-Puffer-A1
B000 A2 S001 L006	8,5	Probe 1:30 mit AX-Puffer-A1
B000 A2 S001 L007	9,0	Probe 1:30 mit AX-Puffer-A1
B000 A2 S001 L008	6,0	Wasser

Tabelle 13 zeigt die eingestellten pH-Werte der verschiedenen Scouting-Läufe.



**Abbildung 9: Elutionspeaks; pH-Scouting; B000 A2 S001 L001-L008; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL**

Abbildung 9 zeigt die UV Absorption der pH-Scouting-Läufe bei 280nm während der Elution. Da der pI-Wert des Zielproteins bei ca. 6,9 liegt hat bei den Läufen mit pH 6 und 6,5, wie zu erwarten war, kein Produkt an die Säule gebunden. Ab einem pH-Wert von 7 findet im Zuge der negativen Nettoladung des Zielproteins eine Bindung statt. Auf Abbildung 9 lässt sich die Tendenz erkennen. Je höher der pH-Wert desto spitzer wird der Elutionspeak. Im Umkehrzug bedeutet das, dass die Auflösung mit niedrigem pH-Wert steigt. Bei pH 7 lassen sich sogar noch 3 einzelne Peaks bei 318 mL, 322,5 mL und bei 325 mL erkennen. In dem letzten der 3 Peaks, bei ca. 325 mL auf der X-Achse, findet sich das Produkt wieder. Der Sachverhalt lässt sich dadurch erklären, dass bindende Proteine bei pH 7 eine weniger große negative Nettoladung besitzen als z.B. bei pH 9. Außerdem sind die Proteine bei einem pH-Wert von 9 alle relativ stark negativ geladen, was dazu führt, dass sie auch alle bei einer ähnlichen Konzentration von Cl<sup>-</sup>-Ionen von der Säule gedrängt werden und eluieren. Die Unterschiede in der Stärke der negativen Ladung bei pH 7 sind also größer als bei pH 9. Dies führt also zu einer differenzierteren Elution, also letztendlich zu einer höheren Auflösung.

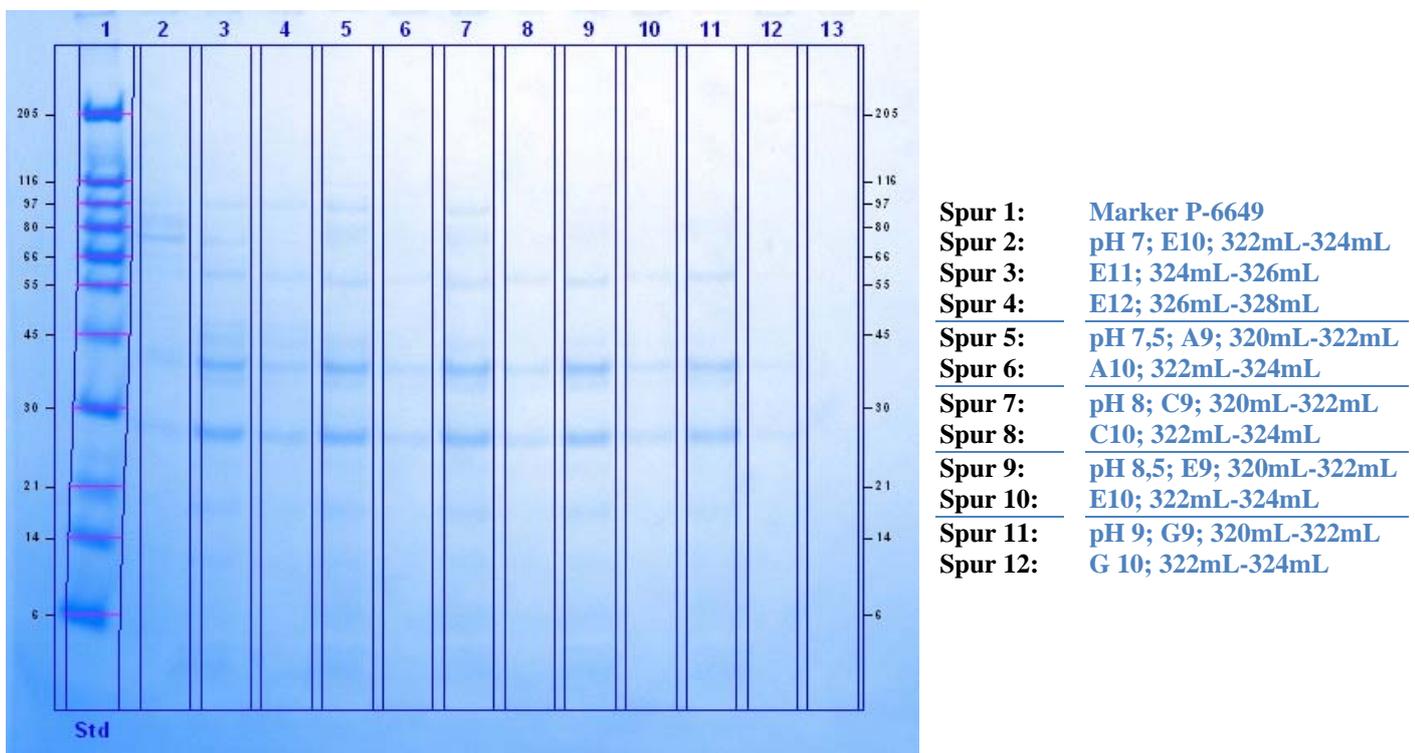


Abbildung 10: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; pH-Scouting; B000 A2 S001 L003-L007

Die Abbildung 10 zeigt die Elutionsfraktionen der Läufe, bei denen erfolgreich Produkt an die Säule gebunden und wieder eluiert ist. Die Gele im Anhang IV.d zeigen die kompletten

Ergebnisse der einzelnen Läufe. Die dazugehörigen Chromatogramme mit der Darstellung der Fraktionen befinden sich im Anhang IV.d. Es scheint als wäre die Produktbande bei niedrigen pH-Werten prominenter als bei hohen pH-Werten. Es haben bei niedrigen pH-Werten zwar auch mehr andere Proteine an die Säule gebunden, was aber bei der Steigerung der Produktausbeute im Capture-Schritt nur eine untergeordnete Relevanz hat. Dies ist eine untypische Beobachtung, da man bei der Verwendung eines Anionenaustauschers mit hohen pH-Werten der Probe bzw. der Säule davon ausgehen muss, dass das Zielprotein stärker negativ ionisiert wird als bei niedrigen pH-Werten. Damit sollte also bei hohen pH-Werten theoretisch eine stärkere Bindung an das Anionenaustauscheradsorbens stattfinden, was auch zu prominenteren Produktbanden in den Elutionsfraktionen führen sollte. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass das Chromatographiemedium zwischen den Läufen, aufgrund der verwendeten Scoutingmethode, nicht gereinigt werden und damit auch nicht regenerieren kann. Obwohl der optimale Arbeits-pH-Wert des Zielproteins bei 8 liegt, hat die höhere Produktausbeute und die oben angesprochene bessere Auflösung bei einem pH-Wert 7 von zu der Entscheidung geführt von nun an die Läufe bei einem pH-Wert von 7 durchzuführen.

Die programmierte Scoutingmethode ist nicht optimal. Denn an den pH-Kurven in den Chromatogrammen im Anhang IV.d ist zu erkennen, dass es fragwürdig ist ob die eingestellten pH-Werte bei den einzelnen Läufen auch auf der Säule erreicht werden. Es wäre ein größeres Waschvolumen nach dem Laden der Probe notwendig gewesen um der Säule genügend Puffer zu liefern, damit sich diese komplett equilibrieren kann. Zudem ist es sinnvoller die pH-Werte der Proben auf den jeweiligen zu untersuchenden pH-Wert einzustellen, um sicherzugehen dass die Anbindung bei den gewünschten pH-Werten stattfindet. Insbesondere bei einem so großen Probenvolumen von 300 mL und bei der Verwendung einer 1 mL Säule, ist eine pH-Einstellung der Probe notwendig.

## 5.7 AX Capture: Resin Scouting via Chromatographieanlage

Nachdem ein geeigneter pH-Wert ermittelt ist, wird ein Resin-Scouting durchgeführt. Das Resin-Scouting wird genutzt um ein, für diese Capture-Anforderungen, opportunes Adsorbens zu ermitteln. Dabei wird darauf geachtet, dass möglichst viele Resins von verschiedenen Herstellern verglichen werden um eine große Produktvielfalt zu gewährleisten. Außerdem kann ein *AX-Resin scouting Kit* mit vier verschiedenen AX-Resins genutzt werden, welches von der Firma *Tosoh* zur Verfügung gestellt wurde. Für das Scouting werden die AX-Puffer-

A3 und AX-Puffer-B3, also mit einem pH-Wert von 7, verwendet. Die Probe ist 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt. Die für das Resin-Scouting verwendeten Säulen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 14: Laufnomenklatur; Resin-Scouting**

Lauf	Säule
B000 A2 S002 L001	Fractogel EMD TMAE Hicap (M)
B000 A2 S002 L002	Q Sepharose XL
B000 A2 S002 L003	UNOsphere Q
B000 A2 S002 L004	POROS 50 HQ
B000 A2 S002 L005	DEAE Sepharose FF
B000 A2 S002 L006	Toyopearl Super Q 650M
B000 A2 S002 L007	Fractogel EMD TMAE Hicap (M)
<b>B000 A2 S003 L005</b>	<b>DEAE Sepharose FF</b>
<b>B000 A2 S003 L006</b>	<b>Toyopearl Super Q 650M</b>
<b>B000 A2 S003 L007</b>	<b>Fractogel EMD TMAE Hicap (M)</b>
B000 A2 S004 L001	Toyopearl DEAE 650 M
B000 A2 S004 L002	Toyopearl Gigacap Q 650 M
B000 A2 S005 L001	Toyopearl QAE 550C
B000 A2 S005 L002	Toyopearl Q 600C AR

Tabelle 14 zeigt die verwendeten Säulen bei den jeweiligen Läufen.

Da bei den Scouting-Läufen B000 A2 S002 ab dem Lauf B000 A2 S002 L006 die Probe, also der verdünnte Load, sichtbar koaguliert ist, werden die Läufe B000 A2 S002 L005 - L007 mit neu angesetztem Load wiederholt. Die wiederholten Läufe B000 A2 S003 L005 - L007 sind in Tabelle 14 markiert. Da das *AX-Screening Kit* von *Tosoh* erst einige Tage später eingetroffen ist, werden weitere Scouting-Läufe B000 A2 S004 L001 - L002 und B000 A2 S005 L001 - L002 mit den *Tosoh*-Säulen durchgeführt. Diesmal werden mit einem Probenansatz nur jeweils 2 Säulen verglichen um die Fällung der Probelösung und die damit einhergehenden veränderten Bedingungen und Risiken für die Chromatographieanlage zu vermeiden.

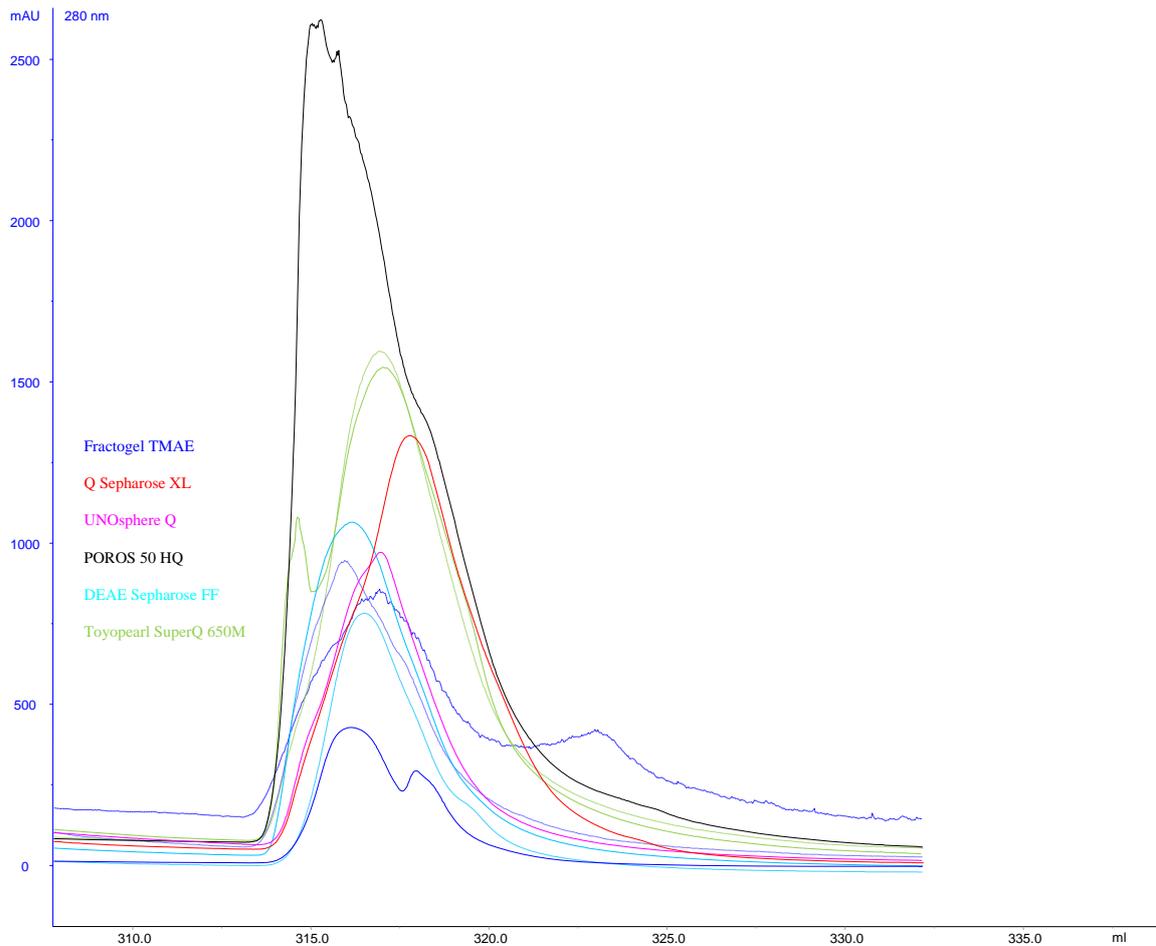
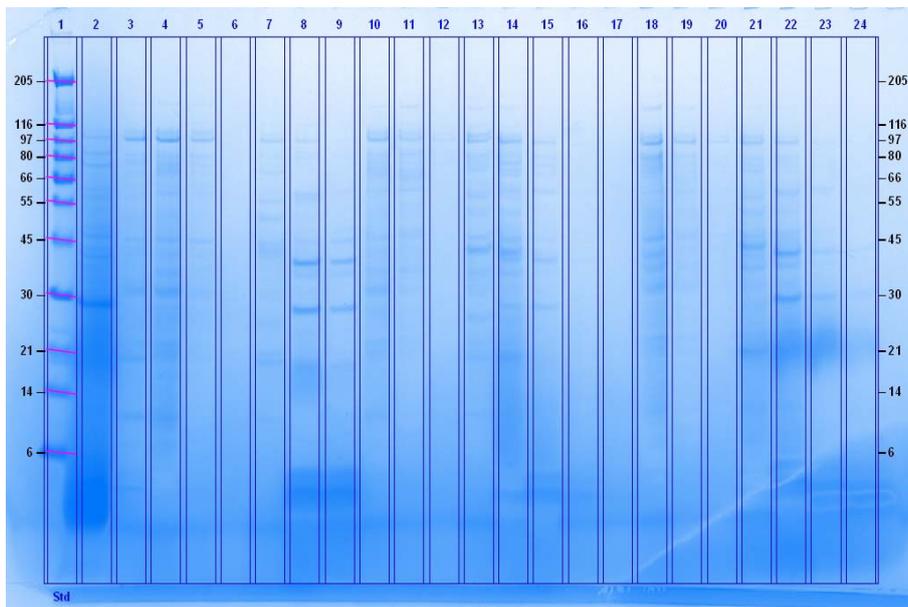


Abbildung 11: Elutionspeaks; Resin-Scouting; B000 A2 S002 S003; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; h=1,96cm d=0,82cm V=1mL

Abbildung 11 zeigt die UV-Absorption bei 280nm der Läufe B000 A2 S002 und B000 A2 S003 während der Salzgradientenelution. Die durchgezogenen Linien sind dabei die B000 A2 S002-Läufe und die gestrichelten sind die B000 A2 S003-Läufe mit frischem Probenansatz. Die gepunktete blaue Linie ist der Lauf B000 A2 S002 L007, also der zweite Lauf mit der *Fractogel EMD TMAE Hicap (M)*-Säule während der B000 A2 S002-Serie. Vergleicht man diese UV-Absorptionslinie mit der von B000 A2 S002 L001, also der durchgezogenen blauen Linie, so sieht man einen deutlichen Unterschied. Dieser lässt sich durch die angesprochene Veränderung der Probe über die Zeit erklären und bekräftigt die Entscheidung die Läufe B000 A2 S002 L005-L007 mit neu angesetztem Load zu wiederholen.

Wie man anhand des nachfolgenden Gels und der Gele im Anhang IV.e gut erkennen kann, hat die Fläche der Peaks scheinbar keinen proportionalen Bezug zur eluierten Menge des Zielproteins von der Säule. Die Entscheidung zu Gunsten eines bestimmten Resins hängt also größtenteils von der Auswertung mittels SDS-PAGE ab.



- Spur 1:** Marker P-6649  
**Spur 2:** Load unverdünnt  
**Spur 3:** Load verdünnt  
**Spur 4:** B000 A2 S002 L001, FT  
**Spur 5:** Wash A1; 301mL-305mL  
**Spur 6:** Elute A4; 313mL-315mL  
**Spur 7:** Elute A5; 315mL-317mL  
**Spur 8:** Elute A6; 317mL-319mL  
**Spur 9:** Elute A7; 319mL-321mL  
**Spur 10:** B000 A2 S002 L002, FT  
**Spur 11:** Wash B1; 301mL-305mL  
**Spur 12:** Elute B4; 313mL-315mL  
**Spur 13:** Elute B5; 315mL-317mL  
**Spur 14:** Elute B6; 317mL-319mL  
**Spur 15:** Elute B7; 319mL-321mL  
**Spur 16:** Elute B8; 321mL-323mL  
**Spur 17:** Elute B9; 323mL-325mL  
**Spur 18:** B000 A2 S002 L003, FT  
**Spur 19:** Wash C1; 301mL-305mL  
**Spur 20:** Elute C4; 313mL-315mL  
**Spur 21:** Elute C5; 315mL-317mL  
**Spur 22:** Elute C6; 317mL-319mL  
**Spur 23:** Elute C7; 319mL-321mL  
**Spur 24:** Elute C8; 321mL-323mL

Abbildung 12: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S002 L001-L003; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); Q Sepharose XI; UNOsphere Q

Da die Läufe B000 A2 S002 L005 - L007 wie oben erwähnt wiederholt werden, sollen hier zunächst nur die Läufe B000 A2 S002 L001 - L004 betrachtet werden. Die von diesen Läufen am deutlichsten zu erkennenden Produktbanden, weist der Lauf B000 A2 S002 L001 in den Elutionsfraktionen A6 und A7, also auf Spur 8 und 9 auf, also der Lauf mit der *Fractogel TMAE Hicap (M)*-Säule. Abbildung 12 zeigt die Fraktionen des Laufes. Wie man an den Gelen im Anhang IV.e sehen kann weisen sowohl die ersten Scoutingläufe S002 L005 - L006 mit der *DEAE Sepharose FF* und der *Toyopearl Super Q 650M*, als auch die S003 Läufe keine prominenteren Elutionsbanden als die *Fractogel EMD TMAE (M)*-Säule auf.

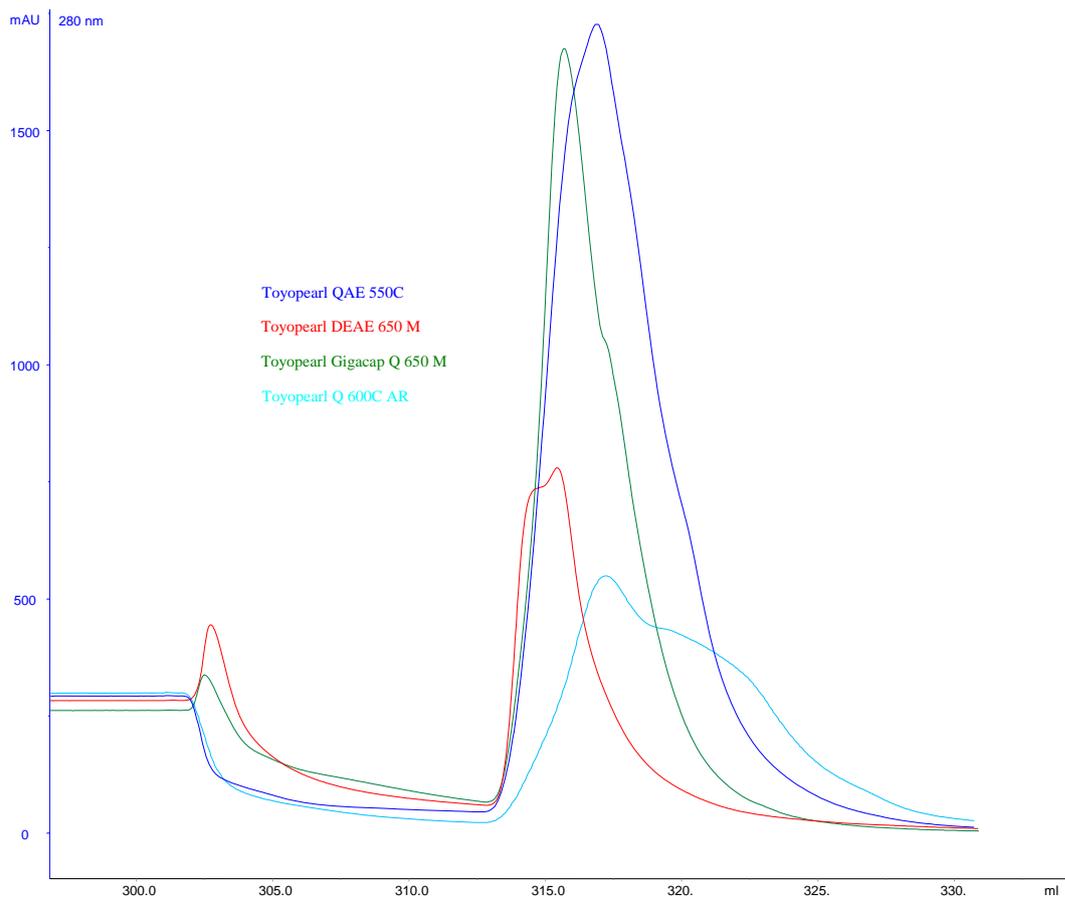


Abbildung 13: Elutionspeaks; Resin-Scouting; B000 A2 S004-S005; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; h=3,00cm d=0,64cm V=1mL

Abbildung 13 zeigt die UV-Absorption bei 280nm der Läufe S004 und S005 während der Gradientenelution. Diese sind aufgrund der Übersichtlichkeit in einem eigenen Diagramm dargestellt.

Die nachfolgenden Gele Abbildung 14 und Abbildung 50 im Anhang IV.e zeigen die Läufe mit den Adsorbentien von *TOSO*H (*Toyopearl DEAE 650 M*, *Toyopearl Gigacap Q 650 M*, *Toyopearl QAE 550C* und *Toyopearl Q 600C AR*).



<b>Spur 1:</b>	<b>Marker P-6649</b>
<b>Spur 2:</b>	<b>Load unverdünnt</b>
<b>Spur 3:</b>	<b>Load verdünnt</b>
<b>Spur 4:</b>	<b>B000 A2 S004 L001, FT</b>
<b>Spur 5:</b>	<b>Wash A1; 301mL-305mL</b>
<b>Spur 6:</b>	<b>Elute A4; 312mL-314mL</b>
<b>Spur 7:</b>	<b>Elute A5; 314mL-316mL</b>
<b>Spur 8:</b>	<b>Elute A6; 316mL-318mL</b>
<b>Spur 9:</b>	<b>Elute A7; 318mL-320mL</b>
<b>Spur 10:</b>	<b>B000 A2 S004 L002, FT</b>
<b>Spur 11:</b>	<b>Wash B1; 301mL-305mL</b>
<b>Spur 12:</b>	<b>Elute B4; 312mL-314mL</b>
<b>Spur 13:</b>	<b>Elute B5; 314mL-316mL</b>
<b>Spur 14:</b>	<b>Elute B6; 316mL-318mL</b>
<b>Spur 15:</b>	<b>Elute B7; 318mL-320mL</b>

Abbildung 14: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S004 L001-L002; Toyopearl DEAE 650 M, Toyopearl Gigacap Q 650 M

Die deutlichsten Produktelutionsbanden der B000 A2 S004 - S005 Läufe auf Abbildung 14 und Abbildung 50 im Kapitel IV.e, weist das Resin *Toyopearl DEAE 650 M*, auf Spur 7 und 8 in Abbildung 14 auf. Die beiden Resins mit der stärksten Anbindung an das Zielprotein sind also das *Fractogel EMD TMAE (M)* und *Toyopearl DEAE 650 M*. Es ist schwer zu sagen warum sich genau die beiden Resins, für diesen Capture-Schritt am geeignetsten erweisen. Wenn man nach Gemeinsamkeiten der beiden Adsorbentien sucht, so ist nur die Porengrößenverteilung von 40 - 90  $\mu\text{m}$  identisch. Es ist allerdings nicht davon auszugehen, dass dies ein entscheidender Parameter war, da auch eine ganze Reihe anderer verwendeter Anionenaustauscher diese Porengrößenverteilung aufweisen. Alle Anionenaustauscher mit funktionellen Q- und QAE-Gruppen, haben im Gegensatz zu den beiden Resins nur eine schwächere Produkthanbindung aufweisen können. Scheinbar sind die starken Anionenaustauschergruppen Q und QAE weniger gut für diesen Capture-Schritt geeignet. Das *Toyopearl DEAE 650 M*-Resin ist eins von nur zwei verglichenen schwachen Anionenaustauschern und bringt zusammen mit dem *Fractogel EMD TMAE (M)*-Resin die stärkste Produkthanbindung und damit das beste Ergebnis hervor. Diese Beobachtung ist auch eher ungewöhnlich, da davon auszugehen ist, dass starke Anionenaustauscher prinzipiell ebenso starke bzw. sogar stärkere Bindungen an das Produkt zeigen sollten. Die Verwendung

von schwachen Anionenaustauschern kommt eher dann zum Einsatz, wenn die erzielte Selektivität der starken Ionenaustauscher den gestellten Anforderungen nicht genügt. Auch auffällig ist, dass die Peakflächen der beiden Resins *Fractogel EMD TMAE (M)* und *Toyopearl DEAE 650 M* im Vergleich zu den meisten anderen eher klein sind. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass weniger unerwünschte Nebenprodukte an die Säule binden. Aufgrund der hohen chemischen Stabilität des *Toyopearl DEAE 650 M*-Resins und den daraus resultierenden vielfältigeren Reinigungsmöglichkeiten (TOSOH, „Ion Exchange Chromatographie“), fällt die Entscheidung zu Gunsten dieses Adsorbens aus.

## 5.8 AX Capture: Variation der Flussrate via Chromatographieanlage

Nach den Erkenntnissen des Resin Scoutings soll noch der Einfluss der Flussrate ermittelt werden. Eine geringere Flussrate führt zu einer längeren Kontaktzeit auf der Säule. Eine lange Kontaktzeit hat wie bereits im Kapitel 5.4 beschrieben, gerade bei einem kleinen Verhältnis von Resin zu Produkt, einen positiven Einfluss auf die Anbindung des Zielproteins an das Adsorbens. Um dieses Ergebnis nicht nur im Batch, sondern auch mittels Chromatographie und mit dem Resin *Toyopearl DEAE 650 M* zu validieren, wird der Einfluss der Flussrate untersucht. Für diese Läufe wird die 1 mL *Toyopearl DEAE 650 M*-Säule verwendet. Die Probe ist 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt. In dem Lauf B000 AX06 R001 wird mit einer Flussrate von 1,5 mL/min gepumpt, was bei gegebenen Säulendimensionen einer Flussrate von 270 cm/h entspricht. In dem Lauf B000 A4 AX06 R002 wird mit 0,3 mL/min gepumpt, was einer Flussrate von 54 cm/h entspricht. Die Abbildung 15 zeigt die einzelnen Fraktionen der beiden Läufe.

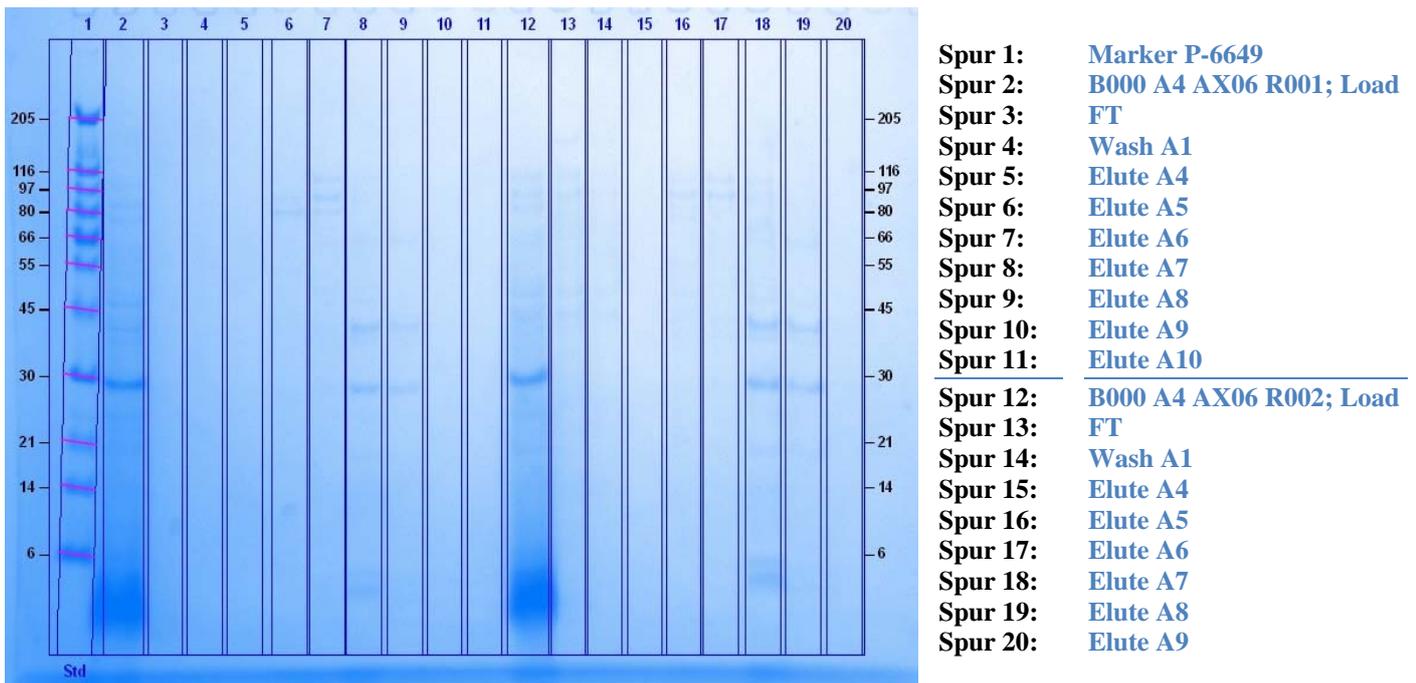


Abbildung 15: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Gegenüberstellung geringer und hoher Flussrate; B000 A4 AX06 R001-R002

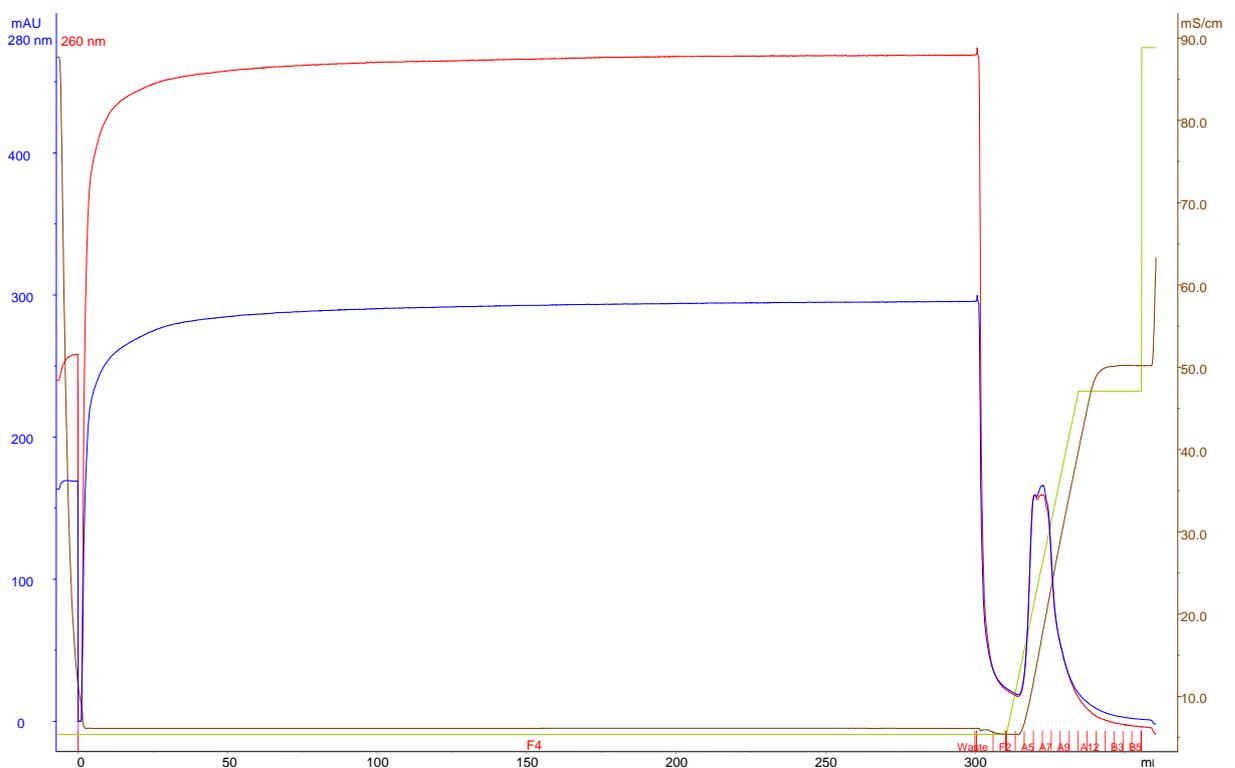
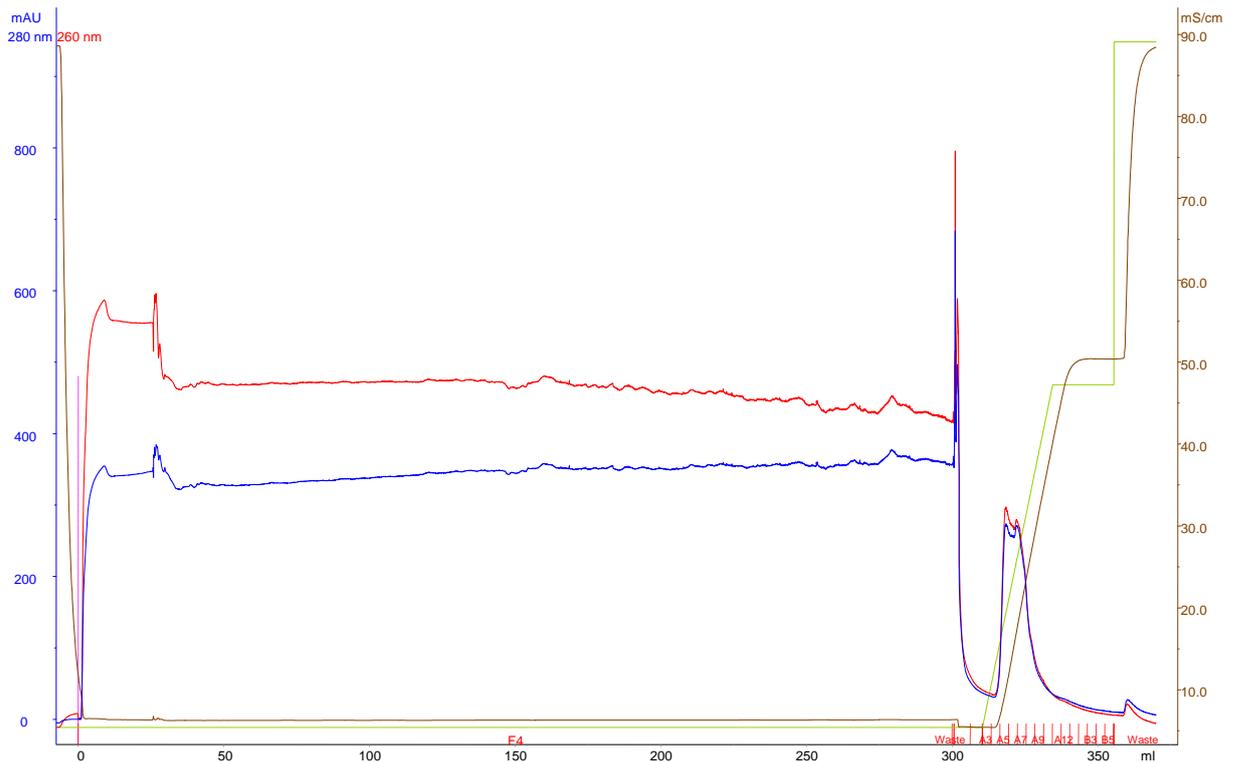


Abbildung 16: Chromatogramm; Flussrate; B000 A4 AX06 R001; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-50%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 1,5 mL/min; Injektionsflussrate 1,5 mL/min; Toyopearl DEAE 650 M; h=3,00 cm d=0,64cm V=1mL



**Abbildung 17: Chromatogramm; Flussrate; B000 A4 AX06 R002; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-50%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,3 mL/min; Injektionsflussrate 0,3 mL/min; Toyopearl DEAE 650 M; h=3,00 cm d=0,64cm V=1mL**

Auf der Abbildung 15 kann man leicht deutlichere Produktbanden bei B000 A4 AX06 R002 ausmachen. Dies spricht für einen positiven Einfluss der langsamen Flussrate. Betrachtet man die beiden Chromatogramme Abbildung 16 und Abbildung 17 so zeigt sich, dass der Elutionspeak des Laufes B000 A4 AX06 R002, bei ca. 320 mL, um einiges größer ist, als der von B000 A4 AX06 R001. Dies bestätigt die Beobachtung auf dem Gel und untermauert die Erkenntnis des positiven Einflusses der längeren Kontaktzeit auf das Bindungsverhalten des Zielproteins an das Adsorbens aus Kapitel 5.4.

Allerdings wird auch deutlich, dass die Elutionsbanden viel schwächer ausfallen, als bei Erstbenutzung der Säule während des Resin Scoutings auf der Abbildung 13. Außerdem besitzt der Elutionspeak der Abbildung 14 eine kleinere Peakbreite und ist höher als die hier beobachteten Elutionspeaks des Zielproteins. Bei der Erstverwendung der Säule wurde die Anlage A2 und nicht die hier verwendete A4 genutzt. Die kleineren Tubings und die kleinere Mischkammer der Anlage A2 können die unterschiedlichen Peakformen zum Teil erklären. Allerdings ist nach Erstbenutzung der Säule auch die Gesamtfläche der Elutionspeaks gesunken, was nicht mit der unterschiedlichen Anlagenauslegung zu begründen ist. Es ist wahrscheinlicher dass die Kapazität der Säule sinkt, obwohl die Säule erst zum zweiten bzw.

dritten Mal benutzt wird. Dies deutet darauf hin, dass das bisher verwendete CIP-Protokoll nicht ausreichend ist und keine vollständige Regeneration des Adsorbens erreicht wurde.

## 5.9 Optimierter Capture-Schritt via Chromatographieanlage

Mit den gewonnenen Informationen soll ein Capture-Schritt mit den optimierten Parametern durchgeführt werden. Das eluierte Produkt wird auf seine Konzentration und auf seine Aktivität hin untersucht. Tabelle 15 zeigt die gewählten Einflussgrößen.

**Tabelle 15: Parameter; optimierter Lauf**

<b>Resin</b>	Toyopearl DEAE 650 M
<b>Probenvorbereitung</b>	1:30 mit AX-Puffer-A3
<b>Probenvolumen</b>	300 mL
<b>Equilibrierungspuffer</b>	AX-Puffer-A3
<b>Elutionspuffer</b>	AX-Puffer-B3
<b>pH</b>	7
<b>Flussrate</b>	0,3 mL/min = 54cm/h

Zudem wird, nach den Erkenntnissen über den raschen Kapazitätsverlust bei den Versuchen mit den Flussraten, die Säule vor dem Lauf in invertierter Flussrichtung mit 20 CV 20% EtOH und 20 CV 1 M NaOH und anschließend in vorgesehener Flussrichtung mit wieder 20 CV 20% EtOH und 20 CV 1 M NaOH gereinigt. Durch diese Maßnahme soll eine vollständige Regeneration des Chromatographiematerials erreicht werden. Proteine sollten durch die 1 M NaOH denaturiert und von der Säule gewaschen werden. Das Ethanol sollte eventuell störende lipophile Bestandteile wie z.B. Fettsäuren aus dem Fermentationsmedium von der Säule lösen.

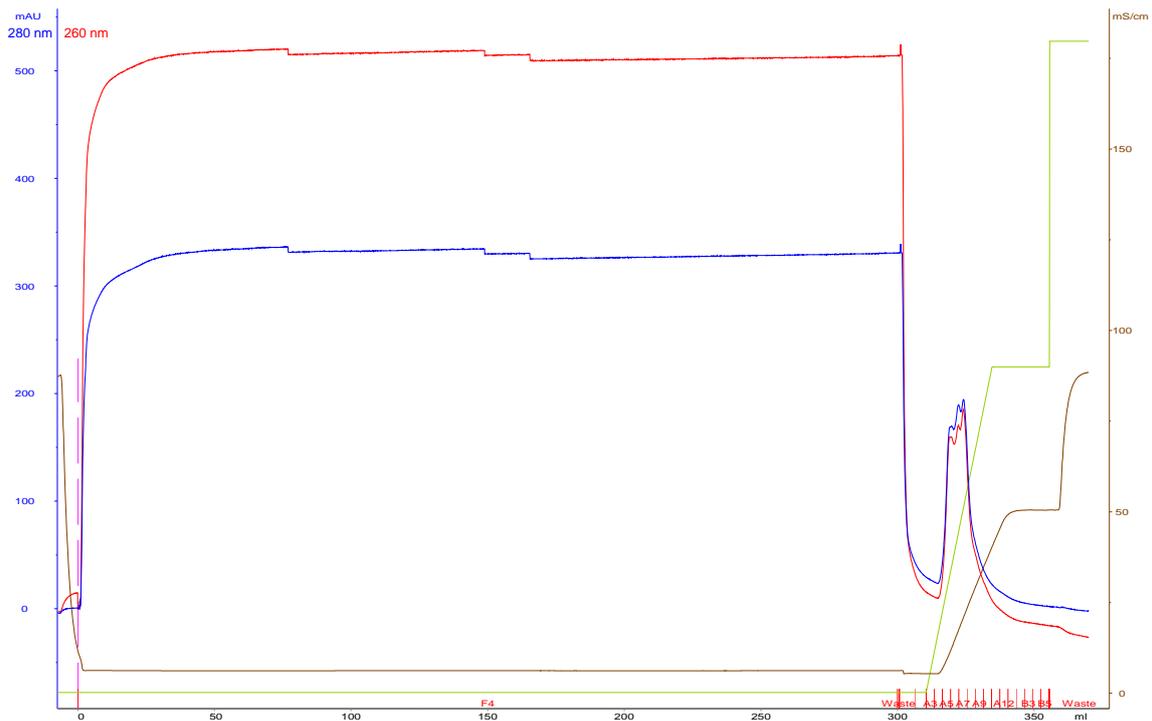
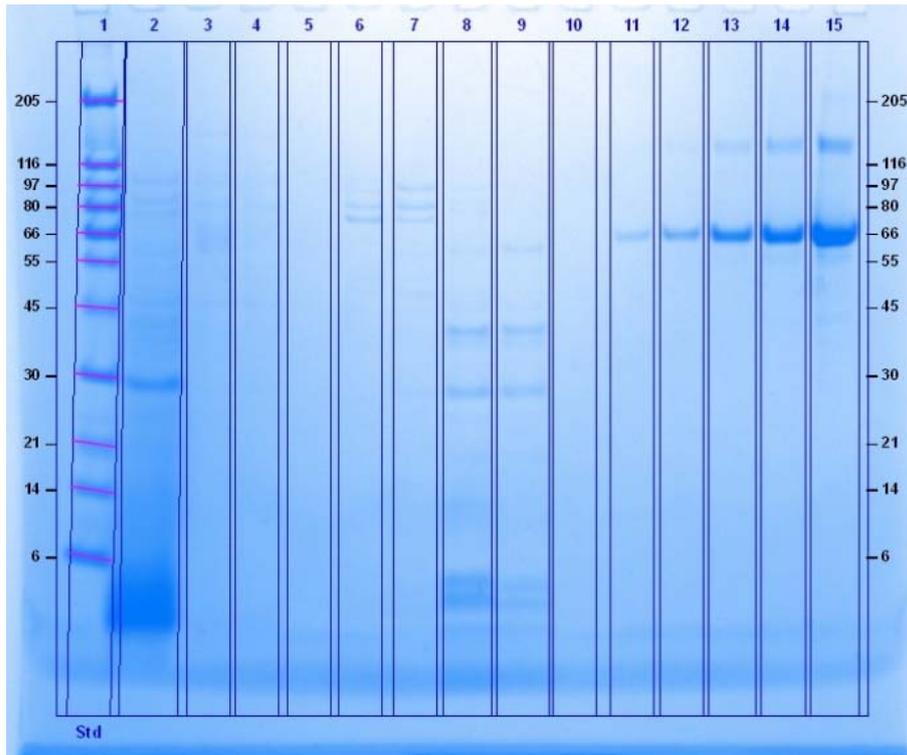


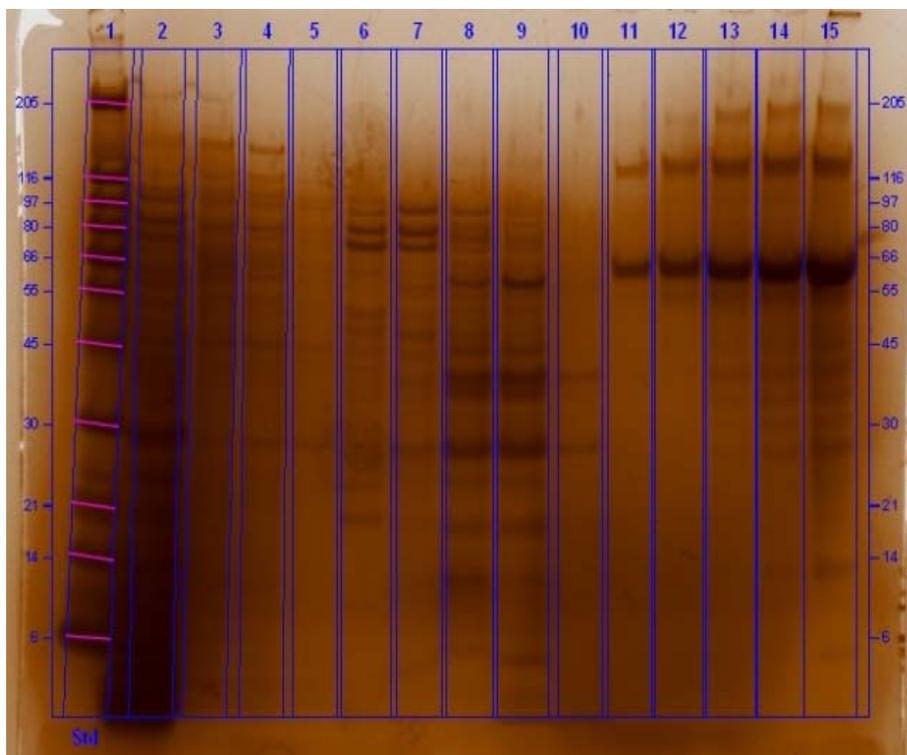
Abbildung 18: Chromatogramm; optimierter Lauf; B000 A4 AX06 R003; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-50%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,3 mL/min; Injektionsflussrate 0,3 mL/min; Toyopearl DEAE 650 M; h=3,00 cm d=0,64cm V=1mL

Da der Elutionspeak in Abbildung 18 keine größere Fläche als der in Abbildung 17 (Lauf B000 A4 AX06 R002) aufweist, sondern eine eher noch kleinere, muss davon ausgegangen werden, dass die Reinigungsmethode der Säule immer noch nicht ausreichend ist. Die Kapazität der Säule hat im Vergleich zu dem Lauf B000 A4 AX06 R002 weiter abgenommen.



- Spur 1:** Marker P-6649  
**Spur 2:** Load unverdünnt  
**Spur 3:** Load verdünnt  
**Spur 4:** FT  
**Spur 5:** Wash A1  
**Spur 6:** Elute A5  
**Spur 7:** Elute A6  
**Spur 8:** Elute A7  
**Spur 9:** Elute A8  
**Spur 10:** Elute A9  
**Spur 11:** 10 µg/mL BSA  
**Spur 12:** 20 µg/mL BSA  
**Spur 13:** 50 µg/mL BSA  
**Spur 14:** 100 µg/mL BSA  
**Spur 15:** 200 µg/mL BSA

Abbildung 19: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; optimierter Lauf; B000 A4 AX06 R003



- Spur 1:** Marker P-6649  
**Spur 2:** Load unverdünnt  
**Spur 3:** Load verdünnt  
**Spur 4:** FT  
**Spur 5:** Wash A1  
**Spur 6:** Elute A5  
**Spur 7:** Elute A6  
**Spur 8:** Elute A7  
**Spur 9:** Elute A8  
**Spur 10:** Elute A9  
**Spur 11:** 10 µg/mL BSA  
**Spur 12:** 20 µg/mL BSA  
**Spur 13:** 50 µg/mL BSA  
**Spur 14:** 100 µg/mL BSA  
**Spur 15:** 200 µg/mL BSA

Abbildung 20: SDS-PAGE mit Silber-Färbung; optimierter Lauf; B000 A4 AX06 R003

Die Gele Abbildung 19 und Abbildung 20 zeigen den Auftrag, den Durchlauf und die Wasch- und Elutionsfraktionen von B000 A4 AX06 R003. Zusätzlich wird ein BSA-Größenstandard aufgetragen um die Zielproteinkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen ermitteln zu können. Wie die Abbildung 19 zeigt kann in den beiden Fraktionen A7 und A8 auf Spur 8 und 9 Produkt gefunden werden. Das silbergefärbte Gel (Abbildung 20) enthüllt auch in der Fraktion A9 eine geringe Produktkonzentration. Allerdings ist es nicht möglich diese Konzentration zu ermitteln, da die Proportionalität von der Bandenintensität zu der Konzentration des Produkts durch die Silberfärbung verloren geht. Deswegen wurde sich für die Produktkonzentrations- und Aktivitätsbestimmung auf die Fraktionen A7 und A8 beschränkt.

Die Auswertung der Konzentrationen erfolgt, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, mit dem Programm *ImageLab*.

**Tabelle 16: Massenbestimmung; optimierter Lauf**

	V [mL]	V [ $\mu$ L]	Proteinkonzentration [ $\mu$ g/mL] <sup>1</sup>	Masse [ $\mu$ g]	Massenprozent von End of Fermentation
<b>End of Fermentation</b>	10	10000	32,9	329	100
<b>Fraktion A7</b>	3	3000	19,6	58,8	17,872
<b>Fraktion A8</b>	3	3000	14,3	42,9	13,0395

<sup>1</sup> Werte mit Hilfe von *ImageLab* berechnet

Wie Tabelle 16 zeigt, befinden sich in den beiden Fraktionen, in denen Produkt vorhanden ist, insgesamt 101,7  $\mu$ g Produkt. Da im Auftrag 329  $\mu$ g Produkt vorhanden war entspricht dies einer Produktwiederfindungsrate von 30,91 %.

Zusätzlich zu der Massenbestimmung wird ein Aktivitätsassay durchgeführt.

**Tabelle 17: Aktivitätsassay; optimierter Lauf**

	Dilution Factor	Sample Volume [mL]	Total Volume [mL]
<b>End of Fermentation 1</b>	2000	0,125	2,625
<b>End of Fermentation 2</b>	4000	0,125	2,625
<b>Fraktion A7 1</b>	50	0,125	2,625
<b>Fraktion A7 2</b>	200	0,125	2,625
<b>Fraktion A8 1</b>	50	0,125	2,625
<b>Fraktion A8 2</b>	200	0,125	2,625

End of Fermentation 1			End of fermentation 2	
t in min	Absorbance [A]	Unit/ $\mu$ L	Absorbance [A]	Unit/ $\mu$ L
15	0,233	39,144	0,113	37,968
30	0,421	35,364	0,207	34,776
45	0,628	35,168	0,299	33,488
60	0,813	34,146	0,389	32,676
$\emptyset$		<b>35,9555</b>		<b>34,727</b>
A7 1			A7 2	
t in min	Absorbance [A]	Unit/ $\mu$ L	Absorbance [A]	Unit/ $\mu$ L
15	0,128	0,5376	0,029	0,4872
30	0,255	0,5355	0,068	0,5712
45	0,396	0,5544	0,092	0,5152
60	0,496	0,5208	0,105	0,441
$\emptyset$		<b>0,537075</b>		<b>0,50365</b>
A8 1			A8 2	
t in min	Absorbance [A]	Unit/ $\mu$ L	Absorbance [A]	Unit/ $\mu$ L
15	0,043	0,1806	0	0
30	0,07	0,147	0,026	0,2184
45	0,081	0,1134	0,012	0,0672
60	0,102	0,1071	0,006	0,0252
$\emptyset$		<b>0,137025</b>		<b>0,0777</b>

Jede Probe ist zweifach vermessen. Dazu werden jeweils zwei unterschiedliche Verdünnungsstufen gewählt. Zur weiteren Berechnung werden die Mittelwerte der berechneten Aktivität verwendet. Die Probe A8 2 wird nicht für die Mittelwertberechnung verwendet, da die Absorption, aufgrund einer zu starken Verdünnung für die Enzymkonzentration in dieser Fraktion, zu gering ist. Dies führt nicht wie bei allen anderen Proben zu einem linearen Anstieg der Aktivität über die Zeit. Aus diesem Grund ist dieser Probenansatz nicht repräsentativ.

**Tabelle 18: Aktivitätsbestimmung; optimierter Lauf**

	V [mL]	V [ $\mu$ L]	$\emptyset$ Aktivität in [Unit/ $\mu$ L]	Gesamtaktivität [Unit]	Aktivität bezogen auf End of Fermentation
<b>End of Fermentation</b>	10	10000	35,3415	353415	100
<b>Fraktion A7</b>	3	3000	0,520735	1562,205	0,4420
<b>Fraktion A8</b>	3	3000	0,137	411	0,1163

Wie Tabelle 17 und Tabelle 18 zeigen ist in den beiden Fraktionen, in denen Produkt gefunden werden konnte, eine Aktivität von 1973,2 Units vorhanden. Da im Auftrag eine Aktivität von 353415 Units vorhanden war entspricht dies einer Aktivitätswiederfindungsrate von nur 0,558 %.

Warum sich die Massenwiederfindungsrate so stark von der Aktivitätswiederfindungsrate unterscheidet kann mehrere Gründe haben. Zum einem ist es vorstellbar, dass der Pufferwechsel aus dem Fermentationsmedium in den Laufpuffer bzw. den Elutionspuffer

dazu geführt hat, dass sich ein Teil des Enzyms in eine weniger bzw. gar nicht aktive Tertiärstruktur gefaltet hat. Wahrscheinlicher ist es allerdings, dass der enorme Verlust der Aktivität durch die Behandlung der Probe ausgelöst ist. Es ließ sich nicht vermeiden, das Enzym in den Elutionsfraktionen über Nacht bei 4 °C aufzubewahren, bevor das Assay durchgeführt werden konnte. Die Aktivitätswiederfindungsrate der vorangegangenen Arbeiten liegt bei 10% nach einer direkten Aktivitätsvermessung der Probe.

Wie im Kapitel 5.2 gezeigt ist, nimmt die Aktivität mit zunehmender Lagerzeit bei -20°C ohnehin ab. Die hier verwendete Probe lagerte bereits 70 Tage bei -20 °C, bis mit ihr gearbeitet wurde. Eine frische Probe würde eventuell auch eine höhere Gesamtaktivität im Eluat liefern. Der Pufferwechsel und die Lagerung scheinen kritische Punkte des Capture-Schrittes zu sein. Die Etablierung eines geeigneten Lauf- und Lagerpuffers bzw. die Suche nach stabilisierenden Komponenten in der mobilen Phase, ist ein unbedingt durchzuführender Schritt für kommende Arbeiten. Die Koagulation der Probelösung, die in Kapitel 5.7 beschrieben ist, deutet ebenfalls darauf hin, dass eine stabilisierende Komponente im Puffer fehlt.

### 5.10 Kostenrechnung Kalkulation

Nach den gewählten Prozessparametern werden 10 mL Fermentationsmedium mit 1 mL Resin aufgereinigt. Dies entspricht einem Verhältnis von 1:10. Der größte Vorlagebehälter bei *Richter-Helm Biologics* besitzt ein Volumen von 4.000 L. Beachtet man dazu noch die 1:30 Verdünnung kann ein Fermentationsvolumen von 130 L bearbeitet werden. Für 130 L würden also 13 L gepacktes Adsorbens benötigt. Geht man von einem typischen Säulendurchmesser in der Produktion von 30 cm aus, so würde sich für 130 L Resin eine Betthöhe von 18,5 cm ergeben. Das Resin für die Säule würde ca. 13.000 € kosten (ang. 1000 €/ Liter Resin). Die 30 cm Säule würde ca. 175.000,00 € kosten. Aus 10 ml Fermentationsüberstand können 1973 Units gewonnen werden. Bezieht man dieses Verhältnis auf ein Fermentationsvolumen von 130 L so ergeben sich 25651,6 kU. Bei einem geschätzten Verkaufspreis (Vergleich mit dem Originalprodukt) von 0,015 €/Unit würde das zu einem Bruttogewinn von 384.774,00 € führen. Der kalkulierte Bruttogewinn ist in dieser Betrachtung nur abhängig von den Units des Zielproteins. Wie bereits im Kapitel 5.9 angesprochen müsste die Aktivität nach der Elution des Capture-Schrittes überprüft werden, da die Bedingungen nicht optimal waren. Es ist also davon auszugehen, dass noch Optimierungspotential besteht und der Bruttogewinn gesteigert werden kann.

## 6 Fazit

Die Produktwiederfindungsrate konnte durch die gesammelten Erkenntnisse von 20 % der vorigen Arbeiten auf 30 % gesteigert werden. Die Aktivität des Zielproteins der vorigen Arbeiten nach dem Capture-Schritt lag nach direktem Vermessen der eluierten Fraktionen bei 10 %. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die hier gefundene sehr geringe Aktivität durch direkteres Vermessen der Probe und oder stabilisierende Komponenten zu steigern ist. Der optimierte Lauf müsste wiederholt und die Aktivität des Zielproteins direkt vermessen werden um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erhalten. Die Aktivität des Zielproteins nimmt bei 4°C rapide ab (NESTLE und ROBERTS, 1969). Daher sollte die Lagerung unter diesen Bedingungen unbedingt vermieden werden. Die Lagerung bei -20 °C wirkt sich ebenfalls stark negativ aus wie in Kapitel 5.2 gezeigt werden konnte. Die gesammelten Ergebnisse weisen darauf hin, dass immer mit möglichst frischer Probe gearbeitet werden sollte um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden. Zusätzlich muss nach stabilisierenden Komponenten des Zielproteins gesucht werden um derartige Aktivitätsverluste zu vermeiden. Eine solche Komponente kann Glycerin sein. Die Zugabe von 50 % v/v Glycerin steigert die Lagerfähigkeit des Zielproteins (NESTLE und ROBERTS, 1969). Die Zugabe von Glycerin führt zur Reduzierung der Polarität. Dadurch kann während der Lagerung eine rapide Koagulation der Proteine verhindert werden und somit die Aktivität erhalten bleiben. Auch während der Chromatographie kann schon Glycerin zu der mobilen Phase gegeben werden. Hierbei sind Konzentrationen von 10 % v/v nicht unüblich (GE HEALTHCARE, „Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing“). Mit der gemessenen Aktivität eignet sich der Capture-Schritt noch nicht für die technische Produktion des Zielproteins.

Rückblickend muss auch angemerkt werden, dass die beiden Affinitätsmedien zu früh außer acht gelassen wurden. Hätte man einen ähnlichen Aufwand mit der Optimierung der mobilen Phase der Affinitätsresins betrieben, wie das bei den Anionenaustauschern der Fall war, hätte man eventuell eine effektivere Produktanbindung entwickeln können. Zumindest nach den positiven Ergebnissen bei der hohen Verdünnungsstufe (Kapitel 5.4), hätte man diese Erkenntnis auch auf die Affinitätsadsorbentien anwenden können.

Wie in Kapitel 5.5 gezeigt wurde, befindet sich das Zielprotein in keinem unproblematischen Fermentationsmedium. Daher könnte ein weiterer Ansatzpunkt eine Umpufferung aus dem Fermentationsmedium sein. Mittels Ultrafiltration/Diafiltration könnte man so, schon vor dem chromatographischen Capture-Schritt, eventuell störende Medienbestandteile trennen. Auch

Fällungsschritte, wie eine Ammoniumsulfatfällung, könnten hier eine Option sein (MOLIN, et al., 1992).

Um die Effektivität des Capture-Schrittes noch weiter zu steigern wäre auch ein erneutes pH-Scouting mit dem *Toyopearl DEAE 650 M* Resin zu empfehlen, da es keine Garantie dafür gibt, dass der ermittelte pH-Wert bei gegebener Aufgabenstellung der optimale Parameter für alle Anionenaustauscher ist. Zumal ist das bei dem pH-Scouting verwendete Adsorbens ein starker Anionenaustauscher und nicht wie das Adsorbens *Toyopearl DEAE 650 M* ein schwacher Anionenaustauscher. Da die Ionenaustauschkapazität bei schwachen Ionenaustauschern viel stärker vom pH-Wert abhängig ist als bei starken, ist ein erneutes pH-Scouting zu empfehlen. Zudem sind die Ergebnisse des pH-Scoutings aufgrund der ungünstigen Vorgehensweise, wie in Kapitel 5.6 angesprochen, fragwürdig.

Die Optimierung des Adsorbens führte zu der Verwendung von *Toyopearl DEAE 650 M*. Dies deckt sich mit in der Literatur gefundenen Arbeiten, in denen zur Aufreinigung einer Nuclease ebenfalls ein auf DEAE basierendes Adsorbens verwendet wurde (YASUDA et al. 1997).

Eine ebenfalls wichtige Beobachtung ist die Abnahme der Kapazität mit mehrmaliger Benutzung der Säulen. Die Abnahme der Kapazität kann Ihre Ursache darin haben, dass Proteine auf der Säule ausfallen. Die Adsorbentienmatrix der verwendeten *Toyopearl DEAE 650 M*-Säule besteht aus Polymethacrylatverbindungen. Diese synthetischen, anionischen Polymere können, gerade in hoher Konzentration, für eine Koagulation von Biomasse günstige Bedingungen schaffen (G. CORNELISSEN, 2010). Eine hohe Konzentration der Polymere ist durch die poröse Struktur und der damit resultierenden großen Oberfläche der Beads gegeben. Ein weiterer Punkt der dafür spricht, dass Proteine auf der Säule ausfallen ist die Druckzunahme während der einzelnen Läufe (Daten nicht gezeigt/ lokal bei Richter-Helm Biologics hinterlegt). Das Fermentationsmedium weist eine  $K_2HPO_4$ -Konzentration von 8,65 g/L und eine  $KH_2PO_4$ -Konzentration von 6,85 auf (Tabelle 6). Die dadurch in Lösung auftretenden kosmotropen  $PO_4^{3-}$ -Anionen führen zu einer Destabilisierung von Proteinen in wässriger Lösung (CACACE et al., 1997). Dies spricht ebenfalls dafür, dass Proteine auf der Säule ausgefallen sind. Ein anderer möglicher Grund für die Abnahme der Säulenkapazität sind DNA Kontaminationen. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da das Zielprotein extrazellulär produziert wird und damit ein Zellaufschluss, welcher DNA-Freisetzung zur Folge haben würde, überflüssig ist. Außerdem besitzt das Zielprotein DNase-Aktivität. Sollte das Produkt tatsächlich auf der Säule ausgefallen sein, würde dies auch erklären warum die Produktwiederfindungsrate bei nur 30 % liegt. Dieser Vermutung muss bei zukünftigen

Arbeiten mit dem Produkt nachgegangen werden. Überprüfen lässt sich die Vermutung durch ein Proteinassay wie z.B. ein Bradfordassay, welches in der Lage ist durch Natronlauge eluierte Proteine nachzuweisen. Durch das Assay wäre es möglich eine Bilanz aufzustellen, die verrät ob und wie viel Zielprotein auf dem Adsorbens ausgefallen ist. Dieser Sachverhalt unterstreicht die Signifikanz nach der Suche einer stabilisierenden Komponente in der mobilen Phase und Probelösung. Es wäre deswegen durchaus denkbar, dass die Massen- und Aktivitätswiederfindungsrate im Eluat mit einer gut gereinigten Säule und stabilisierenden Komponenten weiter zu steigern ist. Wie in diesem Kapitel bereits angesprochen, ist Glycerin in der mobilen Phase eine Möglichkeit das Zielprotein zu stabilisieren. Außerdem kann NaCl einen stabilisierenden Effekt auf Proteine haben (NESTLE und ROBERTS, 1969). Durch die Zugabe von chaotropen Salzen (wie NaCl) kann die Löslichkeit von Proteinen in der mobilen Phase gesteigert werden. Dadurch kann die Koagulation auf dem chromatographischen Trägermaterial eventuell eingeschränkt werden (GE HEALTHCARE, „Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing“; CACACE et al., 1997). Wenn die NaCl-Konzentration so eingestellt wird, dass die Leitfähigkeit der Probe nur wenig geringer ist, als die zur Elution des Zielproteins benötigte Leitfähigkeit, hat dies auch zur Folge, dass weniger Nebenprodukte an das Adsorbens binden und somit die Kapazität der Säule eventuell weiter gesteigert werden kann.

Ein effektiveres Reinigungsprotokoll ist wichtig, um die rasche Abnahme der Säulenkapazität zu verhindern und damit sicher zu stellen, dass Adsorbentien in einer technischen Produktion möglichst oft verwendet werden können. Das Resin *Toyopearl DEAE 650 M* weist eine hohe chemische Stabilität und Hitzeunempfindlichkeit auf (TOSOH, „Ion Exchange Chromatographie“), was für später entwickelte Reinigungsverfahren einen großen Vorteil darstellen kann. Eine effektivere Reinigung könnte durch den Einsatz von Detergenzien oder höheren Konzentrationen und längeren Einwirkzeiten von Natronlauge und Ethanol erreicht werden. Die Regeneration des Chromatographiematerials ist ein wichtiger Ansatzpunkt für weitere Arbeiten auf diesem Gebiet.

Verbesserungspotenzial besteht auch bei der Methodik der Chromatographie selbst. Denn ein nächster logischer Schritt wäre beispielsweise einen flacheren Salzgradienten zu nutzen, der es ermöglicht das Zielprotein noch besser von den unerwünschten Proteinen zu trennen. Auch eine gezielte Stufenelution bzw. eine Kombination aus beiden Verfahren könnte die Reinheit steigern.

### III Literaturverzeichnis

#### Herstellerangaben:

**GE Healthcare:** „Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing“.

[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/3E56FFCAFE43BCADC1257628001D0EC6/\\$file/11000421AB.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/3E56FFCAFE43BCADC1257628001D0EC6/$file/11000421AB.pdf) (Abgerufen am 20.12.2011) S. 22-23

**GE Healthcare:** „CM Sepharose™ Fast Flow DEAE Sepharose Fast Flow Q Sepharose Fast Flow SP Sepharose Fast Flow“.

[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/182160370C076739C1257628001D0B5C/\\$file/71500964AE.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/182160370C076739C1257628001D0B5C/$file/71500964AE.pdf) (Abgerufen am 20.12.2011)

**GE Healthcare:** „Q Sepharose XL, Q Sepharose XL virus licensed, SP Sepharose XL“.

[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/04E7B080197A62F2C1257628001CCC90/\\$file/18112382AD.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/04E7B080197A62F2C1257628001CCC90/$file/18112382AD.pdf) (Abgerufen am 20.12.2011)

#### **GE Healthcare:**

<http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/Products?OpenDocument&parentid=744175&moduleid=163137> (Abgerufen am 20.12.2011)

**Merck:** „Fractogel® EMD Process Media“.

<http://85.238.144.18/lifescience/literature/Fractogel%20EMD%20Biochromatography%20Media.pdf> (Abgerufen am 20.12.2011)

**Merck:** „Benzonase ® endonuclease, The Smart Solution for DNA Removal“.

<http://www.bioneer.dk/files/Files/Benzonase1.pdf> (Abgerufen am 20.12.2011)

**Invitrogen:** „Protein Molecular Weight Standards (P-6649)“.

<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp06647.pdf> (Abgerufen am 03.01.2012)

**Invitrogen:** „SilverXpress® Silver Staining Protocol“.

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/staining-protein-gels/silver-staining.html#post> (Abgerufen am 20.12.2011)

**Poros:** „POROS® 50 HQ, DEAE, and PI, Perfusion Chromatography®, Bulk Media for Anion Exchange Chromatography”.

[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_040659.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm_support/documents/generaldocuments/cms_040659.pdf) (Abgerufen am 19.12.2011)

**Tosoh:** „Ion Exchange Chromatography“.

[http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/IonExchange/TOSOH\\_IEC.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/IonExchange/TOSOH_IEC.pdf) (Abgerufen am 19.12.2011) S. 18

**Tosoh:** „TOYOPEARL GigaCap® Q-650M“.

[http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/9EE7274B-BC97-47C5-866C-530F9EDC9441/0/F08P01A\\_Toyopearl\\_GigaCapQ.pdf](http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/9EE7274B-BC97-47C5-866C-530F9EDC9441/0/F08P01A_Toyopearl_GigaCapQ.pdf) (Abgerufen am 19.12.2011)

**Tosoh:** „TOYOPEARL® Q-600C AR”.

[http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/74BAF527-0D0D-4E39-8B5A-834D33E69063/0/F09P21A\\_Toyopearl\\_Q600CAR.pdf](http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/74BAF527-0D0D-4E39-8B5A-834D33E69063/0/F09P21A_Toyopearl_Q600CAR.pdf) (Abgerufen am 20.12.2011)

#### **Journale und andere Quellen:**

**BENEDIK M. J. und STRYCH U.:** „*Serratia marcescens* and its extracellular nuclease”, in: FEMS Microbiology Letters 165 (1988) S. 1 - 13

**CACACE M. G., LANDAU E. M. und RAMSDEN J. J.:** „The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena”, in: *Quarterly Reviews of Biophysics* 30, 3 (1997), S. 241 – 277

**CORNELISSEN G.:** „Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren”, Lehrskript der HAW Hamburg (2010)

**FOX T., BATES S., VITO C. und WIELAND S.:** „Carrier Protein Effects on DNACellulose Chromatography of Putative Steroid Receptors”, in: *The Journal of Biological Chemistry* (1979) S. 4963 - 4966

**MIR E.:** „Entwicklung eines small scale Fermentationsverfahrens zur Produktion einer Nuklease in *Escheria coli*”, Bachelorarbeit der Hochschule Biberach (2012) S. 17 - 27

**MOLIN S., GIVSKOV M. und RIISE E.:** „Production in *Escherichia Coli* of extracellular Serratia SPP. Hydrolases”, United States Patent No: 5,173,418 (1992) S. 4

**NESTLE M. und ROBERTS W. K.:** „An Extracellular Nuclease from *Serratia marcescens*”, in: The Journal of Biological Chemistry (1969) S. 5213 - 5218

**TAKESHITA H., YASUDA T., NADANO D., IIDA R. und KISHI K.:** „Deoxyribonuclease I from Rat Urine: Affinity Purification, Characterization, and Immunochemical Studies”, in: J. Biochem. (1995) S. 932 - 938

**TILBEURGH H., ROUSSEL A., LALOUEL J.M. und CABBILLAU C.:** “Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis”, in: The Journal of Biological Chemistry (1994) S.4626 - 4633

**YASUDA T., TAKESHITA H., NAKJIMA T., HOSOMI O., NAKASHIMA Y und KISHI K.:** „Rabbit DNase I: purification from urine, immunological and protochemical characterization, nucleotide sequence, expression in tissues, relationship with other mammal DNases I and phylogenetic analysis”, in: J. Biochem. (1997) S. 465 - 473

## IV Anhang

### IV.a Methoden der Chromatographie-Läufe

#### B000 A2 AX04 R001

Anlage	Säulenmaterial	Säulenhöhe	Säulendurchmesser	Volumen
Aekta 2	Fractogel EMD TMAE	1,92cm	0,82cm	1 mL
Waschpuffer	Elutionspuffer	Probenvolumen	Flussrate	Injektionsflussrate
AX-Puffer-A1	AX-Puffer-B1	10 mL	0,5 mL/min	1 mL/min
Vorwaschen mit Elutionspuffer	Equilibrieren	Waschen	Elution	Nachwaschen mit Elutionspuffer
2 CV	10 CV	13 CV	Gradient 0-100%; 20 CV	2 CV

#### B000 A1 AX04 R002

Anlage	Säulenmaterial	Säulenhöhe	Säulendurchmesser	Volumen
Aekta 1	Fractogel EMD TMAE	1,92 cm	0,82 cm	1 mL
Waschpuffer	Elutionspuffer	Probenvolumen	Flussrate	Injektionsflussrate
AX-Puffer-A1	AX-Puffer-B1	10 mL	0,5 mL/min	1 mL/min
Vorwaschen mit Elutionspuffer	Equilibrieren	Waschen	Elution	Nachwaschen mit Elutionspuffer
2 CV	10 CV	20 CV	Gradient 0-100%; 20 CV	2 CV

#### B000 A1 AX04 R003

Anlage	Säulenmaterial	Säulenhöhe	Säulendurchmesser	Volumen
Aekta 1	Fractogel EMD TMAE	1,92 cm	0,82 cm	1 mL
Waschpuffer	Elutionspuffer	Probenvolumen	Flussrate	Injektionsflussrate
AX-Puffer-A1	AX-Puffer-B1	40 mL	0,5 mL/min	1 mL/min
Vorwaschen mit Elutionspuffer	Equilibrieren	Waschen	Elution	Nachwaschen mit Elutionspuffer
2 CV	10 CV	20 CV	Gradient 0-100%; 25 CV	2 CV

#### B000 A4 AX06 R001

Anlage	Säulenmaterial	Säulenhöhe	Säulendurchmesser	Volumen
Aekta 4	Toyopearl DEAE 650 M	3 cm	0,64 cm	1 mL
Waschpuffer	Elutionspuffer	Probenvolumen	Flussrate	Injektionsflussrate
AX-Puffer-A3	AX-Puffer-B3	300 mL	1,5 mL/min	1,5 mL/min
Vorwaschen mit Elutionspuffer	Equilibrieren	Waschen	Elution	Nachwaschen mit Elutionspuffer
10 CV	10 CV	10 CV	Gradient 0-50%; 25 CV	15 CV

<b>B000 A4 AX06 R002-R003</b>				
<b>Anlage</b>	<b>Säulenmaterial</b>	<b>Säulenhöhe</b>	<b>Säulendurchmesser</b>	<b>Volumen</b>
Aekta 4	Toyopearl DEAE 650 M	3 cm	0,64 cm	1 mL
<b>Waschpuffer</b>	<b>Elutionspuffer</b>	<b>Probenvolumen</b>	<b>Flussrate</b>	<b>Injektionsflussrate</b>
AX-Puffer-A3	AX-Puffer-B3	300 mL	0,3 mL/min	0,3 mL/min
<b>Vorwaschen mit Elutionspuffer</b>	<b>Equilibrieren</b>	<b>Waschen</b>	<b>Elution</b>	<b>Nachwaschen mit Elutionspuffer</b>
10 CV	10 CV	10 CV	Gradient 0-50%; 25 CV	15 CV

<b>B000 A2 S001</b>				
<b>Anlage</b>	<b>Säulenmaterial</b>	<b>Säulenhöhe</b>	<b>Säulendurchmesser</b>	<b>Volumen</b>
Aekta 2	Fractogel EMD TMAE	1,92 cm	0,82 cm	1 mL
<b>Waschpuffer</b>	<b>Elutionspuffer</b>	<b>Probenvolumen</b>	<b>Flussrate</b>	<b>Injektionsflussrate</b>
Scouting	Scouting	300 mL	0,5 mL/min	1 mL/min
<b>Vorwaschen mit Elutionspuffer</b>	<b>Equilibrieren</b>	<b>Waschen</b>	<b>Elution</b>	<b>Nachwaschen mit Elutionspuffer</b>
2 CV	10 CV	10 CV	Gradient 0-100%; 15 CV	2 CV

<b>B000 A2 S002-S003</b>				
<b>Anlage</b>	<b>Säulenmaterial</b>	<b>Säulenhöhe</b>	<b>Säulendurchmesser</b>	<b>Volumen</b>
Aekta 2	Scouting	1,92 cm	0,82 cm	1 mL
<b>Waschpuffer</b>	<b>Elutionspuffer</b>	<b>Probenvolumen</b>	<b>Flussrate</b>	<b>Injektionsflussrate</b>
AX-Puffer-A3	AX-Puffer-B3	300 mL	0,5 mL/min	0,5 mL/min
<b>Vorwaschen mit Elutionspuffer</b>	<b>Equilibrieren</b>	<b>Waschen</b>	<b>Elution</b>	<b>Nachwaschen mit Elutionspuffer</b>
2 CV	10 CV	10 CV	Gradient 0-100%; 15 CV	2 CV

<b>B000 A2 S004-S005</b>				
<b>Anlage</b>	<b>Säulenmaterial</b>	<b>Säulenhöhe</b>	<b>Säulendurchmesser</b>	<b>Volumen</b>
Aekta 2	Scouting	3 cm	0,64 cm	1 mL
<b>Waschpuffer</b>	<b>Elutionspuffer</b>	<b>Probenvolumen</b>	<b>Flussrate</b>	<b>Injektionsflussrate</b>
AX-Puffer-A3	AX-Puffer-B3	300 mL	0,5 mL/min	0,5 mL/min
<b>Vorwaschen mit Elutionspuffer</b>	<b>Equilibrieren</b>	<b>Waschen</b>	<b>Elution</b>	<b>Nachwaschen mit Elutionspuffer</b>
2 CV	10 CV	10 CV	Gradient 0-100%; 15 CV	2 CV

#### IV.b Validierung des Aktivitätsassays

Zur Überprüfung der Verlässlichkeit und Genauigkeit des Aktivitätsassays wurde die eigene Probe vermessen und zusätzlich mit dem Originalprodukt versehen. In diesem Fall werden 2  $\mu\text{L}$  des Originalproduktes (25 U/ $\mu\text{L}$ ), also 50 Units, zu der eigenen Probe während des Verdünnungsvorganges hinzu pipettiert. Dies findet bei der Verdünnungsstufe statt, bei der in der eigenen Probe etwa 50 Units im Probenansatz vermutet wurden. Außerdem wurde ausschließlich die Aktivität des Originalproduktes gemessen.

Tabelle 19: Aktivitätsassay; Überprüfung

	Dilution Factor	Sample Volume [mL]	Total Volume [mL]
End of fermentation 1	4000	0,125	2,625
End of fermentation 2	4000	0,125	2,625
End of fermentation + OP <sup>1</sup> 1	4000	0,125	2,625
End of fermentation + OP <sup>1</sup> 2	4000	0,125	2,625
OP <sup>1</sup> (25 U/μL) 1	6500	0,125	2,625
OP <sup>1</sup> (25 U/μL) 2	32500	0,125	2,625
<sup>1</sup> Originalprodukt			

		End of fermentation 1		End of fermentation 2	
t in min	Absorbance [A]	Unit/μL	Absorbance [A]	Unit/μL	
15	0,181	60,816	0,195	65,52	
30	0,365	61,32	0,376	63,168	
45	0,578	64,736	0,594	66,528	
60	0,739	62,076	0,752	63,168	
∅		<b>62,237</b>		<b>64,596</b>	
		End of fermentation + Originalprodukt 1		End of fermentation + Originalprodukt 2	
t in min	Absorbance [A]	Unit/μL	Absorbance [A]	Unit/μL	
15	0,365	122,64	0,363	121,968	
30	0,723	121,46	0,681	114,408	
45	1,115	124,88	1,097	122,864	
60	1,448	121,63	1,408	118,272	
∅		<b>122,65</b>		<b>119,378</b>	
		Originalprodukt (25 U/μL) 1		Originalprodukt (25 U/μL) 2	
t in min	Absorbance [A]	Unit/μL	Absorbance [A]	Unit/μL	
15	0,052	28,392	0,013	35,49	
30	0,083	22,659	0,024	32,76	
45	0,142	25,844	0,039	35,49	
60	0,203	27,71	0,041	27,9825	
∅		<b>26,151</b>		<b>32,9306</b>	

Die Ergebnisse des Assays, die in Tabelle 19 aufgeführt sind, zeigen eine durchschnittliche Aktivität von 63,4 Units/μL im Fermentationsüberstand. Die mit Originalprodukt versehenen Probenansätze weisen eine durchschnittliche Aktivität von 121 Units/μL auf. Dies stimmt mit dem zu erwartenden Ergebnis sehr gut überein, da in den mit Originalprodukt versehenen Proben eine Aktivität erwartet wurde, die 50 Units/μL über der des Fermentationsüberstandes liegt. Die Vermessung des Originalproduktes liegt zumindest bei der 1:6500 Verdünnung auch sehr nah an der vom Hersteller angegebenen Aktivität. Die 1:32500 Verdünnung weist eine so geringe Absorption auf, dass es nicht verwundert, dass hier eine gewisse Abweichung vorliegt.

## IV.c Einfluss der Matrix

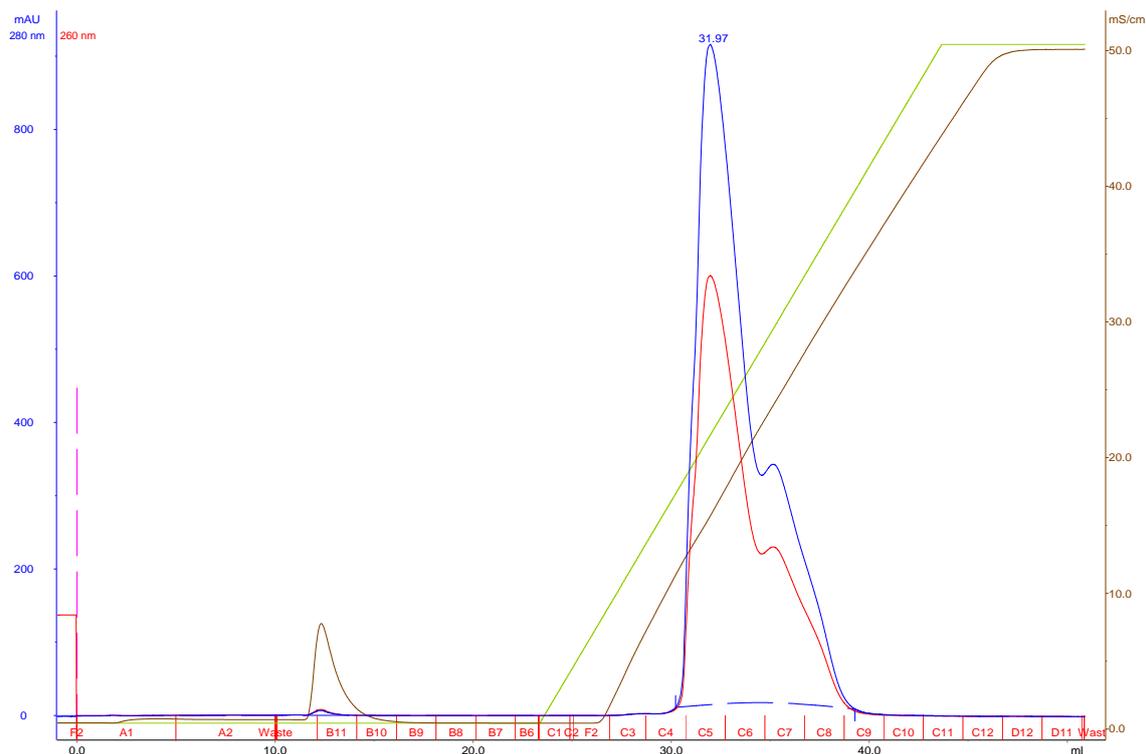


Abbildung 21: Chromatogramm; Einfluss der Matrix; B000 A2 AX04 R001; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; BSA in AX-Puffer-A1 gelöst

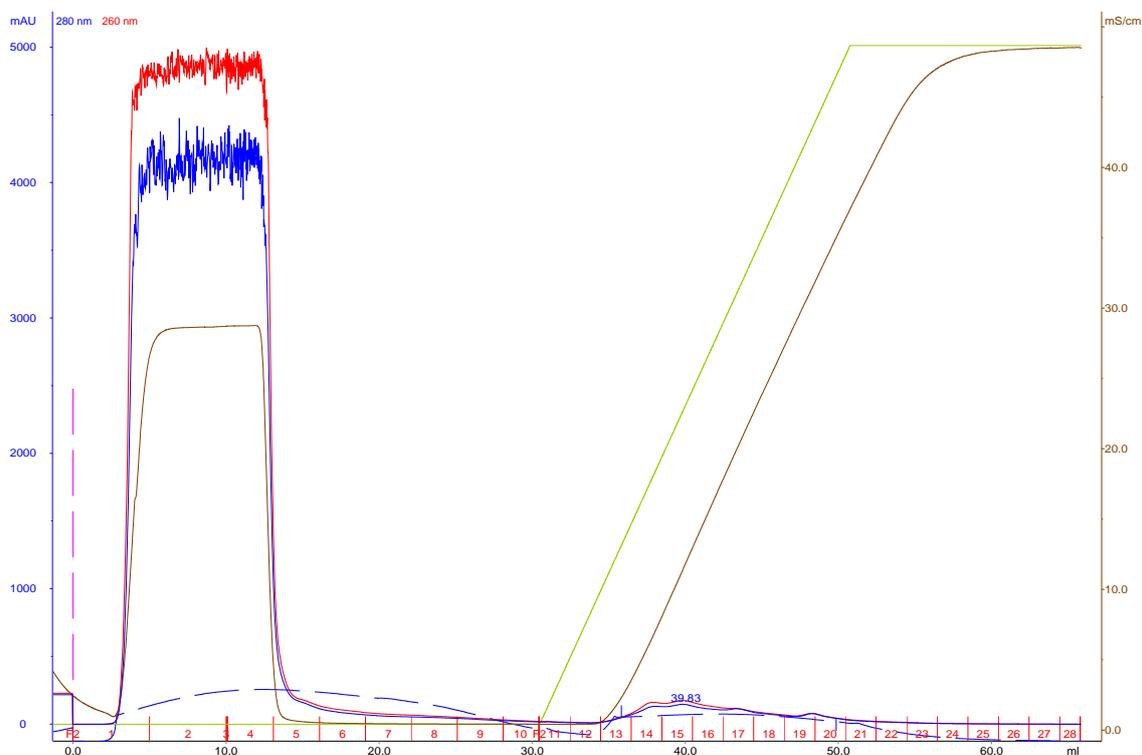


Abbildung 22: Chromatogramm; Einfluss der Matrix; B000 A1 AX04 R002; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1 mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1 mL; BSA in Probenmatrix gelöst

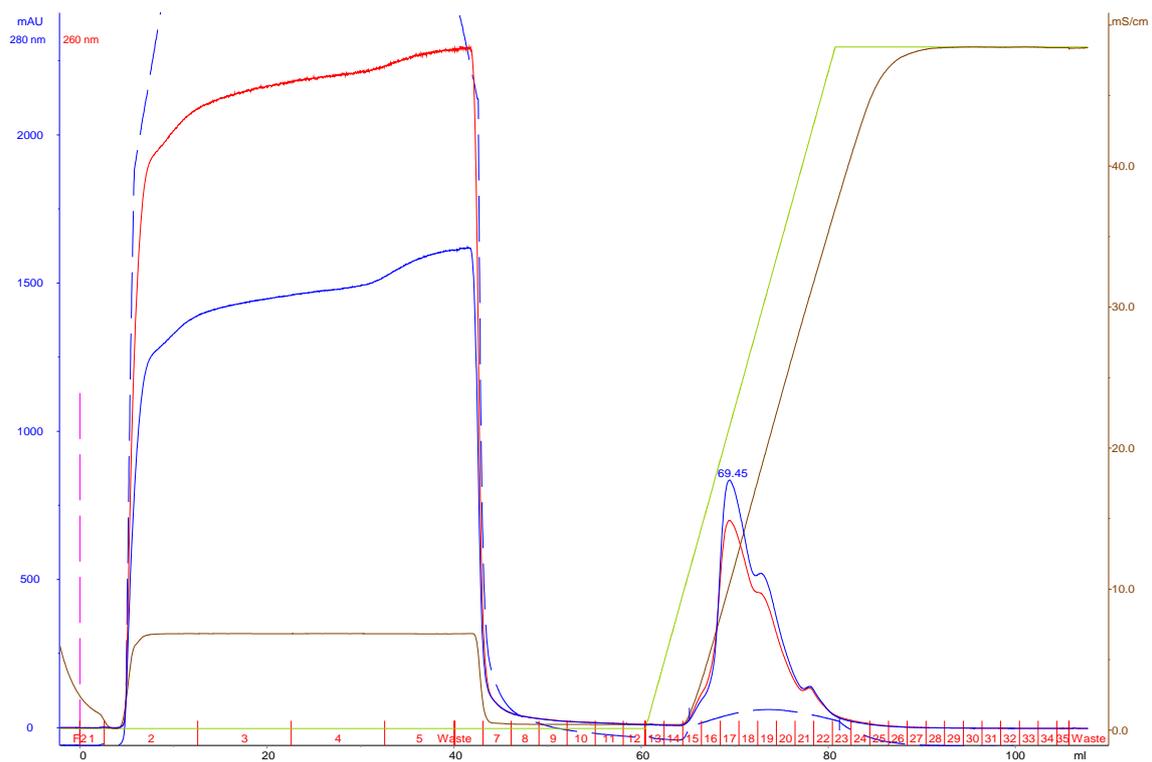
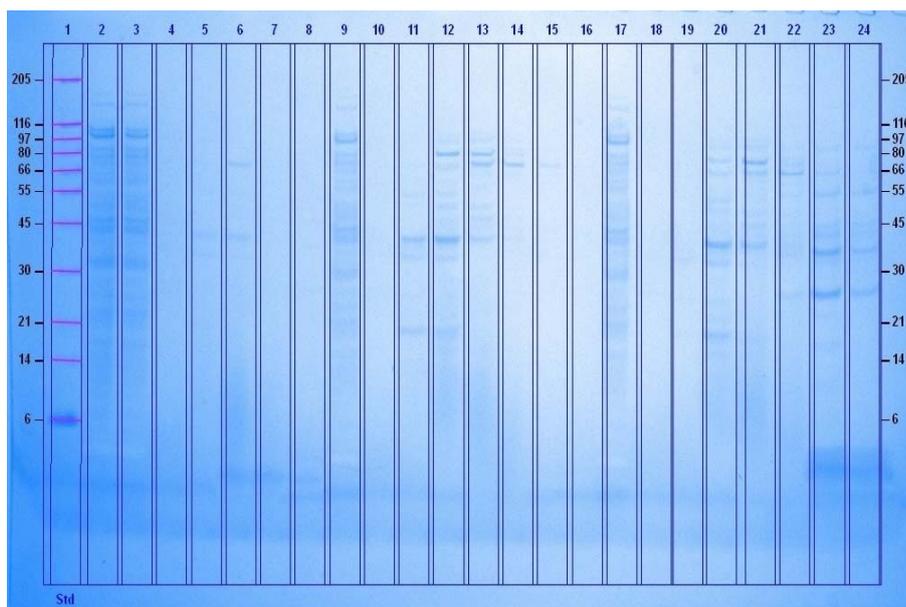


Abbildung 23: Chromatogramm; Einfluss der Matrix; B000 A1 AX04 R003; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; BSA in Probenmatrix gelöst; 1:4 mit AX-Puffer-A1 verdünnt

#### IV.d pH Scouting



- |                 |                              |
|-----------------|------------------------------|
| <b>Spur 1:</b>  | <b>Marker P-6649</b>         |
| <b>Spur 2:</b>  | <b>Load</b>                  |
| <b>Spur 3:</b>  | <b>B000 A2 S001 L001; FT</b> |
| <b>Spur 4:</b>  | <b>Wash A1</b>               |
| <b>Spur 5:</b>  | <b>Elute A6</b>              |
| <b>Spur 6:</b>  | <b>Elute A7</b>              |
| <b>Spur 7:</b>  | <b>Elute A8</b>              |
| <b>Spur 8:</b>  | <b>Elute A9</b>              |
| <b>Spur 9:</b>  | <b>B000 A2 S001 L002; FT</b> |
| <b>Spur 10:</b> | <b>Wash C1</b>               |
| <b>Spur 11:</b> | <b>Elute C7</b>              |
| <b>Spur 12:</b> | <b>Elute C8</b>              |
| <b>Spur 13:</b> | <b>Elute C9</b>              |
| <b>Spur 14:</b> | <b>Elute C10</b>             |
| <b>Spur 15:</b> | <b>Elute C11</b>             |
| <b>Spur 16:</b> | <b>Elute C12</b>             |
| <b>Spur 17:</b> | <b>B000 A2 S001 L003; FT</b> |
| <b>Spur 18:</b> | <b>Wash E1</b>               |
| <b>Spur 19:</b> | <b>Elute E7</b>              |
| <b>Spur 20:</b> | <b>Elute E8</b>              |
| <b>Spur 21:</b> | <b>Elute E9</b>              |
| <b>Spur 22:</b> | <b>Elute E10</b>             |
| <b>Spur 23:</b> | <b>Elute E11</b>             |
| <b>Spur 24:</b> | <b>Elute E12</b>             |

Abbildung 24: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; pH-Scouting; B000 A2 S001 L001-L003; pH6, pH 6,5, pH 7

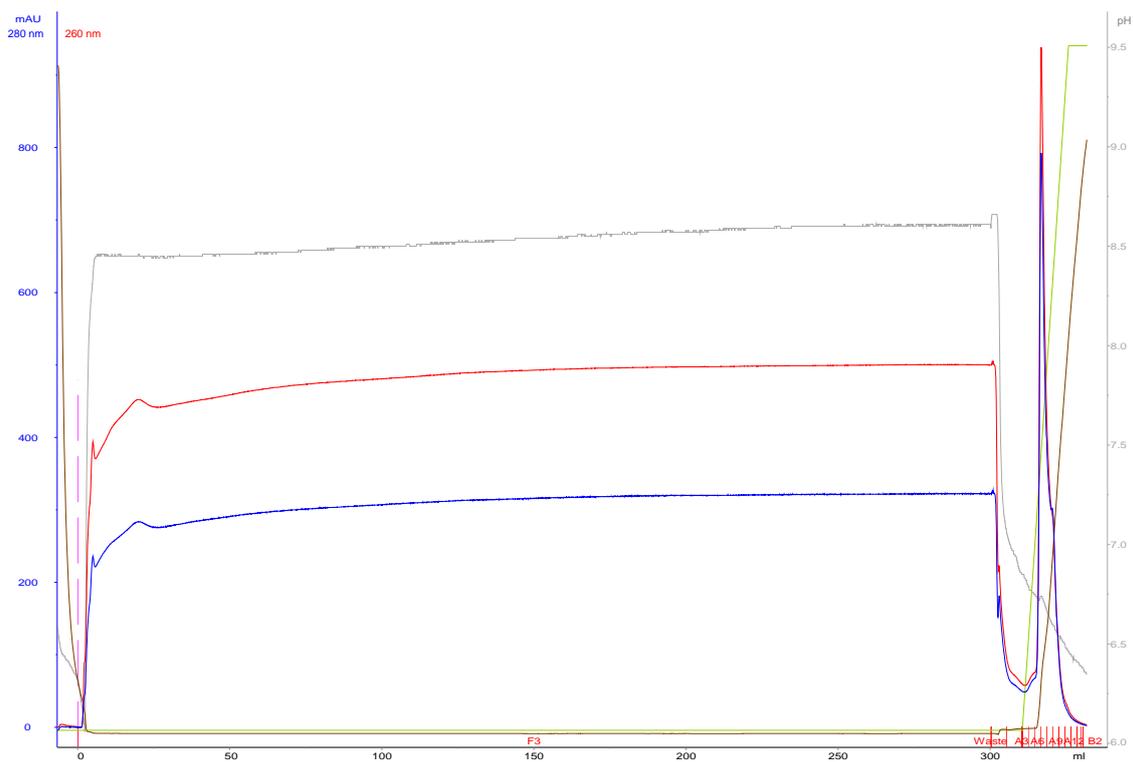


Abbildung 25: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L001; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-1 M NaCl; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; pH 6; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

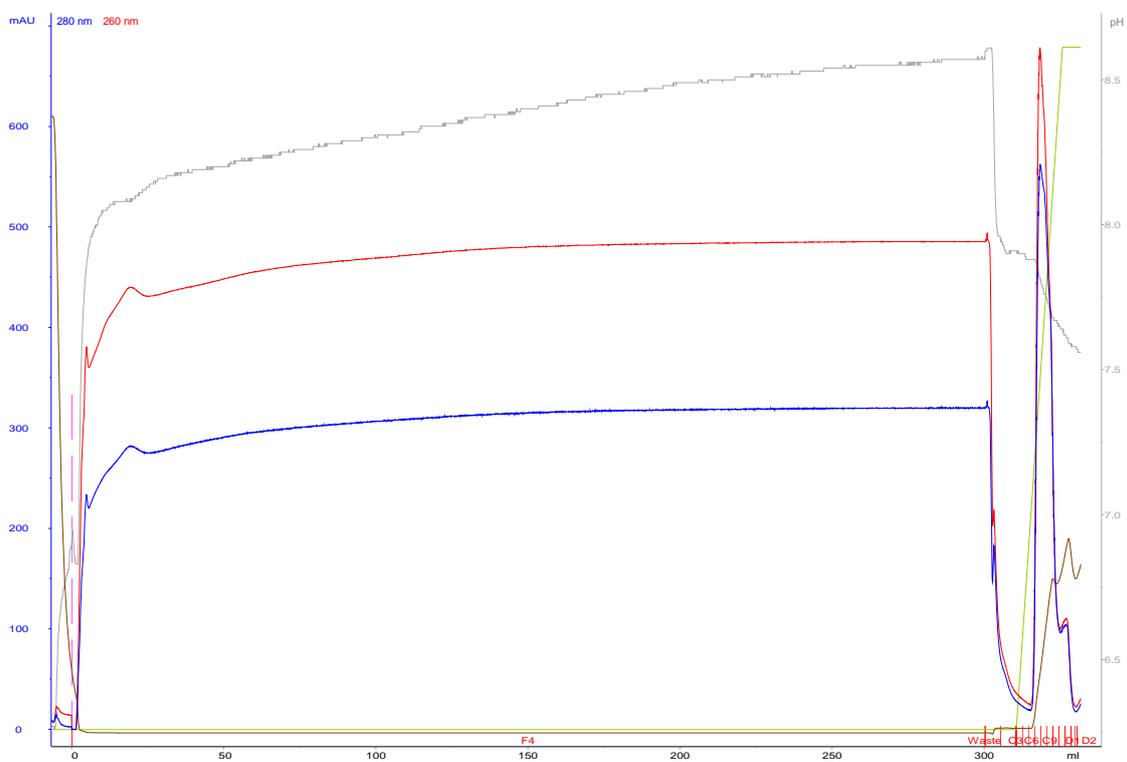


Abbildung 26: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L002; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-1 M NaCl; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; pH 6,5; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

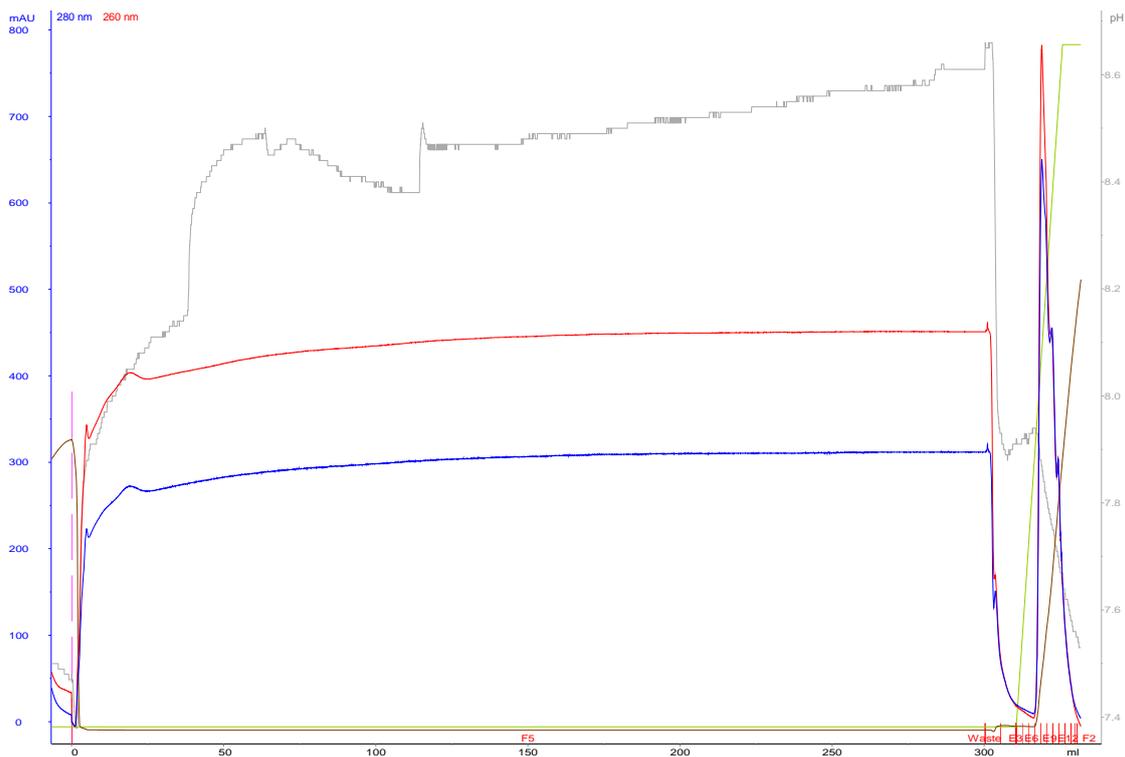
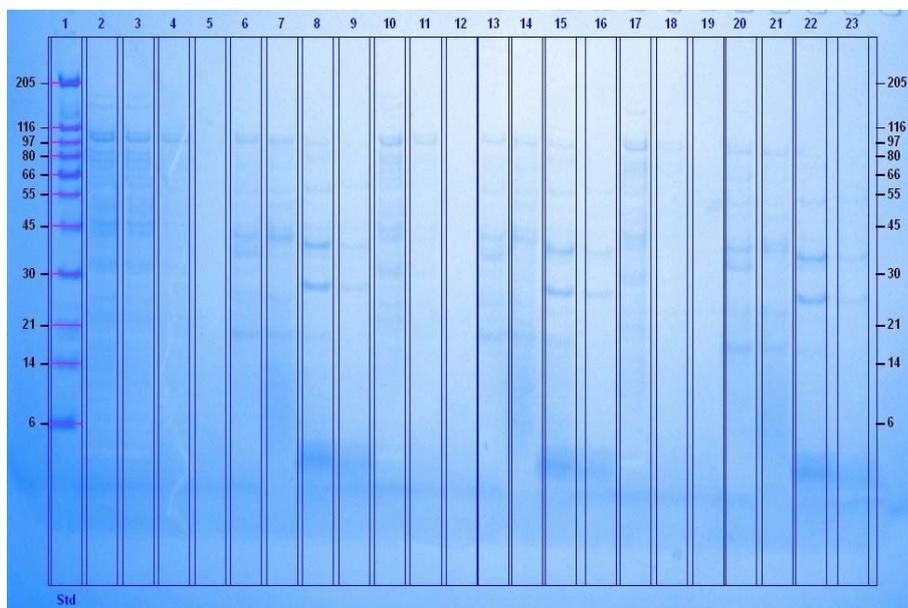


Abbildung 27: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L003; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-1 M NaCl; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; pH 7; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt



- Spur 1:** Marker P-6649
- Spur 2:** Load
- Spur 3:** B000 A2 S001 L004; FT
- Spur 4:** Wash A1
- Spur 5:** Elute A6
- Spur 6:** Elute A7
- Spur 7:** Elute A8
- Spur 8:** Elute A9
- Spur 9:** Elute A10

---

- Spur 10:** B000 A2 S001 L005; FT
- Spur 11:** Wash C1
- Spur 12:** Elute C6
- Spur 13:** Elute C7
- Spur 14:** Elute C8
- Spur 15:** Elute C9
- Spur 16:** Elute C10

---

- Spur 17:** B000 A2 S001 L006; FT
- Spur 18:** Wash E1
- Spur 19:** Elute E6
- Spur 20:** Elute E7
- Spur 21:** Elute E8
- Spur 22:** Elute E9
- Spur 23:** Elute E10

Abbildung 28: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; pH-Scouting; B000 A2 S001 L004-L006; pH 7,5, pH 8, pH 8,5

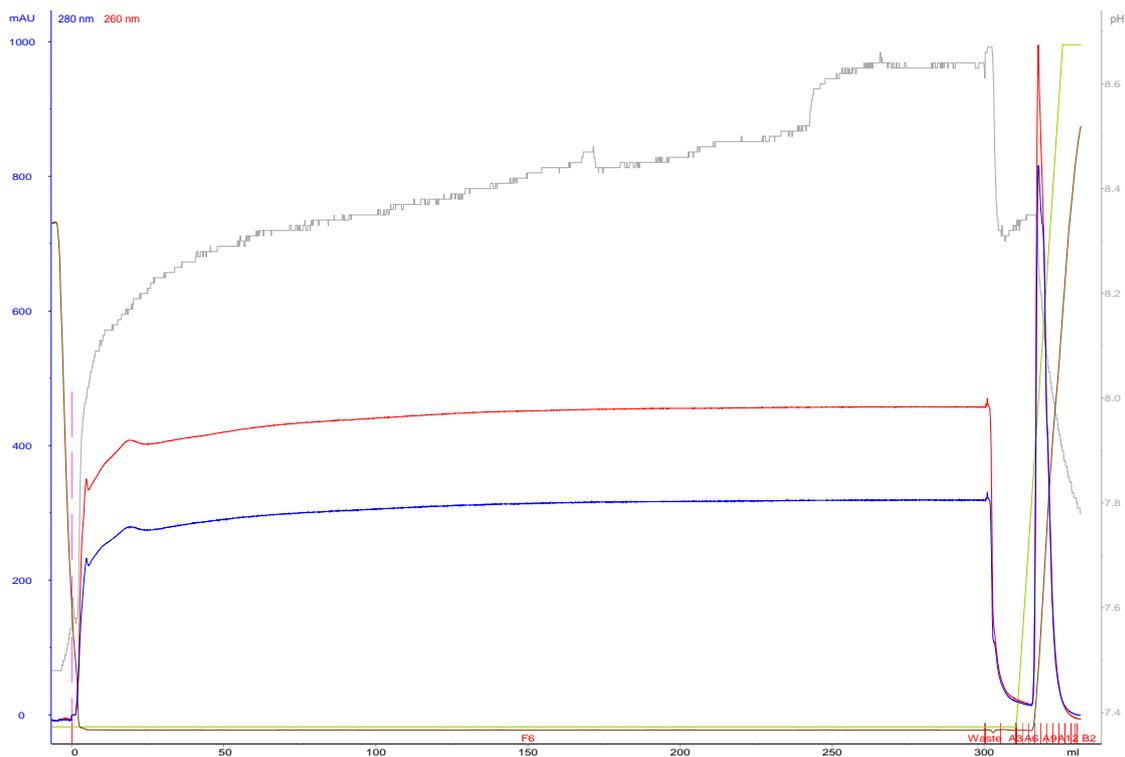


Abbildung 29: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L004; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-1 M NaCl; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; pH 7,5; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

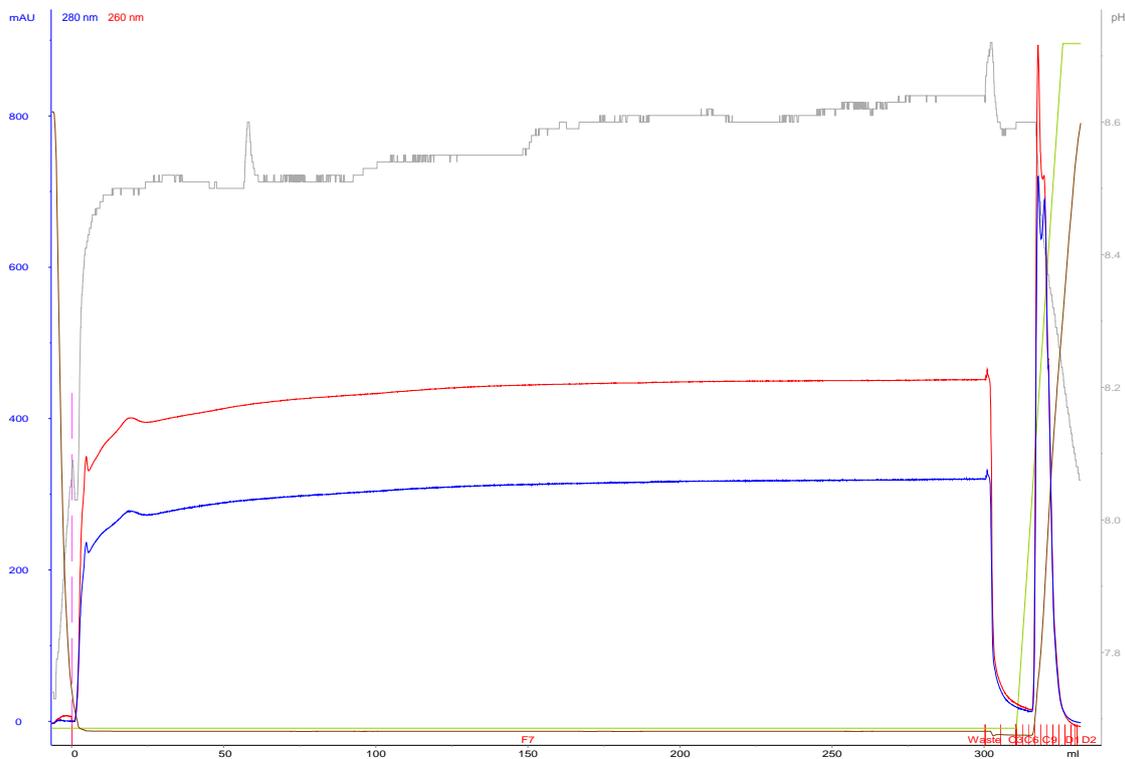


Abbildung 30: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L005; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-1 M NaCl; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; pH 8; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

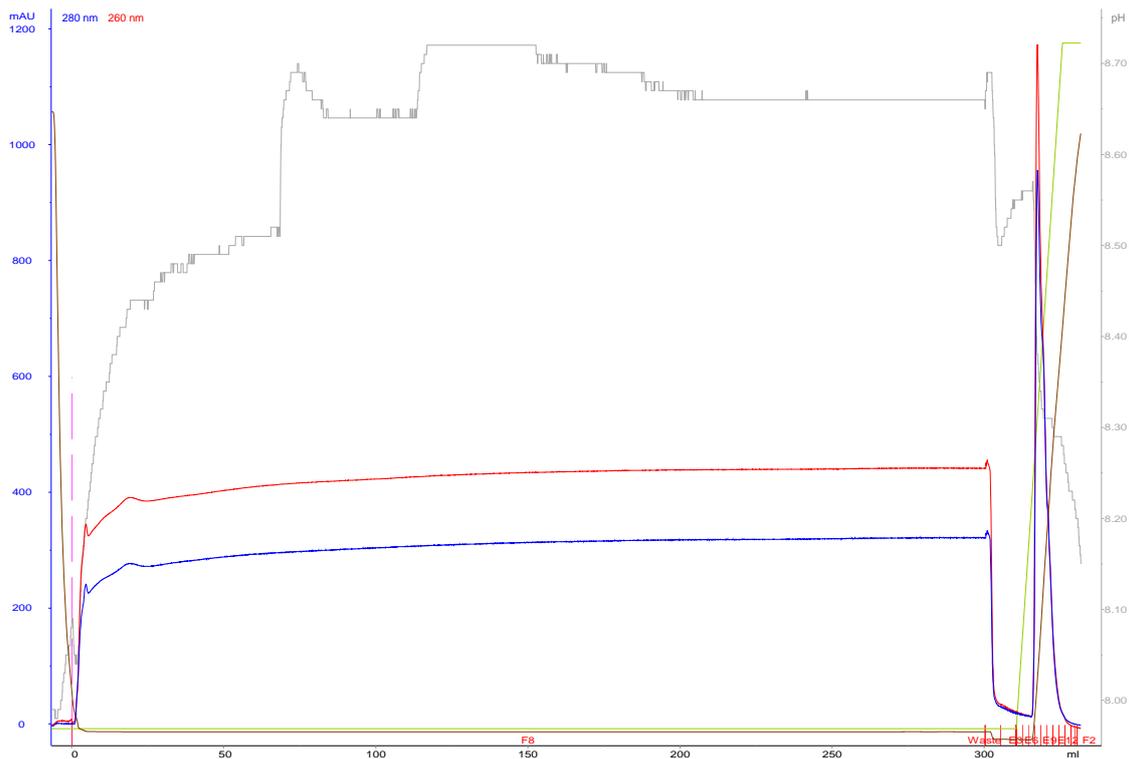
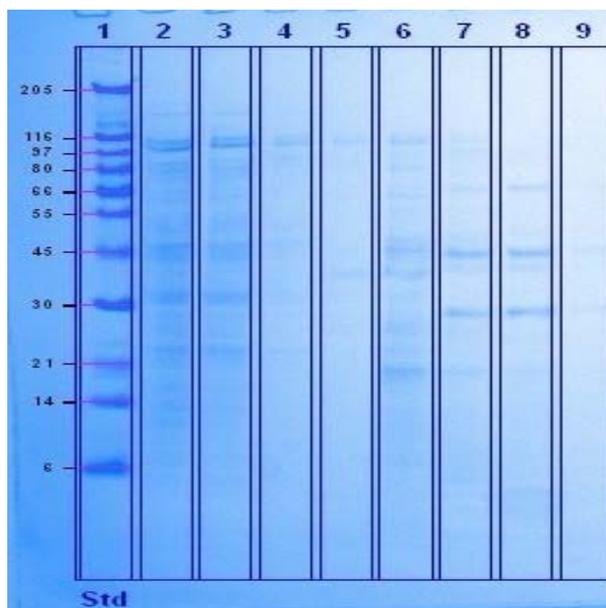


Abbildung 31: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L006; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-1 M NaCl; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; pH 8,5; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt



- Spur 1: Marker P-6649
- Spur 2: Load
- Spur 3: B000 A2 S001 L007; FT
- Spur 4: Wash G1
- Spur 5: Elute G6
- Spur 6: Elute G7
- Spur 7: Elute G8
- Spur 8: Elute G9
- Spur 9: Elute G10

Abbildung 32: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; pH-Scouting; B000 A2 S001 L007; pH 9

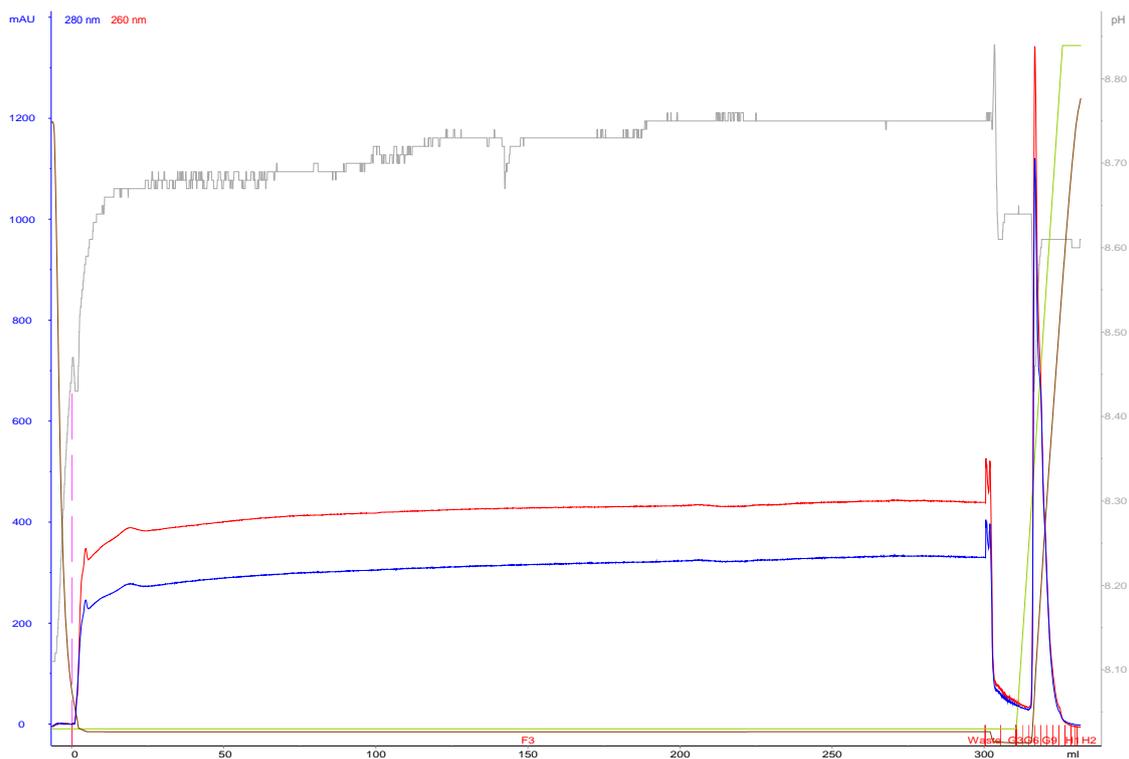


Abbildung 33: Chromatogramm; pH Scouting; B000 A2 S001 L007; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-1 M NaCl; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 1mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; pH 9; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

#### IV.e Resin Scouting

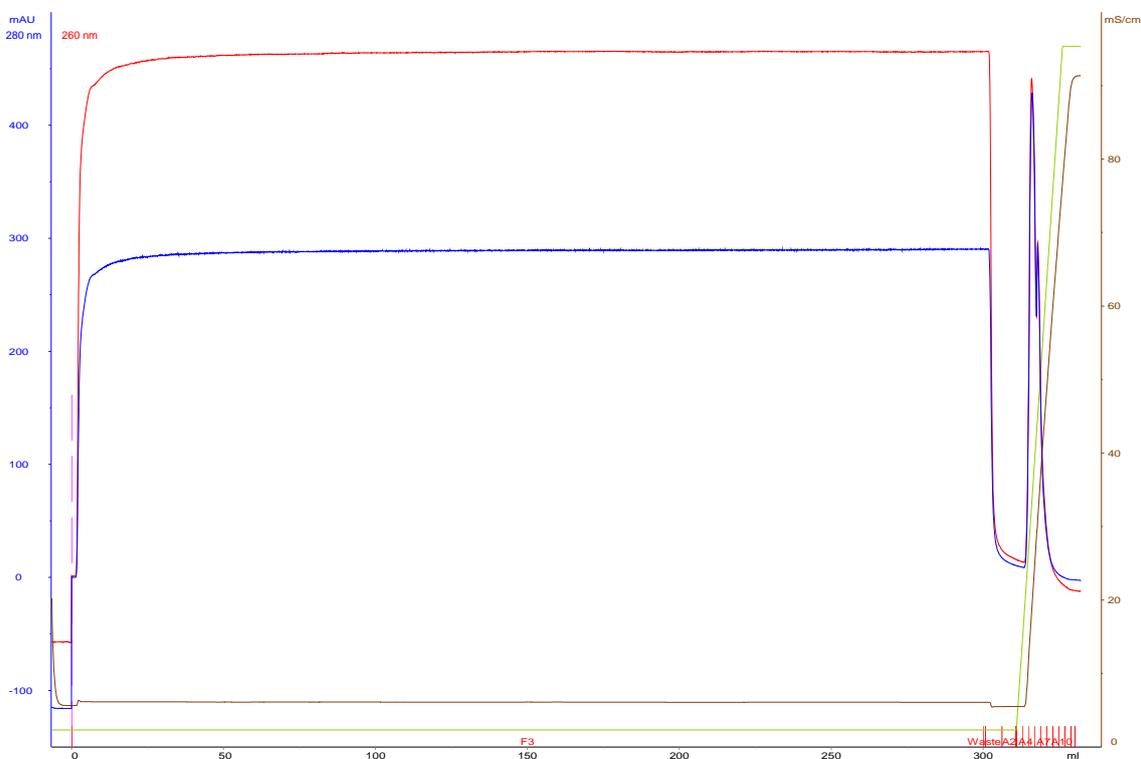


Abbildung 34: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L001; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

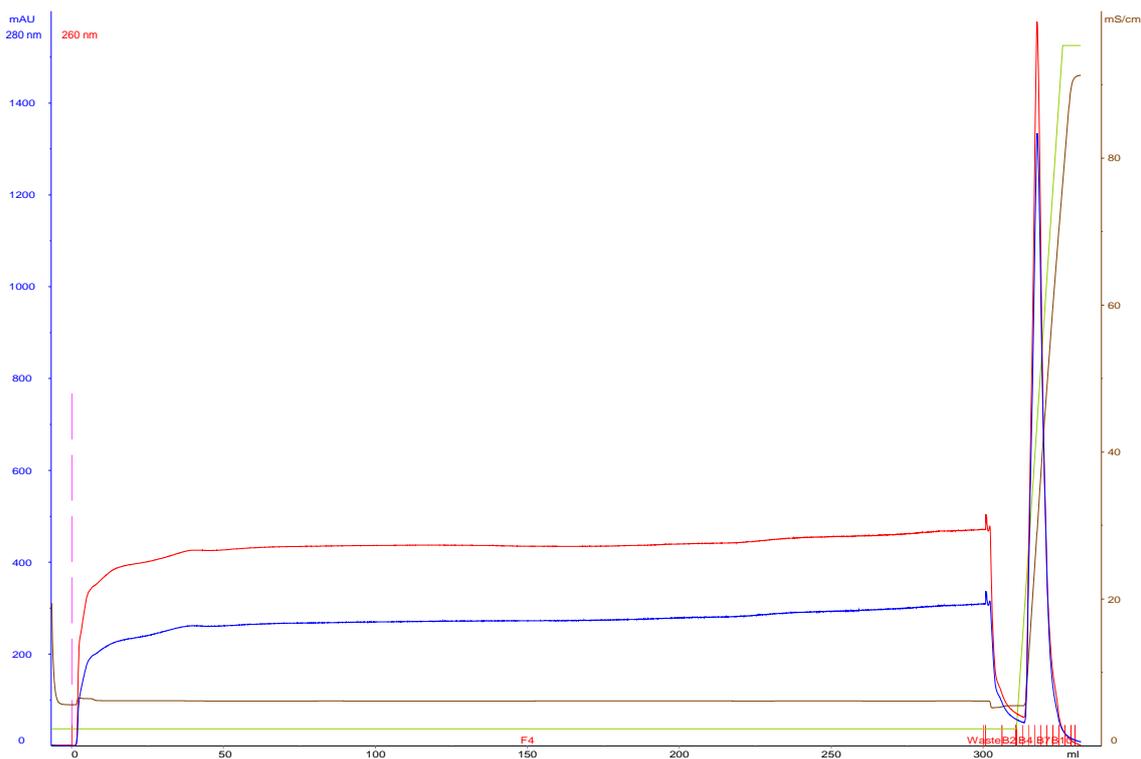


Abbildung 35: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L002; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Q Sepharose XL; h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

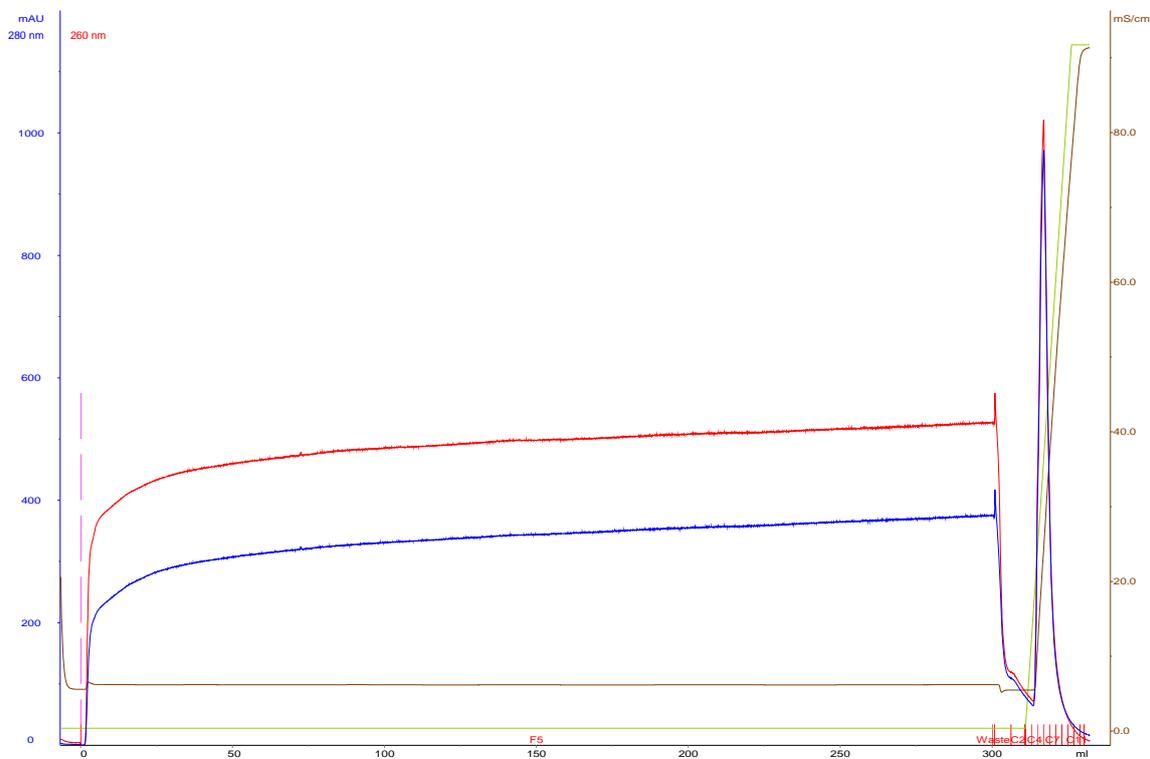
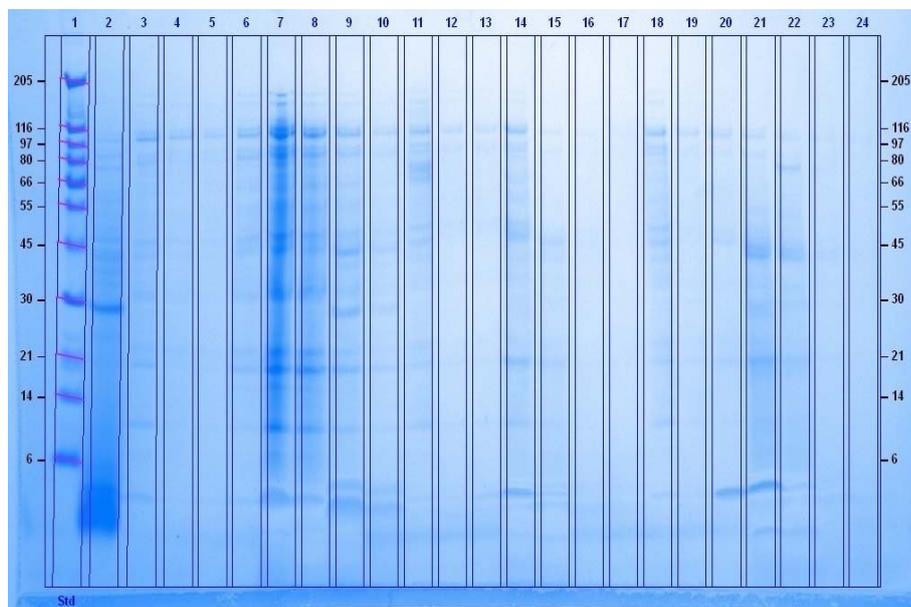


Abbildung 36: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L003; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; UNOsphere Q; h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt



- Spur 1:** Marker P-6649
- Spur 2:** Load unverdünnt
- Spur 3:** Load verdünnt
- Spur 4:** B000 A2 S002 L004, FT
- Spur 5:** Wash D1
- Spur 6:** Elute D4
- Spur 7:** Elute D5
- Spur 8:** Elute D6
- Spur 9:** Elute D7
- Spur 10:** Elute D8

---

- Spur 11:** B000 A2 S002 L005, FT
- Spur 12:** Wash E1
- Spur 13:** Elute E4
- Spur 14:** Elute E5
- Spur 15:** Elute E6
- Spur 16:** Elute E7
- Spur 17:** Elute E8

---

- Spur 18:** B000 A2 S002 L006, FT
- Spur 19:** Wash F1
- Spur 20:** Elute F4
- Spur 21:** Elute F5
- Spur 22:** Elute F6
- Spur 23:** Elute F7
- Spur 24:** Elute F8

Abbildung 37: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S002 L004-L006; POROS 50 HQ, DEAE Sepharose FF, Toyopearl Q 650M

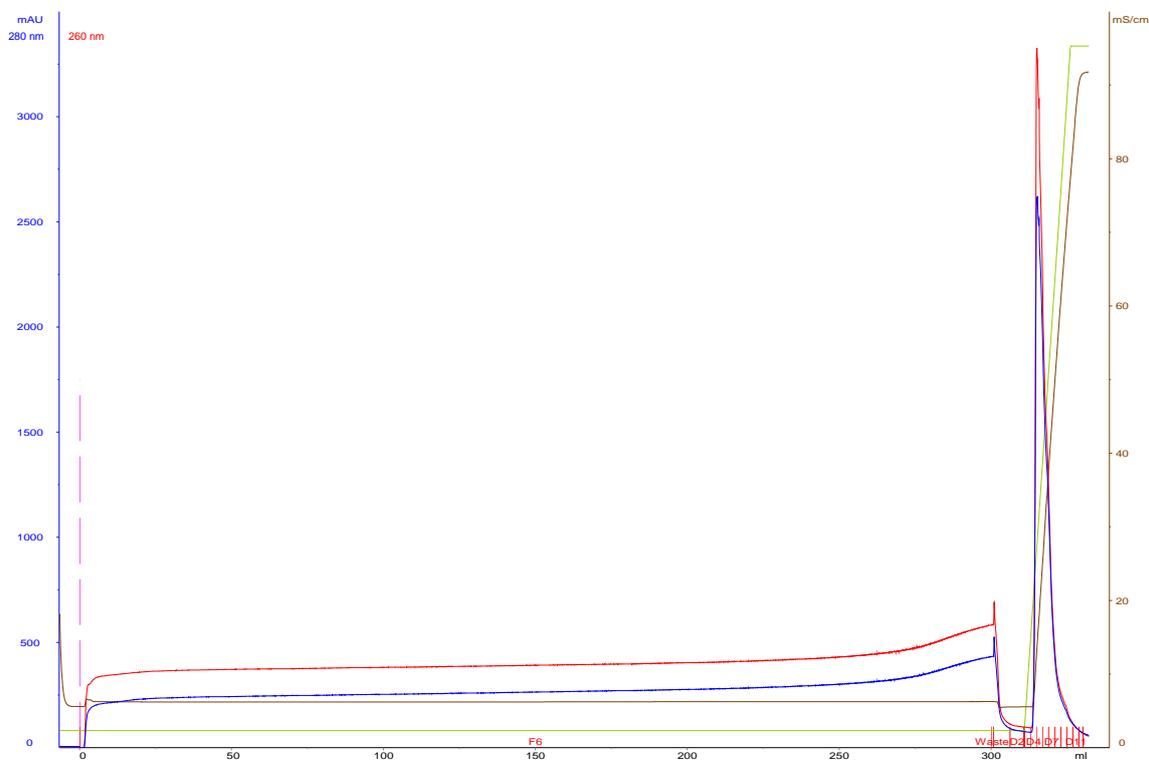


Abbildung 38: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L004; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Poros 50 HQ; h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

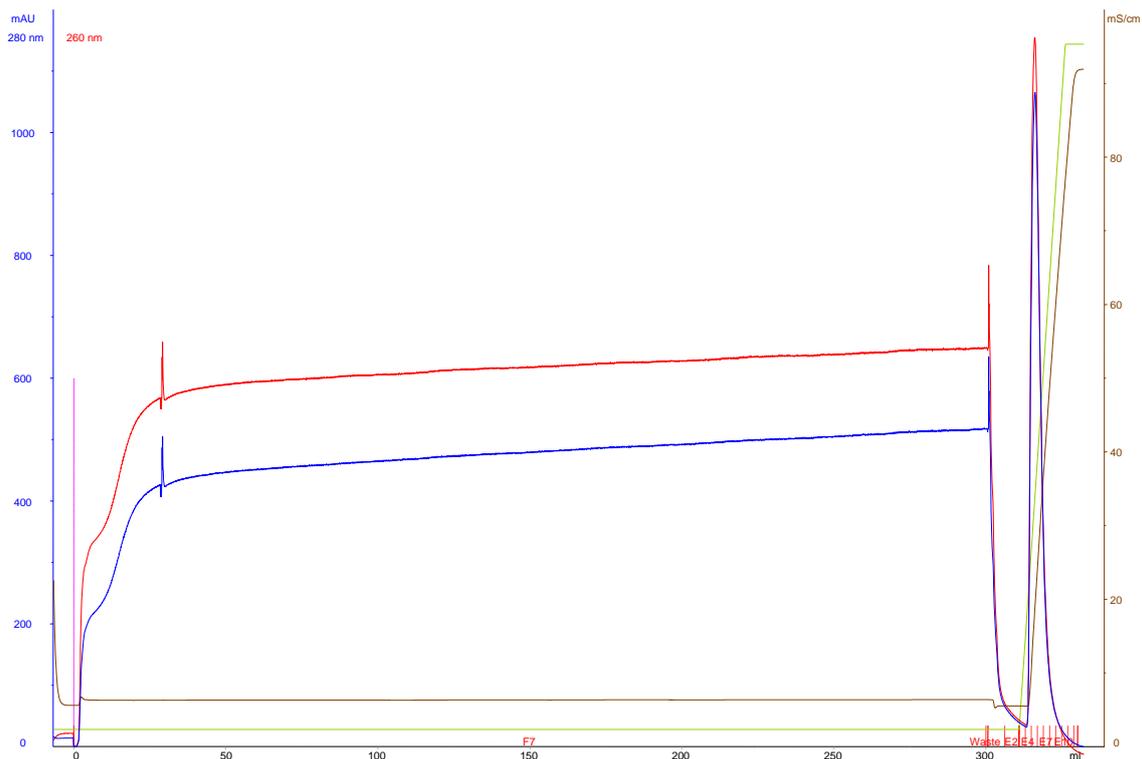


Abbildung 39: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L005; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; DEAE Sepharose FF; h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

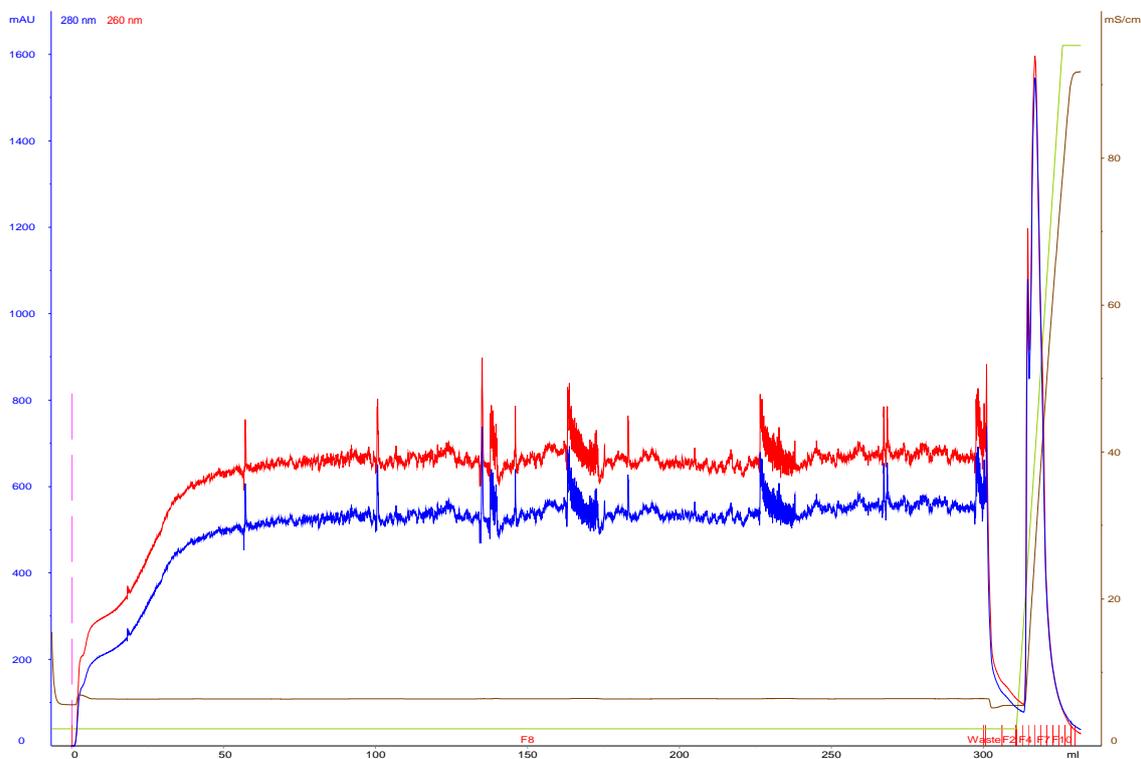


Abbildung 40: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L006; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Toyopearl Q 650M; h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

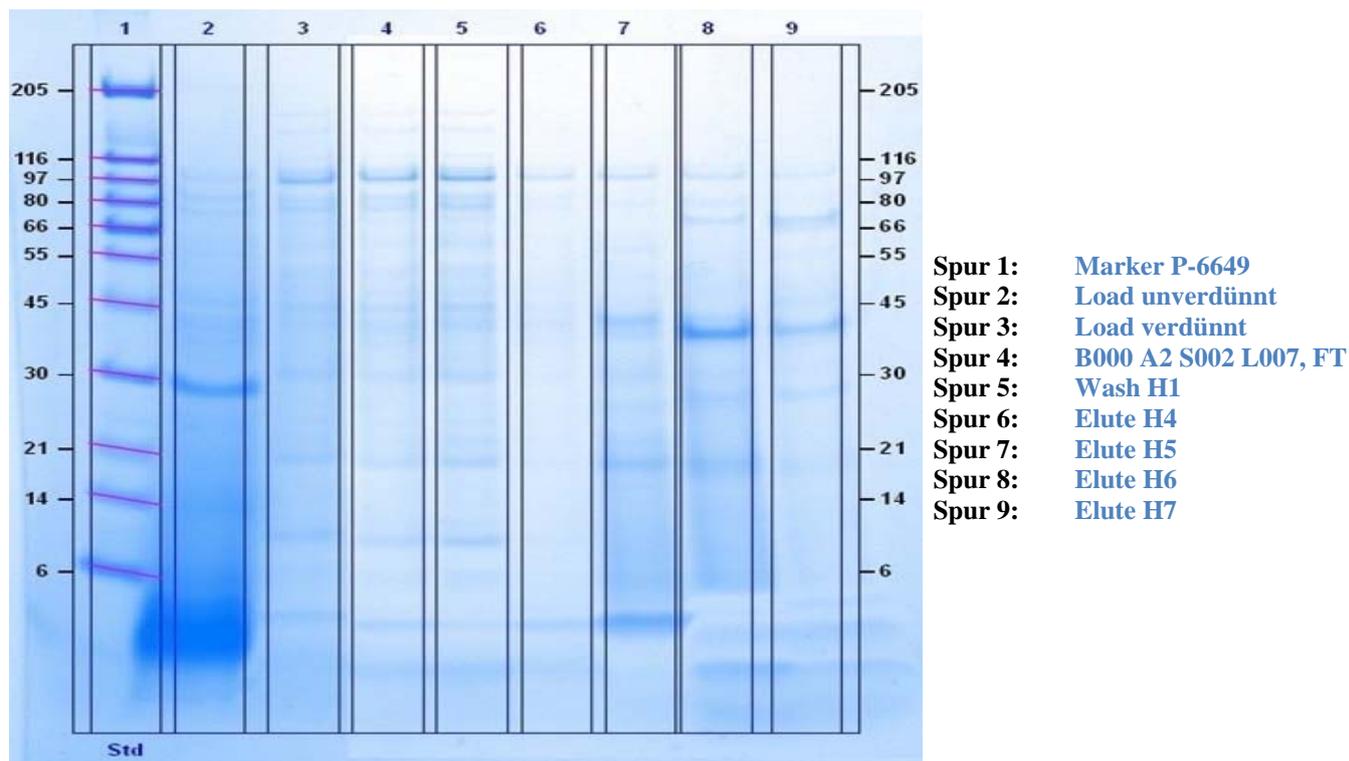


Abbildung 41: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S002 L007; Fractogel EMD TMAE Hicap (M)

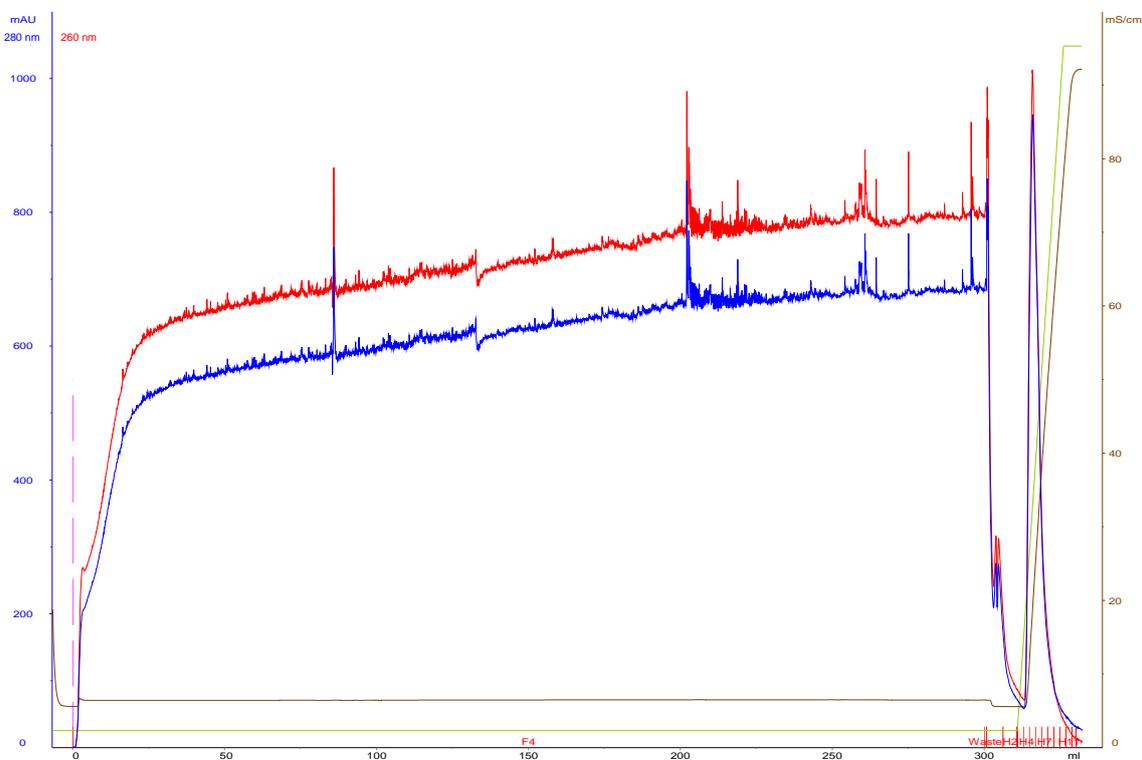


Abbildung 42: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S002 L007; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

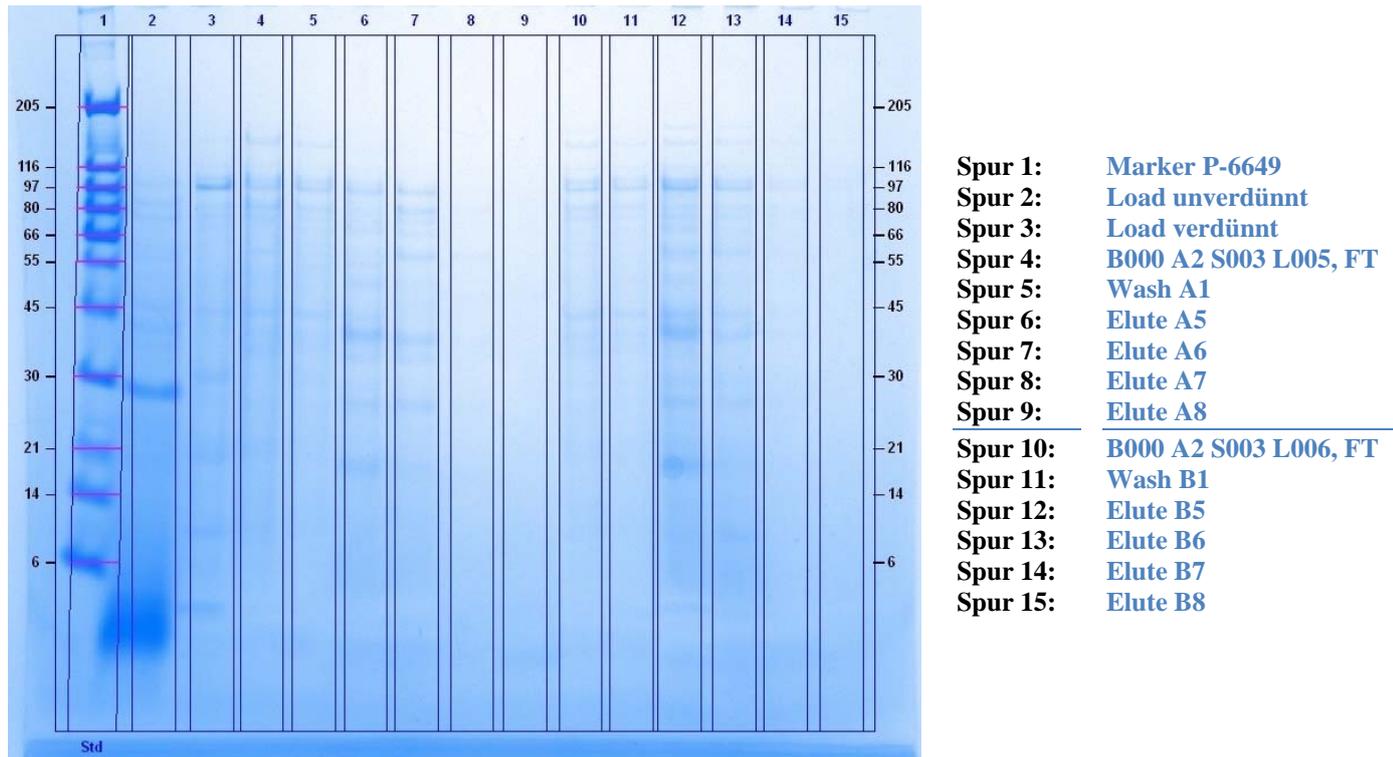


Abbildung 43: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S003 L005-L006; DEAE Sepharose FF, Toyopearl Super Q 650M

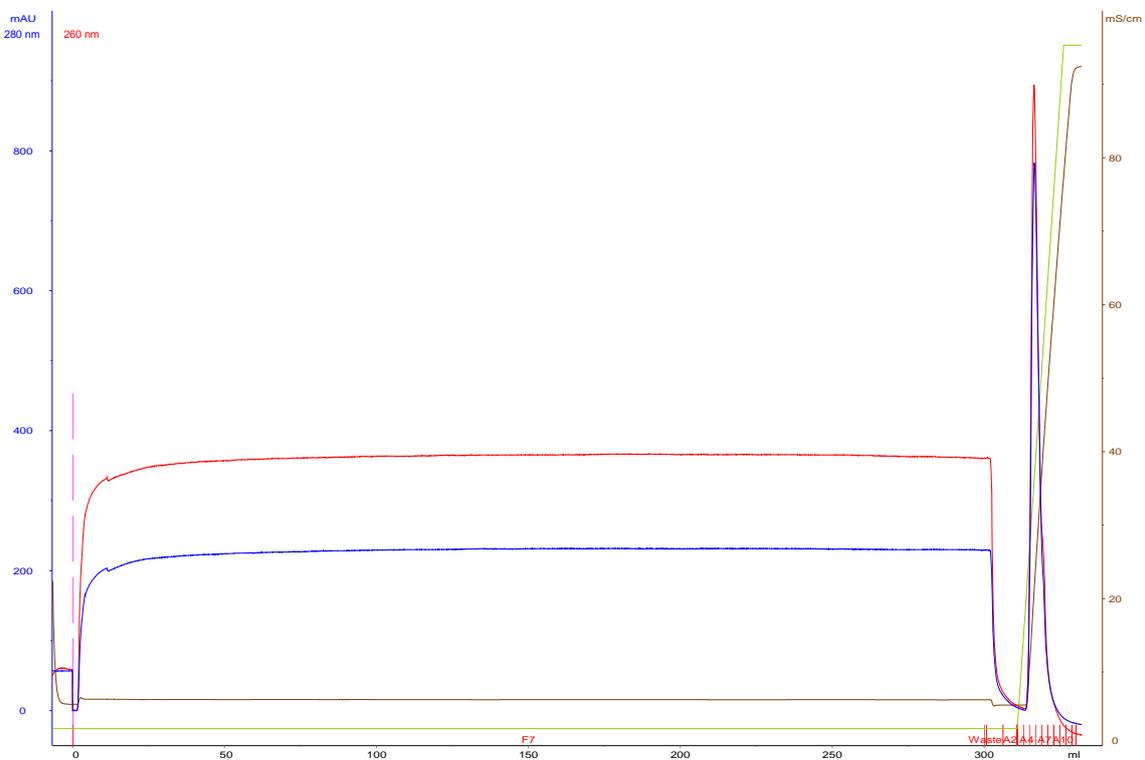


Abbildung 44: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S003 L005; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; DEAE Sepharose FF; h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

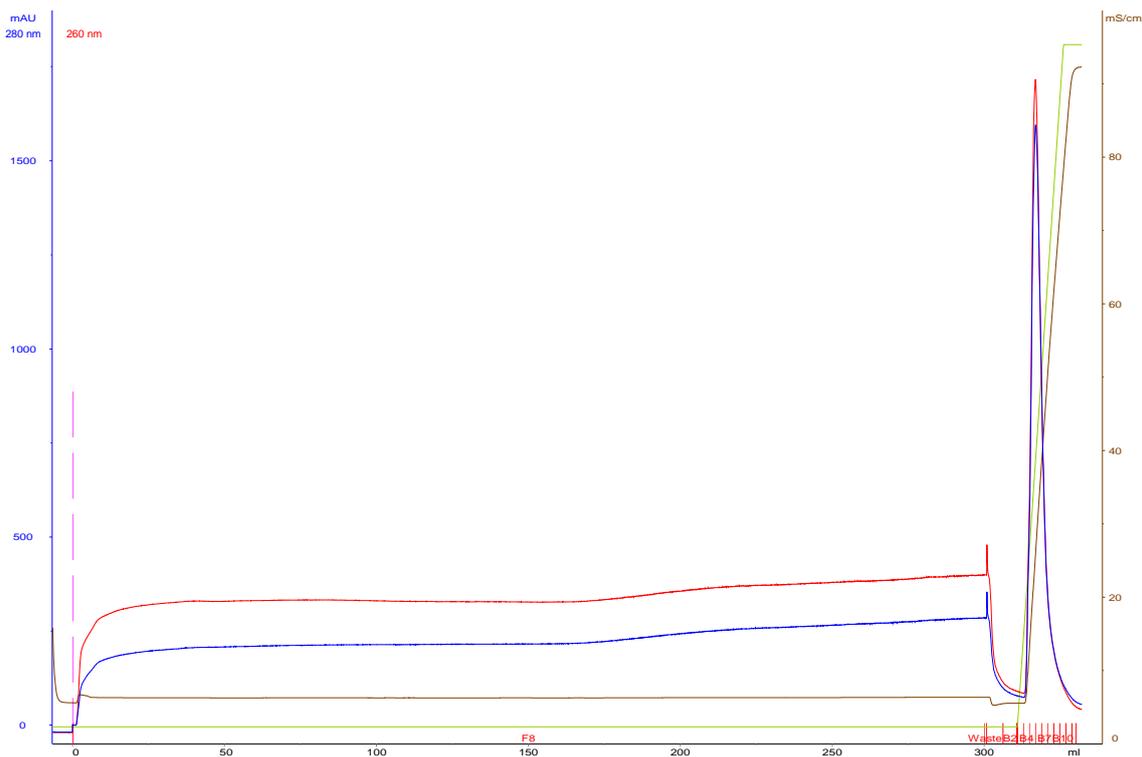
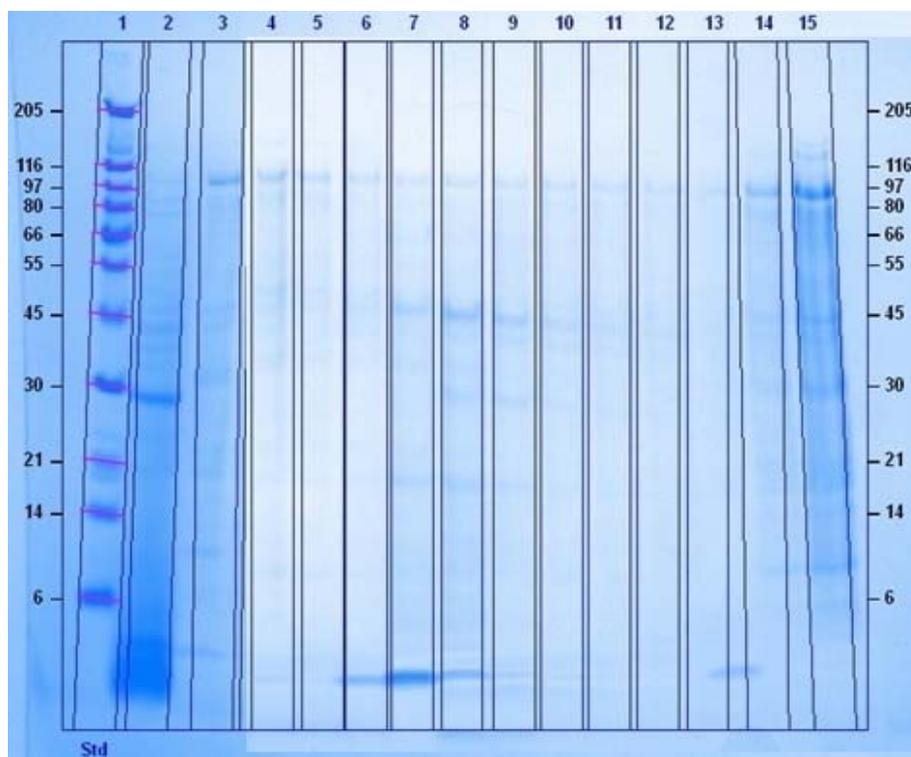


Abbildung 45: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S003 L006; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Toyopearl Super Q 650M; h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt



- Spur 1: Marker P-6649
- Spur 2: Load unverdünnt
- Spur 3: Load verdünnt
- Spur 4: B000 A2 S003 L007, FT
- Spur 5: Wash D1
- Spur 6: Elute D4
- Spur 7: Elute D5
- Spur 8: Elute D6
- Spur 9: Elute D7
- Spur 10: Elute D8
- Spur 11: Elute D9
- Spur 12: Elute D10
- Spur 13: Überstand
- Spur 14: Pellet resuspendiert
- Spur 15: Pellet resus 10-fach

Abbildung 46: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S003 L007; Fractogel EMD TMAE Hicap (M)

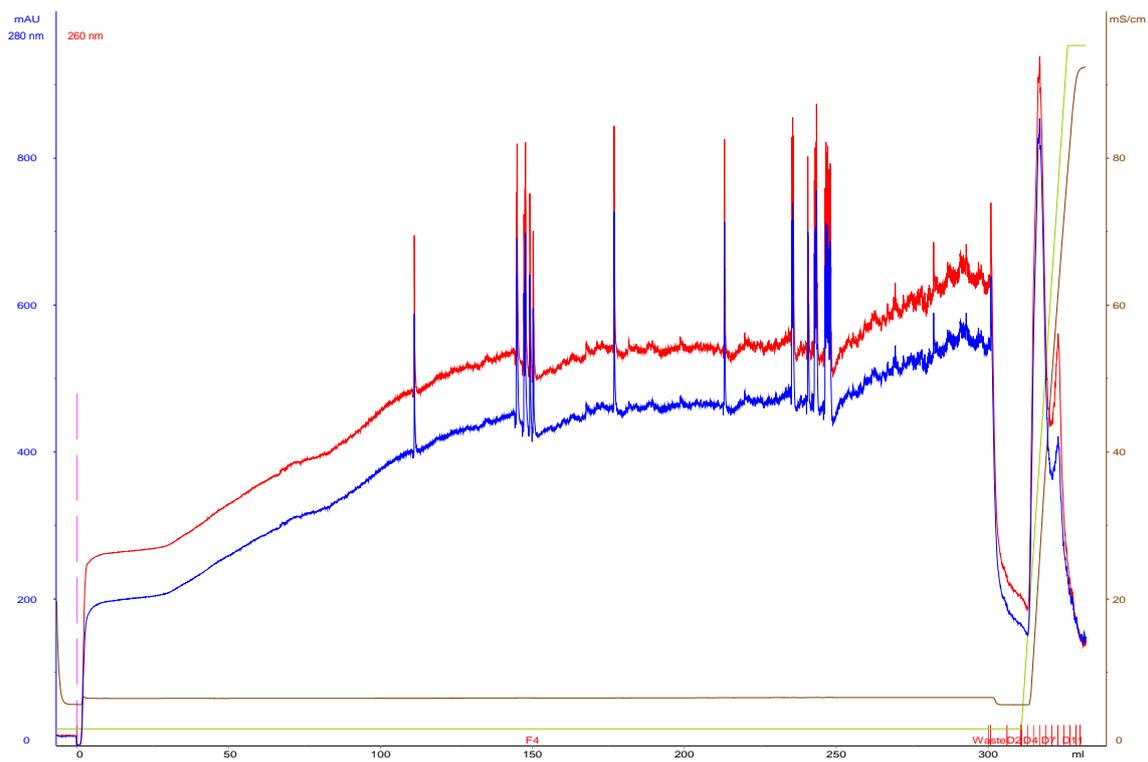


Abbildung 47: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S003 L007; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Fractogel EMD TMAE Hicap (M); h=1,96cm d=0,82cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

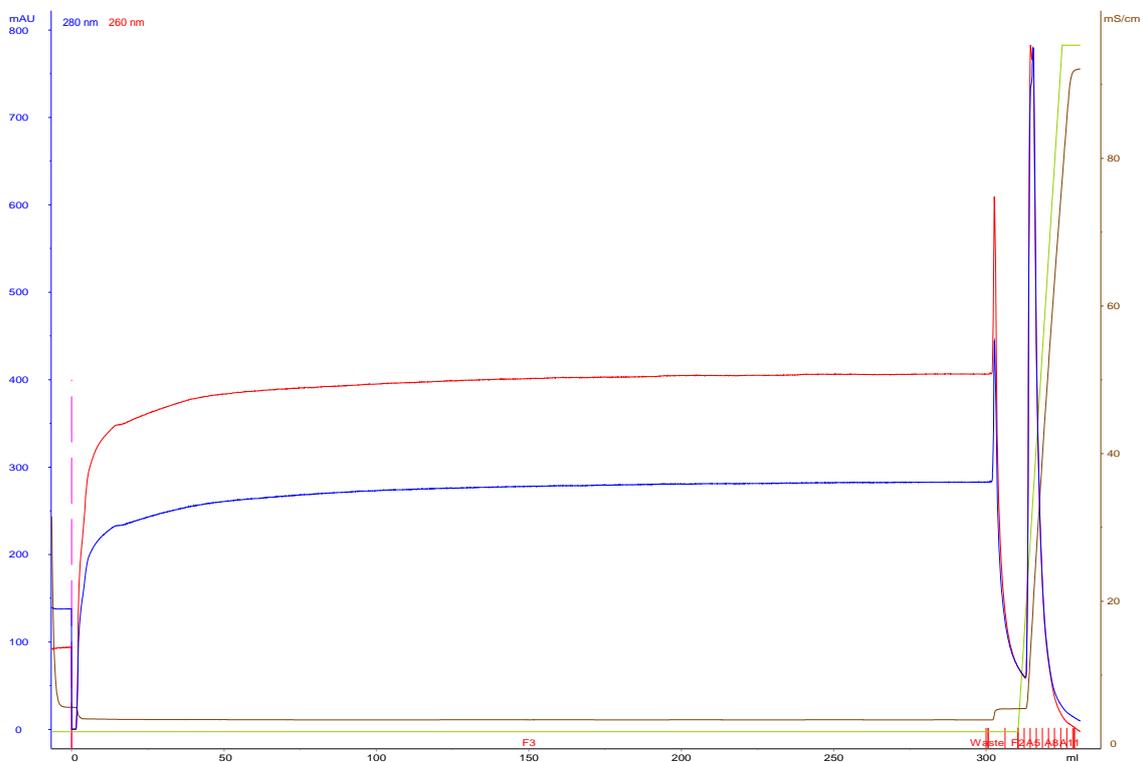


Abbildung 48: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S004 L001; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Toyopearl DEAE 650 M; h=3cm d=0,64cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

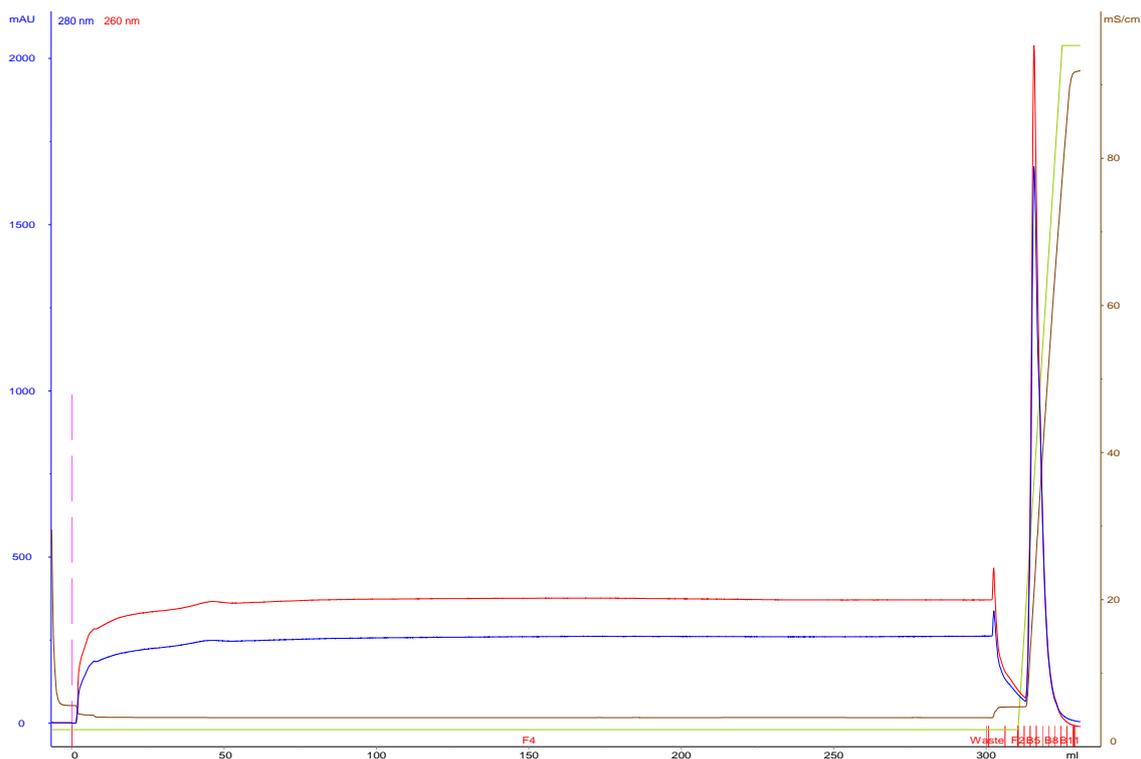
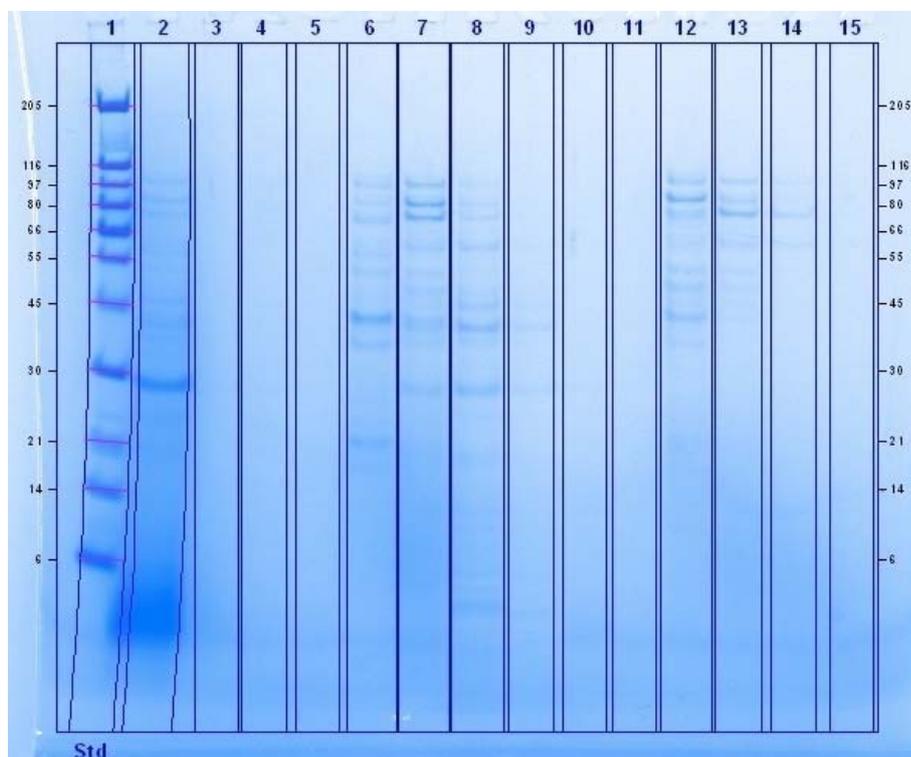


Abbildung 49: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S004 L002; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Toyopearl Gigacap Q 650 M; h=3cm d=0,64cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt



- Spur 1: Marker P-6649
- Spur 2: Load unverdünnt
- Spur 3: Load verdünnt
- Spur 4: B000 A2 S005 L001, FT
- Spur 5: Wash A1
- Spur 6: Elute A5
- Spur 7: Elute A6
- Spur 8: Elute A7
- Spur 9: Elute A8
- Spur 10: B000 A2 S005 L002, FT
- Spur 11: Wash B1
- Spur 12: Elute B6
- Spur 13: Elute B7
- Spur 14: Elute B8
- Spur 15: Elute B9

Abbildung 50: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung; Resin-Scouting; B000 A2 S005 L001-L002; Toyopearl QAE 550C, Toyopearl Q 600C AR

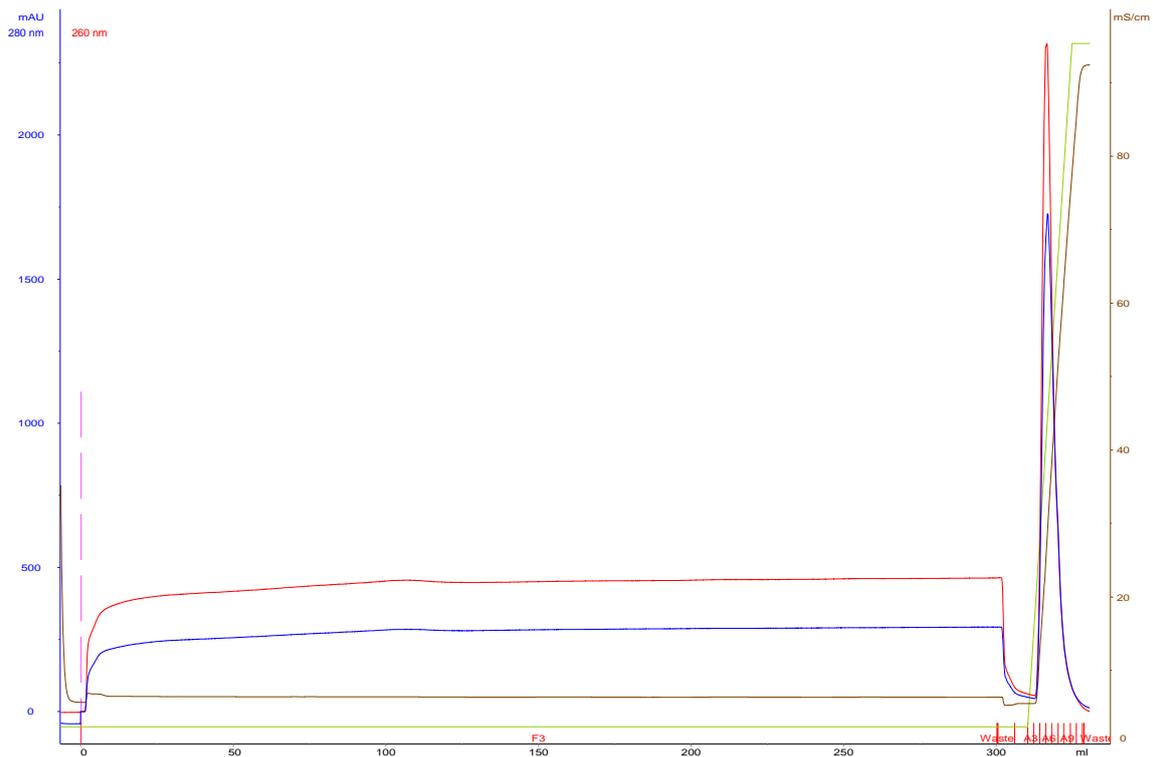


Abbildung 51: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S005 L001; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Toyopearl QAE 550C; h=3cm d=0,64cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

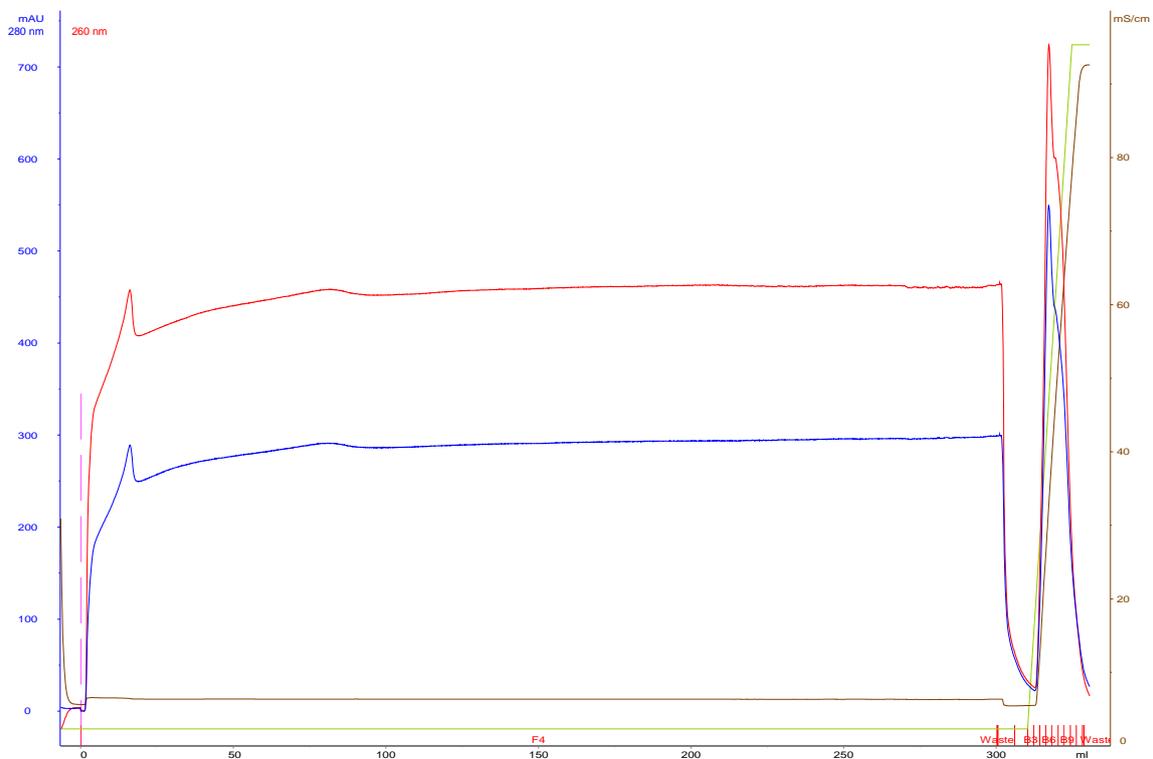


Abbildung 52: Chromatogramm; Resin Scouting; B000 A2 S005 L002; Salzgradientenelution des Zielproteins 0-100%; AX-Puffer-A3 und B3; Flussrate 0,5 mL/min; Injektionsflussrate 0,5 mL/min; Toyopearl Q 600C AR; h=3cm d=0,64cm V=1mL; 1:30 mit AX-Puffer-A3 verdünnt

#### IV.f Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich vorliegende Arbeit eigenständig, ohne fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Wörtlich oder dem Sinn gemäß aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter der Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Stephan Weyand

Hamburg, den 16. Februar 2012