



Fakultät Life Sciences

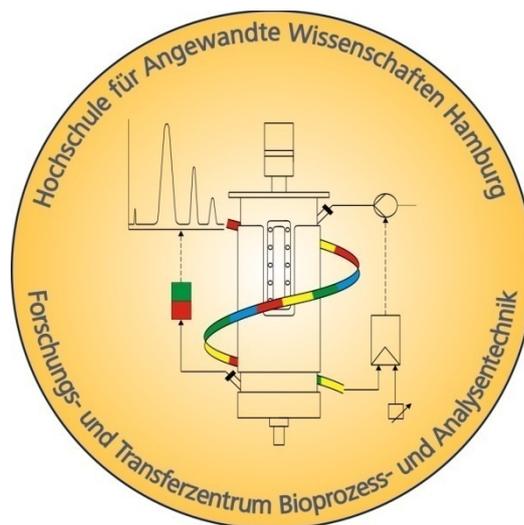
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

*Hamburg University of Applied Sciences*

## **Bachelorarbeit**

im Studiengang Biotechnologie

### **Entwicklung einer Aufbereitungsmethode guanidinhaltiger Prozessproben für deren Darstellung in der SDS-PAGE**



Hannah Katrin Thißen

14. Juli 2016

1. Gutachter/in

Prof. Dr. Gesine Cornelissen  
(HAW Hamburg)

2. Gutachter/in

Prof. Dr. Birger Anspach  
(HAW Hamburg)

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel „Entwicklung einer Aufbereitungsmethode guanidinhaltiger Prozessproben für deren Darstellung in der SDS-PAGE“ ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hannah Katrin Thißen

Hamburg, den 14. Juli 2016

## **Danksagung**

Zunächst bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Birger Anspach bedanke ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt Janet Hirsch, die mich bei der Durchführung und Erstellung der Arbeit hervorragend unterstützt hat und immer geduldig alle Fragen beantwortet hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Eltern für die moralische Unterstützung und die Möglichkeit zu einem Studium.

Ein Dank gilt auch meinem Freund Steffen, der mir während der Erstellung dieser Arbeit immer zur Seite stand.

**Inhalt**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Fragestellung / Zielsetzung .....	1
1.2	Forschungslücke .....	2
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b> .....	<b>2</b>
2.1	Denguevirus und Denguefieber .....	2
2.2	Zielprotein .....	4
2.3	Downstreamprozess .....	4
2.4	Fällung von Proteinen .....	6
2.4.1	Aussalzen .....	7
2.4.2	Fällung mit organischen Lösungsmitteln .....	9
2.4.3	Isoelektrische Präzipitation .....	11
2.4.4	Methodenauswahl .....	11
2.5	SDS-PAGE .....	12
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1	Probenvorbereitung .....	15
3.2	Fällungsmethoden .....	16
3.2.1	Fällung A mit Chloroform und Methanol .....	16
3.2.2	Fällung B mit Chloroform und Methanol .....	16
3.2.3	Fällung C mit Aceton .....	17
3.2.4	Fällung D mit TCA/Aceton .....	17
3.2.5	Fällung E mit Aceton .....	17
3.2.6	Fällung F mit Ethanol .....	17
3.2.7	Fällung G mit TCA/Aceton .....	17
3.2.8	Fällung H mit NaDOC/TCA .....	18
3.2.9	Fällung I mit Ammoniumsulfat .....	18
3.3	Methode J: Filtration .....	18
3.4	Bewertungsschema .....	19

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>22</b>
4.1	Bewertung der Geloptik .....	22
4.2	Bewertung der Methoden .....	26
4.2.1	Fällung A .....	26
4.2.2	Fällung B .....	27
4.2.3	Fällung C .....	28
4.2.4	Fällung D .....	29
4.2.5	Fällung E .....	30
4.2.6	Fällung F .....	31
4.2.7	Fällung G .....	32
4.2.8	Fällung H .....	33
4.2.9	Fällung I .....	34
4.2.10	Methode J .....	35
4.3	Vergleich der Methoden .....	36
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>39</b>
<b>I</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>III</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>IV</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Fragestellung / Zielsetzung

Denguefieber und Dengue Hämorrhagisches Fieber (DHF) gehören zu den schlimmsten tropischen Krankheiten im 21. Jahrhundert [Gubler 2002]. Die demographische Entwicklung, Urbanisierung, das Bevölkerungswachstum und der globalisierte Handel und Verkehr sind für eine zunehmende Verbreitung des Denguevirus und des Vektors *Aedes aegypti* in tropischen und subtropischen Regionen der Erde verantwortlich. Eine Infektion bedeutet nicht nur einen Einschnitt in der persönlichen Biographie, sondern belastet die Gesundheitssysteme und verursacht einen nicht unerheblichen wirtschaftlichen Schaden [Gubler 2002].

Ein wirksamer, sicherer Impfstoff gegen alle Serotypen des Denguevirus ist ein wichtiger Meilenstein zur Verbesserung der Gesundheit und der Lebensbedingungen von Menschen weltweit. Dazu können virusähnliche Partikel (VLPs) eingesetzt werden.

Die Hefe *Pichia pastoris* wird im Bioreaktor kultiviert und produziert dabei das Hüllprotein des Denguevirus Serotyp 2. Das Protein bildet virusähnliche Partikel, die zur Immunisierung gegen das Denguevirus eingesetzt werden können [Mani et al. 2013]. Folglich besteht Hoffnung, die DVE-2-VLPs als Impfstoff einsetzen zu können. Da das Zielprotein von der produzierenden Hefe nicht sekretiert wird, ist ein umfangreicher Downstreamprozess zur Reinigung des Proteins notwendig. Das designte Zielprotein trägt ein His-Tag, weshalb es mit Hilfe einer Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Vor der Chromatographie muss das Zielprotein denaturiert werden, denn die sonst enthaltenen VLPs erschweren eine Aufreinigung mittels Chromatographie erheblich. Zudem wird durch die Öffnung der VLPs garantiert, dass sich keine Fremdproteine in ihnen befinden. Die Reinheit des Zielproteins wird erhöht. Für die Denaturierung der Zielproteine wird eine hohe Konzentration von Guanidin zugesetzt. Guanidin hat die Eigenschaft, Proteine reversibel zu denaturieren, sodass bei Entfernung des Guanidins eine Renaturierung erfolgt.

Die Bewertung des Downstreamprozesses soll mittels SDS-PAGE erfolgen, weil dies eine günstige, vergleichsweise schnelle und universell anwendbare Methode darstellt. Dabei ergibt sich aber das Problem, dass Guanidin mit SDS ausfällt. Dies macht eine Probenvorbereitung vor der Untersuchung der Prozessproben in der SDS-PAGE zwingend erforderlich.

Ziel der vorliegenden Bachelorarbeit war es, Aufbereitungsmethoden hinsichtlich ihrer Eignung für guanidinhaltige Prozessproben zu untersuchen und bezüglich ihrer Implementierbarkeit in den Downstreamprozess zu bewerten. Am Ende soll möglichst eine Methode formuliert werden, die optimal in den Prozess integriert werden kann und zudem eine sehr gute Bewertung des Prozesses ermöglicht.

## 1.2 Forschungslücke

Diese Arbeit bezieht ihre Berechtigung und Relevanz daraus, dass sie als essentieller Teil der Bewertung des Downstreamprozesses zu sehen ist, mit dem das DVE-2-Protein aufgereinigt wird. Das Zielprotein bzw. die daraus resultierenden VLPs wecken große Erwartungen, als Impfstoff gegen das Denguevirus serotyp 2 zu immunisieren [Mani et al. 2013].

## 2 Grundlagen

### 2.1 Denguevirus und Denguefieber

Denguefieber ist eine Infektionskrankheit, die durch die vier Serotypen des Denguevirus verursacht wird [Rigau-Pérez et al. 1998]. Die Viren gehören zur Familie der Flaviviren und werden durchnummeriert (DV 1 – 4) [Nayak et al. 2009]. Das Virus hat einen Durchmesser von ca. 50 nm und die genetische Information liegt in einem positiv orientierten RNA-Molekül mit einer Länge von 10,6 kb vor [Shang et al. 2012]. Das Genom codiert für ein Polyprotein, das zu sieben nicht strukturgebenden Proteinen prozessiert wird, sowie zu drei Strukturproteinen [Shang et al. 2012]. Die Strukturproteine sind zum einen das Capsidprotein (C) mit einer Größe von 114 Aminosäuren (AS). Dann das Prämembran- bzw. Membranprotein (prM, M) mit einer Größe von 166 bzw. 75 AS und das Hüllprotein (E) mit einer Größe von 495 AS [Shang et al. 2012]. Die drei Proteine sind an der Bildung und Reifung von neuen Viruspartikeln beteiligt [Shang et al. 2012].

Eine Infektion mit einem Serotypen verursacht eine lebenslange Immunität gegen das Virus, aber nicht gegen die anderen Typen [Rigau-Pérez et al. 1998]. Das Virus wird von verschiedenen Vektoren, wie den Mückenarten *Aedes aegypti*, *Ae albopictus* und *Ae polynesiensis* übertragen. Die Aufnahme des Virus durch die Mücke erfolgt, wenn das Tier einen infizierten Menschen sticht. Eine vertikale Transmission ist aber auch möglich. Bis zum Dezember 2015 gab es weder einen Impfstoff, der gegen alle vier Serotypen immunisiert, noch eine kausale Therapie bei akuter Infektion.

Ein wichtiger Ansatzpunkt, um die Ausbreitung des Virus einzudämmen, ist die Bekämpfung des Vektors [Bhatt et al. 2013]. Im Dezember 2015 erhielt der erste Impfstoff, der gegen alle vier Serotypen immunisiert, in Mexiko, den Philippinen und Brasilien eine Zulassung (Dengvaxia<sup>®</sup> von Sanofi Pasteur, Paris, Frankreich). Dieser bedient sich des Gelbfieberimpfstoffs als Grundlage, bietet aber noch keinen umfassenden Schutz. Zudem wurde die Zulassung nur für die Anwendung an Personen zwischen 9 und 45 Jahren erteilt. Aufgrund dessen ist weiterer Forschungsaufwand erforderlich [Schwartz et al. 2015].

Das Denguevirus hat eine Inkubationszeit von vier bis sieben Tagen [Rigau-Pérez et al. 1998]. Danach zeigen sich Symptome, wie Fieber, Kopfschmerzen, Schmerzen hinter den Augen, Muskel- und Gelenkschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Hautausschlag. Eine sehr große Zahl an Infektionen verläuft, vor allem bei Kindern, symptomlos oder mit nur sehr gering ausgeprägten Symptomen. Eine ernstere Ausprägung von Dengue ist das Dengue Hämorrhagische Fieber. Dies ist ebenfalls eine akute, fiebrige Erkrankung mit kleineren oder größeren Blutungen, Thrombozytopenie (Thrombozytenmangel), Ödemen durch Plasmaverschiebungen, Pleuraergüssen, sowie eventuell Hypoalbuminämie oder Hypoproteinämie. Die Flüssigkeitsverschiebungen können zum hypovolämischen Schock führen. Wenn es dazu kommt, spricht man vom Dengue Schock Syndrom, welches mit einem Blutdruckabfall, anhaltenden Bauchschmerzen und Erbrechen, sowie einer Hypothermie einhergeht. In diesem Fall muss eine intensive Betreuung und Überwachung erfolgen, weil sich die Schocksymptomatik innerhalb weniger Stunden einstellen kann. Wenn es dazu kommt, ist eine intensive Flüssigkeitstherapie lebensrettend.

Eine Therapie bei Denguefieber und Dengue Hämorrhagischem Fieber ist bisher nicht kausal, sondern richtet sich nach den auftretenden Symptomen. So sind Flüssigkeits- (oral oder intravenös) und Schmerzmittelgabe hilfreich, sowie die Gabe von Antipyretika und Antiemetika.

Das Denguevirus ist hauptsächlich in tropischen und subtropischen Regionen der Erde zu finden. Im Jahr 2010 gab es weltweit ca. 96 Millionen symptomatische Infektionen [Bhatt et al. 2013]. 70 % davon traten in Asien auf, 14 % in Amerika (hauptsächlich in Brasilien und Mexiko), 16 % in Afrika und 0,2 % in Ozeanien. Zudem traten 2010 geschätzt 294 Millionen symptomarme oder -lose Infektionen weltweit auf [Bhatt et al. 2013]. Die zunehmende Verbreitung des Virus auf der Erde hat auch

ökonomisch eine große Bedeutung. So hat die 1981 in Kuba aufgetretene Epidemie beispielsweise geschätzt 103 Millionen US Dollar gekostet [Gubler 2002]. Diese Summe wurde für die medizinische Versorgung und Moskitobekämpfung veranschlagt. Der tatsächliche wirtschaftliche Schaden lässt sich kaum messen. Produktivitätseinbußen einer Volkswirtschaft, Fehltag bei der Arbeit bzw. in der Schule sowie ein Rückgang des Tourismus korrelieren häufig mit Dengueepidemien.

## 2.2 Zielprotein

Bei dem Protein, welches in *Pichia pastoris* produziert werden soll, handelt es sich um das Hüllprotein aus dem Denguevirus Serotyp 2. Das natürliche Protein ist ein Glycoprotein, bestehend aus 495 Aminosäuren, die in drei Domänen organisiert sind [Mani et al. 2013]. Das rekombinante Protein besteht aus 444 AS und enthält ein His-6-Tag am C-Terminus. Der theoretische isoelektrische Punkt (pI) liegt bei 7,0 und das Molekulargewicht beträgt 49,173 kDa. Das Protein besitzt eine hydrophobe Domäne, ist ansonsten aber leicht hydrophil.

## 2.3 Downstreamprozess

Die Proteinsequenz für das Zielprotein wurde in die Hefe *Pichia pastoris* inkloniert. Diese wird im Bioreaktor kultiviert. Da die Hefe das Zielprotein nicht sekretiert, muss eine aufwendige Aufreinigung erfolgen. Abbildung 1 zeigt die Prozessschritte anhand eines Fließbildes. Im Bild sind die Namen der Proben rot eingetragen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

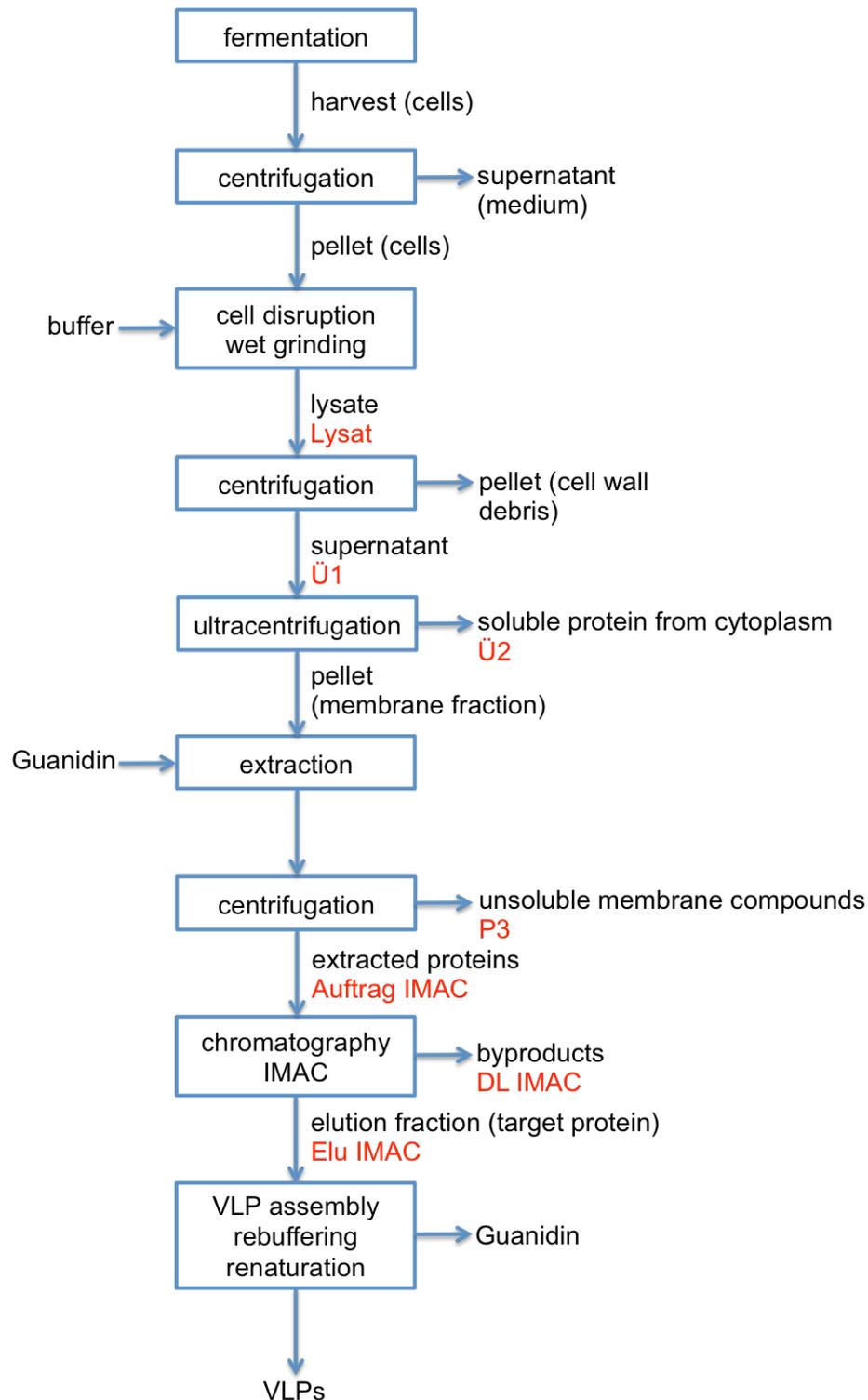


Abbildung 1: Downstreamprozess zur Aufreinigung des Zielproteins aus den Zellen der *Pichia pastoris*.

Nach der Kultivierung der Zellen im Bioreaktor folgt die Ernte der Zellen und eine Zentrifugation, bei der das Medium abgetrennt wird. Die Zellen werden unter Zugabe von Puffer mittels Nassvermahlung aufgeschlossen. Die Probe „Lysat“ stammt aus der Suspension, die man nach diesem Schritt erhält. Zur Abtrennung der Zellbestand-

teile erfolgt eine weitere Zentrifugation. Der Überstand enthält das Zielprotein und wird weiter bearbeitet. Nach diesem Schritt wird die Probe „Ü1“ entnommen. Danach wird erneut zentrifugiert, diesmal findet eine Ultrazentrifugation zur Abtrennung von löslichen Proteinen statt. Das Zielprotein befindet sich in der Membranfraktion. Vom Überstand dieser Zentrifugation wird die Probe „Ü2“ genommen, bevor dieser verworfen wird. Im folgenden Schritt wird das Membranpellet in guanidinhaltigem Puffer aufgenommen. Guanidin hat dabei eine Konzentration von 6 M. Eine Extraktion mit anschließender Zentrifugation wird durchgeführt. Aus dem Pellet wird die Probe „P3“ entnommen. Dieses ist extrem viskos und lässt sich nicht pipettieren. Nach der Extraktion folgt die Affinitätschromatographie. Aus diesem Schritt stammen die Proben „Auftrag IMAC“, „DL IMAC“ und „Elu IMAC“. Im Anschluss erfolgt eine Umpufferung bei der das Guanidin entfernt wird. Diese führt zur Renaturierung des Zielproteins und der Formation der VLPs.

## 2.4 Fällung von Proteinen

Proteine sind Makromoleküle, die aus Aminosäuren aufgebaut sind [Scopes 1987]. Diese sind mittels Peptidbindung verbunden. Die Aminosäuresequenz gibt sowohl die dreidimensionale Struktur als auch die Eigenschaften des Proteins vor. Dazu gehört auch die Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Reste an der Proteinoberfläche. Diese bestimmt die Löslichkeit des Proteins in verschiedenen Lösungsmitteln. Allerdings liegen die hydrophoben Bereiche tendenziell eher im Zentrum des Moleküls. Andere geladene und polare Gruppen an der Oberfläche des Proteins spielen ebenfalls eine Rolle. Lösungsmittel für Proteine sind oftmals wässrig. Die Proteinlöslichkeit wird dabei von den Lösungseigenschaften des Wassers beeinflusst. Diese können durch Änderung der Ionenstärke, des pH-Werts oder Zugabe mischbarer organischer Lösungsmittel geändert werden. Eine Änderung der Lösungseigenschaften kann eventuell auch durch Zugabe anderer inerte, löslicher Stoffe oder Polymere und Temperaturvariation erreicht werden.

Ein Lösungsmittel für Proteine enthält in aller Regel eine geringe Salzkonzentration (Salting-in). Die Löslichkeit ist dann das Resultat von polarer Interaktion mit dem wässrigen Lösungsmittel sowie ionischer Interaktion mit den vorhandenen Salzen und in gewissem Maße der Abstoßungskraft zwischen gleich geladenen Molekülen oder Aggregaten.

Um ein Protein aus einer Lösung zu entfernen und es somit von anderen Proteinen oder Bestandteilen der Lösung zu trennen, steht eine Vielzahl an Methoden zur Verfügung. Dazu gehören die Fällung durch Aussalzen, die Fällung mit organischen Lösungsmitteln, sowie die isoelektrische Präzipitation. Für weitere Methoden sei an dieser Stelle an weiterführende Literatur verwiesen.

### 2.4.1 Aussalzen

Aussalzen (Salting-out) bedeutet, dass zu einer Proteinlösung langsam die benötigte Menge eines Salzes zugegeben wird, sodass eine häufig sehr hohe Salzkonzentration erreicht wird [Scopes 1987]. Dabei können unterschiedliche Proteine in einer Lösung über die Einstellung bestimmter Konzentrationen einzeln aus einer Lösung gefällt werden. Die Effektivität des Aussalzens hängt sehr stark von der Hydrophobizität ab. Viele Proteine besitzen hydrophobe Seitenketten. In einem wässrigen Lösungsmittel sortieren sich die Wassermoleküle um die Seitenketten. Dies ist thermodynamisch ungünstig und instabil, da dies die Entropie sehr stark verringert im Vergleich zum ungelösten Protein mit freien Wassermolekülen.

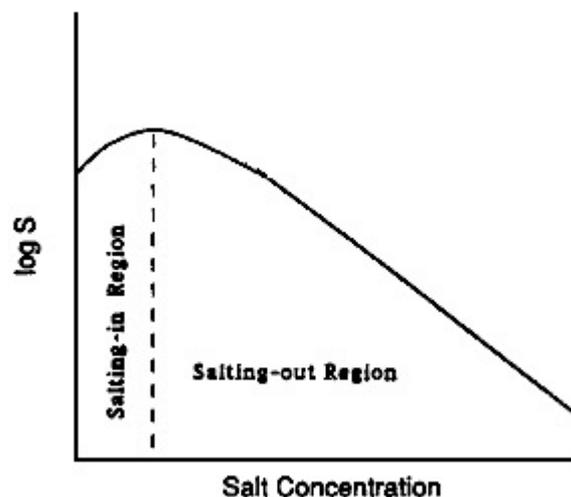


Abbildung 2: Verhalten der Löslichkeit bei steigender Salzkonzentration, log S steht für Logarithmus der Solubility (Löslichkeit). (adaptiert aus [Shih et al. 1992])

Abbildung 2 verdeutlicht, wie sich die Löslichkeit bei steigender Salzkonzentration verhält. Bei hoher Salzkonzentration werden viele Wassermoleküle benötigt, um die Salzionen zu solvatisieren. Wenn die freien Wassermoleküle knapp werden, werden die Wassermoleküle von den hydrophoben Seitenketten abgelöst. Dadurch aggregieren die hydrophoben Bereiche der Proteine. Je mehr hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche vorhanden sind, desto schneller aggregieren sie. Befinden sich dagegen

nur wenige unpolare Bereiche auf der Oberfläche, bleiben die Proteine trotz sehr hoher Salzkonzentration in Lösung. Natürlich spielen bei dem Vorgang auch die Eigenschaften der Salze eine sehr große Rolle. Wenn das Salz direkt an das Protein bindet, findet eine Destabilisierung des Proteins statt. Für eine Salzfällung sind die Salze am besten geeignet, die die Hydratation polarer Proteinregionen und Dehydratation hydrophober Bereiche fördern, ohne direkt mit dem Protein zu interagieren. Grundsätzlich werden einwertige Kationen und bestimmte zweiwertige Anionen bevorzugt verwendet im Gegensatz zu zweiwertigen Kationen und einwertigen Anionen. Zweiwertige Kationen und einwertige Anionen tendieren eher dazu, Proteine zu binden. Im Aussalzbereich sinkt die Löslichkeit der Proteine bei zunehmender Temperatur, weil diese die hydrophobe Interaktion beeinflusst. Die effektivsten Salze sind mehrfach geladene Anionen, wie Sulfat, Phosphat und Citrat. Das jeweilige Kation hat einen geringeren Einfluss. Die Fähigkeit der Anionen zum Aussalzen folgt der Hofmeisterreihe.

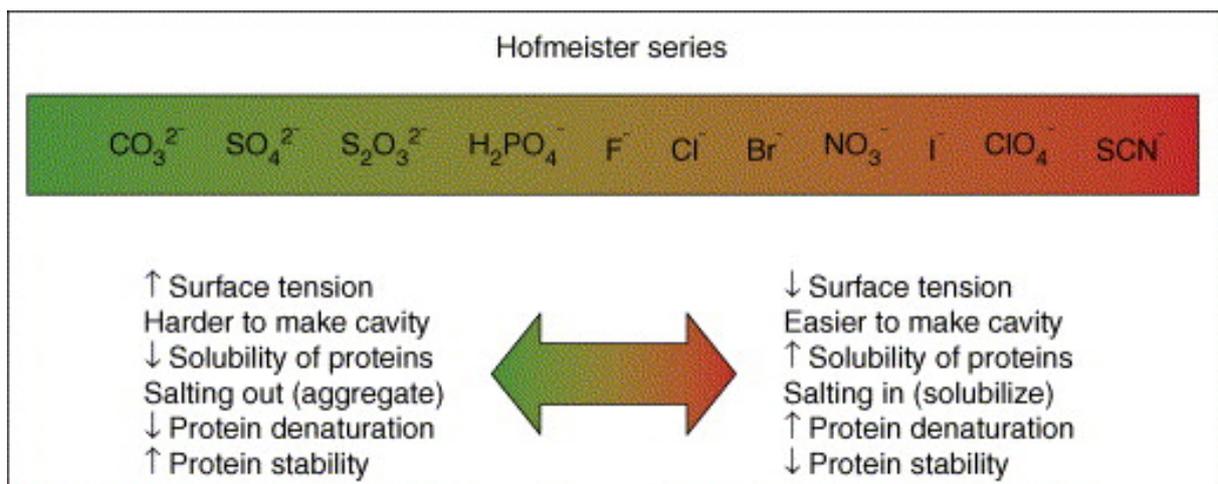


Abbildung 3: Hofmeisterreihe der Anionen. Die links von  $\text{Cl}^-$  stehenden Anionen werden als kosmotrop bezeichnet, die rechts davon als chaotrop. Die kosmotropen Ionen sind stark hydratisiert, erhöhen die Proteinstabilität und führen zur Präzipitation von Proteinen und Makromolekülen. Die chaotropen Ionen destabilisieren gefaltete Proteine, erhöhen die Löslichkeit von Makromolekülen und Proteinen und führen somit zum Salting-in. (Abbildung übernommen von [Zhang, Cremer 2006])

Danach sollte Phosphat besser geeignet sein, als Sulfat. Allerdings liegt bei neutralem pH-Wert in der Lösung eine Mischung aus  $\text{HPO}_4^{2-}$  und  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  vor, weshalb es weniger effektiv ist als  $\text{PO}_4^{3-}$ . Grundsätzlich sollte bei der Wahl eines Salzes als Fällungsmittel die Löslichkeit, die Temperatur der Lösung und der Preis in Betracht gezogen werden. Eine Erwärmung der Lösung bei Lösen des Salzes ist unerwünscht.

Das gebräuchlichste Fällungssalz ist Ammoniumsulfat ( $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ ). Die Löslichkeit des Salzes variiert kaum zwischen 0 °C und 30 °C. Eine gesättigte Lösung hat eine ungefähre Konzentration von 4 M und die Dichte liegt bei  $1,235 \text{ g cm}^{-3}$ . Kleine Abweichungen des pH-Werts haben kaum Einfluss, allerdings sollte ein neutraler pH-Wert zwischen 6 und 7,5 gewählt werden. Ammoniumsulfat hat einen geringen Säuerungseffekt, weshalb etwa 50 mM Puffer in der Lösung vorhanden sein sollte. Proteine nach einer Fällung mit 2-3 M Ammoniumsulfat sind sehr stabil und lange lagerfähig. Zudem beugt es der Proteolyse und bakterieller Kontamination vor. Das Salz kann als Feststoff oder als gesättigte Lösung zur Proteinlösung gegeben werden.

Ein Salz präzipitiert nie den gesamten Proteingehalt, sondern senkt nur die Löslichkeit. Zudem ist die Fähigkeit zur Präzipitation eines Salzes keine absolute Eigenschaft, sondern von den gelösten Proteinen und deren Konzentration abhängig, sowie von anderen enthaltenen Komponenten. Die häufigste Anwendung der Salzfällung hat die Aufkonzentrierung einer Proteinlösung zum Ziel.

#### **2.4.2 Fällung mit organischen Lösungsmitteln**

Das Prinzip, das hinter der Fällung mit organischen Lösungsmitteln steckt, unterscheidet sich von dem der Salzfällung [Scopes 1987]. Deshalb stellt diese grundsätzlich eher einen Zusatzschritt bei der Aufreinigung von Proteinen dar, als eine echte Alternative.

Die Zugabe eines organischen Lösungsmittels zu einer wässrigen Proteinlösung hat sehr vielfältige Effekte. Die Kombination dieser Effekte führt zur Präzipitation. Der wichtigste Effekt ist die Reduktion der Wasseraktivität. Die Solvatisierungskraft des Wassers für ein geladenes, hydrophiles Proteinmolekül sinkt mit zunehmender Konzentration des organischen Lösungsmittels. Dies wird durch die Reduktion der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels erklärt. Zudem werden die Wassermoleküle durch die Hydratation des Lösungsmittels zum Teil immobilisiert. Das organische Lösungsmittel verschiebt die geordneten Wasserstrukturen um die hydrophoben Bereiche der Proteinoberfläche, was zur relativen Erhöhung der Löslichkeit dieser Bereiche führt. Dies erklärt auch, warum extrem hydrophobe Membranproteine in 100% organischem Lösemittel löslich sind. Bei Proteinen mit wenigen hydrophoben Bereichen sinkt aber die Löslichkeit bis zur Aggregation und Präzipitation. Ursächlich dafür sind elektrostatische und bipolare van-der-Waals Kräfte. Die hydrophobe Anziehung spielt eine geringere Rolle wegen des Einflusses des organischen Lösungsmittels auf

die hydrophoben Bereiche. Wenn ein Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel als Solvent dient, findet die Aggregation wegen der Interaktion zwischen unterschiedlich geladenen Bereichen der Proteinoberfläche statt. Dieser Effekt wird in der folgenden Abbildung 4 dargestellt.

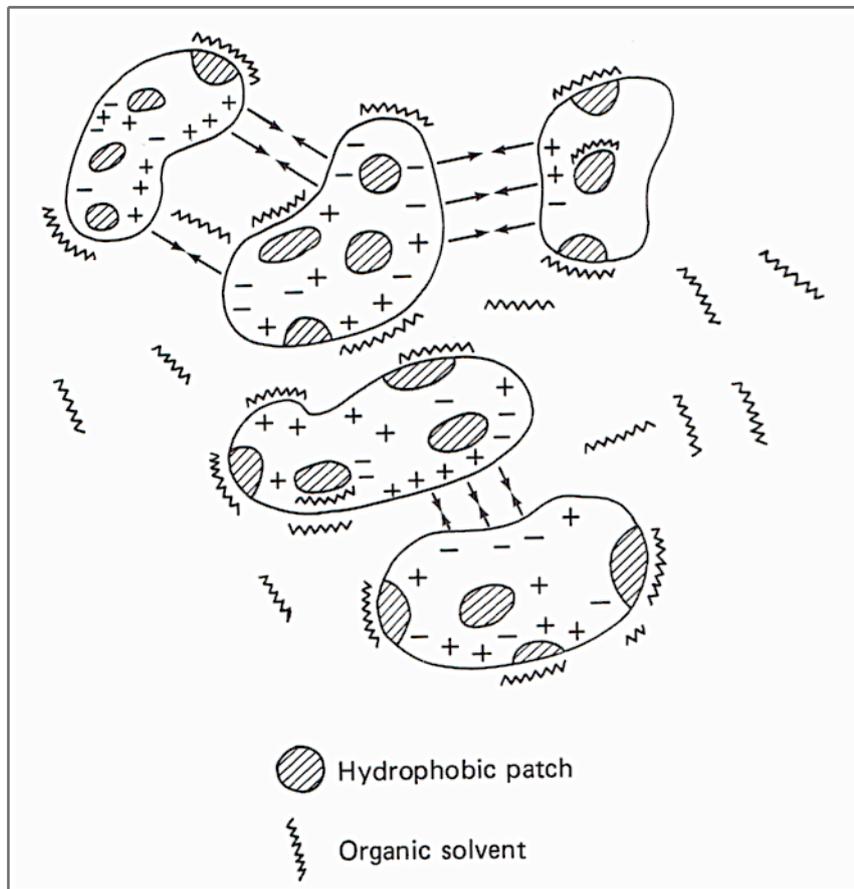


Abbildung 4: Die Interaktion des organischen Lösungsmittels mit den hydrophoben Bereichen des Proteins führt zur Aggregation der Proteine. (Abbildung übernommen aus [Scopes 1987])

Ebenfalls Einfluss auf die Fällung mit organischen Lösungsmitteln hat die Proteinmolekülgröße. Je größer das Molekül ist, desto geringer ist der benötigte Anteil an organischem Lösungsmittel, wenn alle anderen Parameter konstant sind. Große Moleküle aggregieren schneller, weil die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass eine geladene Domäne in Kontakt mit einer ungeladenen Domäne kommt. Dann wirkt die elektrostatische Anziehung.

Bei der Auswahl des Lösungsmittels muss darauf geachtet werden, dass es vollständig mit Wasser mischbar ist, nicht mit Proteinen reagiert und eine gute Präzipitationsfähigkeit hat. Zudem spielt der Sicherheitsaspekt bezüglich der Entflammbarkeit und der Entwicklung giftiger Dämpfe eine große Rolle.

Wenn bei Temperaturen über 10 °C gearbeitet wird, spielen denaturierende Effekte eine Rolle und müssen bedacht werden. Ursächlich hierfür ist die Beeinflussung der intramolekularen hydrophoben Wechselwirkungen welche die Proteinstruktur aufrecht erhalten. Bei niedrigen Temperaturen fehlt dem organischen Lösungsmittel die konformale Flexibilität, sodass es nicht in das Protein eindringen kann und keine Destabilisierung stattfindet. Bei höherer Temperatur ist das Protein weniger starr, sodass kleine Lösungsmittelmoleküle leichter in das Innere eindringen können und durch hydrophobe Kräfte an interne Bereiche binden. Diese sind besonders wichtig für die molekulare Integrität und wenn sie durch die Lösungsmittelmoleküle beansprucht werden folgt die autokatalysierte Denaturierung. Grundsätzlich haben langkettige Alkohole stärkere Denaturierungseigenschaften als kurzkettige. Zudem wirkt Aceton schwächer denaturierend, als Ethanol. Das wird zu einem kleinen Teil dadurch bedingt, dass weniger Aceton benötigt wird, um Proteine bei niedriger Temperatur ähnlich effektiv zu präzipitieren. Die am häufigsten verwendeten Lösungsmittel sind Aceton, Ethanol und Methanol. Diese werden üblicherweise bei Temperaturen unter 0 °C eingesetzt.

### **2.4.3 Isoelektrische Präzipitation**

Aminosäuren liegen bei neutralem pH-Wert überwiegend als dipolare Ionen vor. Das bedeutet, dass die Aminogruppe protoniert und die Carboxylgruppe dissoziiert ist. Auch die Seitenketten der Aminosäuren können dissoziieren. In Proteinen bilden die Amino- und die Carboxylgruppe die Peptidbindung, weshalb nur noch die Ladung bzw. Dissoziation der Seitenketten von Bedeutung ist. Die Nettoladung eines Proteins resultiert aus den Ladungen der Seitenketten. Diese gleichen sich gegebenenfalls gegenseitig aus. Bei der isoelektrischen Fällung wird diese Tatsache genutzt. Jedes Protein hat einen bestimmten pH-Wert, bei dem sich alle positiven und negativen Ladungen so ausgleichen, dass die Nettoladung null ist. Dieser bestimmte pH-Wert wird isoelektrischer Punkt (pI) genannt. Die Löslichkeit eines Proteins ist an seinem isoelektrischen Punkt am geringsten sodass es ausfällt, wenn der pH-Wert der Lösung zu diesem Punkt verschoben wird.

### **2.4.4 Methodenauswahl**

Alle verwendeten Methoden entstammen den angegebenen Publikationen. Die einzigen vorgenommenen Änderungen zu den Vorlagen waren Anpassungen der Volumina. Dies war notwendig, weil die Proben in den Publikationen andere Volumina auf-

wiesen und die verwendete Konzentration beibehalten werden sollte. Darüber hinaus bestand keine Notwendigkeit, die Methoden anzupassen, weil genug Probenvolumen vorhanden war, sodass bei Problemen eine Wiederholung und Anpassung jederzeit möglich gewesen wäre.

Insgesamt wurden neun Fällungsmethoden und eine Filtration untersucht. Acht der neun Fällungen wurden mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt, die neunte mit Ammoniumsulfat. Es wurden hauptsächlich Fällungen mit organischen Lösungsmitteln ausgewählt, weil diese auch laut Literatur gute Ergebnisse produzieren. Salzfällungen sind von der Umsetzbarkeit eher weniger geeignet, weil im Labormaßstab gearbeitet wurde. Ein festes Salz lässt sich schlecht in ein Reaktionsgefäß applizieren. Zudem lässt sich die Suspension darin nicht rühren. Der Umweg über eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung ist möglich. Auch eine isoelektrische Präzipitation kam nicht in Frage, weil eine pH-Wertmessung mittels pH-Elektrode in dem Maßstab nicht möglich ist. Eine Messung mittels pH-Papiers ist wiederum nicht genau genug.

Kriterien für die Auswahl der Methode sind Handhabung, Praktikabilität, Dauer, Aufwand, Kosten und Aussehen der Proben auf dem Acrylamidgel. Da die Proben im Anschluss an die SDS-PAGE nicht weiter verwendet werden können, spielt der Funktionserhalt keine so große Rolle. Daher muss keine schonende Methode gewählt werden.

## **2.5 SDS-PAGE**

Die SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophorese, deutsch: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) nach Laemmli [Laemmli 1970] ist ein gut etabliertes Verfahren zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Polyacrylamid ist ein quervernetztes Polymer, welches als Molekularsieb fungiert. Es entsteht durch die Copolymerisation von Acrylamid und Methylbisacrylamid. Die zu untersuchenden Proteine werden in das Gel gegeben und wandern in diesem aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes und ihrer eigenen Nettoladung. In Abhängigkeit von ihrer Größe erfahren die Proteine im Gel einen größeren oder kleineren Widerstand, sodass ihre Wanderungsgeschwindigkeit proportional zu ihrem Ladungs-Masse-Verhältnis ist.

SDS ist ein anionisches Tensid bzw. Detergens, das dazu dient, die Eigenladungen der Proteine durch Anlagerung zu überdecken, sodass eine große negative Nettoladung vorliegt und zudem eine konstante Ladungsverteilung. Dadurch wandern alle

Proteine zur Kathode durch das Gel. Außerdem denaturiert SDS die Proteine. Dieser Vorgang wird durch die kurze Erhitzung der Proben auf 95 °C vor der Applikation in das Gel unterstützt. Sekundär- und Tertiärstrukturen werden durch die Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbindungen aufgespalten und die Proteine gestreckt. Zudem können reduzierende Agentien, wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), zugegeben werden, um Disulfidbrücken zu unterbrechen. Disulfidbrücken halten oft Dimere und Aggregate zusammen, sodass nach Reduktion nur noch Monomere vorliegen. Die Behandlung der Proben dient dazu, sie nur anhand ihres Molekulargewichts aufzutrennen. Anderenfalls könnte die dreidimensionale Struktur großer Proteine ebenfalls eine Retention verursachen.

Üblicherweise wird für den Elektrophoreselauf eine vertikale Gelkammer verwendet. Die vorbereiteten Proteine werden in die Geltaschen appliziert und eine Gleichspannung angelegt. Dabei wird zusätzlich ein Molekulargewichtsstandard appliziert, um die Identifikation der Proteine zu ermöglichen oder das Molekulargewicht eines unbekanntes Proteins zu bestimmen. Nach dem Elektrophoreselauf wird das Gel mit einer Fixierungslösung behandelt, mit Coomassie-Brilliant-Blau oder anderen Farbstoffen gefärbt und gewaschen. Im Anschluss sind die Proteine als Banden erkennbar. Coomassie-Brilliant-Blau lagert sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren an. Dadurch werden einzig die Proteine sequenzunabhängig gefärbt.

Die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE beinhaltete die Lufttrocknung des Pellets für zehn Minuten. Das Pellet wurde dann in 50  $\mu$ L Probenpuffer resuspendiert. Dieser enthielt 42 % 4x XT Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules USA), 50 % TGS-Laufpuffer und 8 %  $\beta$ -Mercaptoethanol. Nach Zugabe des Probenpuffers wurden die Proben gründlich gevortext, zehn Minuten auf dem Reaktionsgefäßschüttler bei 500  $\text{min}^{-1}$  geschüttelt und für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Der Größenstandard war die PaggerRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham USA) mit Banden zwischen 10 und 200 kDa. Für den Fall, dass die Proben vor der SDS-PAGE flüssig waren, erfolgte die Entnahme von 24  $\mu$ L der Probe. Dieses Volumen wurde mit 8  $\mu$ L 4x XT Sample Buffer versetzt und dann erhitzt. Der Schritt des Schüttelns entfiel.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Polyacrylamidgele mit 10 % Polyacrylamid verwendet. Mit Hilfe der folgenden Rezepte für das Trenn- und das Sammelgel konnten jeweils zwei Gele hergestellt werden.

## Trenngel mit 10 % Polyacrylamid (14 mL)

4,7	mL	Rotiphorese 30
3,5	mL	Tris 1,5 M pH 8,8
0,14	mL	SDS 10 %
5,5	mL	VE H <sub>2</sub> O
14	µL	TEMED
0,14	mL	APS

## Sammelgel mit 4,875 % Polyacrylamid (8 mL)

1,3	mL	Rotiphorese 30
1	mL	Tris 1 M pH 6,8
80	µL	SDS 10 %
5,5	mL	VE H <sub>2</sub> O
10	µL	TEMED
80	µL	APS

Diese Gele sind für einen Trennbereich von 20 bis 80 kDa geeignet. Die Elektrophoresen erfolgten in der SE260 Mighty Small II Deluxe Mini Vertical Electrophoresis Unit von Hoefer (Holliston, USA). Als Laufpuffer diente der TGS-Puffer von Bio-Rad (Hercules, USA). Dieser enthält 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % SDS. Der pH-Wert liegt bei 8,3. Die Gleichspannung betrug 200 Volt und wurde für 70 Minuten angelegt. Nach dem Lauf wurde das Gel eine Stunde in einer Lösung fixiert, die 20 % Methanol und 0,85 % Phosphorsäure enthält. Im Anschluss wurde das Gel zwei Stunden in der Coomassielösung (Roti<sup>®</sup>-Blue 5x Konzentrat, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland) gefärbt und danach dreimal 15 Minuten mit einer 20 %igen Methanollösung gewaschen. Alle Schritte der Nachbehandlung erfolgten auf einem Laborschüttler. Zum Schluss wurden die fertigen Gele mit einem herkömmlichen Büro-Scanner (HP Scanjet G2710, Palo Alto, USA) eingescannt und eingeschweift. Die Bearbeitung der Gelbilder erfolgte mit der Software CorelDraw Graphics Suite X4 von Corel (Ottawa, Kanada).

Das standardisierte Vorgehen bei der Probenvorbereitung vor der Durchführung der jeweiligen Methode, sowie bei der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE und die Behandlung der Gele soll immer dem gleichen Schema folgen. Damit soll garantiert werden, dass das Ergebnis letztendlich nur durch den Einfluss der jeweiligen Methode entstanden ist.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Probenvorbereitung

Die Proben aus dem Produktionsprozess wurden aliquotiert und verdünnt, um Einflüsse durch das wiederholte Einfrieren und Auftauen auszuschließen. Die Proben wurden in Portionen mit je einer Probe eingefroren und konnten dann einzeln entnommen werden. Folgende Verdünnungen wurden vorgenommen.

Tabelle 1: Übersicht über die Probenverdünnungen

Probe	Volumen	Verdünnung
Lysat	20 µL + 30 µL PBS	2:5
Ü1	40 µL + 10 µL PBS	4:5
Ü2	50 µL	/
Auftrag IMAC	20 µL + 30 µL PBS	2:5
DL IMAC	20 µL + 30 µL PBS	2:5
Elu IMAC	50 µL	/
P3	50 µL PBS	/
B I (BSA + D1M1H in PBS)	50 µL	/
B II (BSA + D1M1H in Equilibrierungspuffer)	50 µL	/

Für die Probe „B I“ wurden 3,2 mg bovines Serumalbumin (BSA) und 2,1 mg eines rekombinanten Oberflächenproteins des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* (D1M1H) eingewogen und in 50 mL PBS gelöst.

Für die Probe „B II“ wurden 2,4 mg BSA und 3,0 mg D1M1H eingewogen und in 50 mL Equilibrierungspuffer der IMAC gelöst (50 mM TRIS, 0,5 M NaCl, 6 M Guanidin, 10 mM Imidazol).

Das Pellet „P3“ zeigte eine extreme Viskosität und ließ sich nicht pipettieren. Stattdessen wurden 50 µL PBS im Reaktionsgefäß vorgelegt und mit einer Pipettenspitze

etwas vom Pellet übertragen sodass mit bloßem Auge sichtbar Partikel im PBS vorhanden waren. Dies stellt eine extrem ungenaue Methode dar, weil keine einheitliche Menge Protein übertragen wurde. Eine andere Möglichkeit bestand aber nicht.

Folglich haben alle Proteinproben ein Ausgangsvolumen von 50 µL.

### **3.2 Fällungsmethoden**

In den meisten Fällen wurden die organischen Lösungsmittel bei -20 °C gelagert, sodass sie vor Durchführung der Methode eiskalt waren. Dadurch wird eine schonende Fällung ohne oder mit nur geringer Denaturierung erreicht. In dieser Arbeit muss darauf keine Rücksicht genommen werden. Trotzdem wurde nicht von dem Verfahren abgewichen, in der Hoffnung effiziente Fällungen zu erreichen.

#### **3.2.1 Fällung A mit Chloroform und Methanol**

Diese Fällungsmethode wurde aus der Publikation von D. Wessel [Wessel, Flügge 1984] entnommen. Dabei wurden zu der Proteinprobe 200 µL Methanol 100 % gegeben. Im Anschluss erfolgte ein kurzes Vortexen der Proben und eine Zentrifugation (9.000 x g, 10 min, RT). Danach wurden 50 µL Chloroform zugegeben, ebenfalls gevortext und zentrifugiert (9.000 x g, 10 min, RT). Anschließend wurden 150 µL VE-Wasser hinzugefügt, erneut gevortext und zentrifugiert (9.000 x g, 1 min, RT). Chloroform und Methanol sind mischbar, allerdings Chloroform nicht mit Wasser, sodass sich nach Zugabe des Wassers eine Phasentrennung einstellt. Die obere Phase wurde nach Zugabe des Wassers und des erneutes Vortexen und Zentrifugieren verworfen. Zur verbliebenen Phase wurden erneut 150 µL Methanol zugegeben, gevortext und zentrifugiert (9.000 x g, 2 min, RT). Nach diesem letzten Schritt wurde der Überstand entfernt und das Pellet gemäß der Beschreibung im Abschnitt 2.5 vorbereitet.

#### **3.2.2 Fällung B mit Chloroform und Methanol**

Die Fällung entspricht der Beschreibung von Ewelina Fic [Fic et al. 2010]. Hier wurden zu der Proteinprobe 200 µL Methanol gegeben und gevortext. Danach wurden 50 µL Chloroform zugegeben, gevortext und zentrifugiert (10.000 x g, 5 min, RT). Im Anschluss wurde die wässrige Methanolphase verworfen und erneut 200 µL Methanol zugegeben. Nach wiederholtem Vortexen und Zentrifugieren (10.000 x g, 15 min, RT) wurde der Überstand entfernt und die Probe für die SDS-PAGE vorbereitet.

### 3.2.3 Fällung C mit Aceton

Diese Fällung wurde ebenfalls von E. Fic [Fic et al. 2010] übernommen. Hier wurden zu den Proteinproben 200  $\mu\text{L}$  Aceton mit 20 mM DTT gegeben, gevortext und eine Stunde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (10.000 x g, 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), die Überstände entfernt und die Vorbereitung für die SDS-PAGE vorgenommen.

### 3.2.4 Fällung D mit TCA/Aceton

Erneut diente die Publikation von E. Fic [Fic et al. 2010] als Vorlage. Es erfolgte die Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  eiskaltem Aceton zu den Proben und das Vortexen. Danach wurden 50  $\mu\text{L}$  20 %ige Trichloressigsäure (TCA) zugegeben, erneut gevortext und für eine Stunde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (15.000 x g, 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und 500  $\mu\text{L}$  eiskaltes Aceton mit 20 mM DTT zugegeben. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (15.000 x g, 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), die Überstände entfernt und die Vorbereitung für die SDS-PAGE durchgeführt.

### 3.2.5 Fällung E mit Aceton

Die Durchführung dieser Fällung orientierte sich an der Veröffentlichung von Lei Ji-ang [Jiang et al. 2004]. Dabei erfolgte die Zugabe von 150  $\mu\text{L}$  eiskaltem Aceton zu den Proben. Diese wurden dann über Nacht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. In diesem Fall handelte es sich um eine Inkubation für 16 Stunden und 25 Minuten. Im Anschluss daran erfolgte eine Zentrifugation (10.000 x g, 30 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), die Überstände wurden entfernt und die Probenvorbereitung durchgeführt.

### 3.2.6 Fällung F mit Ethanol

Die Publikation von R. Blake Pepinsky [Pepinsky 1991] diente als Vorlage. Dabei wurden die Proben aufgetaut, gemischt und dann 30  $\mu\text{L}$  verworfen, sodass 20  $\mu\text{L}$  Probe verwendet wurde. Danach erfolgte die Zugabe von 800  $\mu\text{L}$  eiskaltem Ethanol, die Inkubation für eine Stunde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  und dann die Zentrifugation (16.000 x g, 5 min,  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Danach wurde der Überstand entfernt und die Probenvorbereitung durchgeführt.

### 3.2.7 Fällung G mit TCA/Aceton

Die Fällung erfolgte nach der Publikation von E. Fic [Fic et al. 2010]. Diesmal erfolgte die Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  20 %iger TCA, danach das Vortexen der Proben und die Inku-

bation für eine Stunde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Danach fand eine Zentrifugation statt ( $15.000 \times g$ , 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die Überstände wurden entfernt,  $500\text{ }\mu\text{L}$  eiskaltes Aceton mit  $20\text{ mM}$  DTT zugegeben, gevortext und erneut zentrifugiert ( $13.000 \times g$ , 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nach Entfernen der Überstände fand die Probenvorbereitung statt.

### **3.2.8 Fällung H mit NaDOC/TCA**

Diese Fällung erfolgte nach den Vorgaben in der Veröffentlichung von Ulrich Arnold [Arnold, Ulbrich-Hofmann 1999]. Hierbei wurden die Proben aufgetaut, gemischt und  $30\text{ }\mu\text{L}$  verworfen, sodass mit  $20\text{ }\mu\text{L}$  Probe gearbeitet wurde. Zu diesem Volumen wurden  $180\text{ }\mu\text{L}$  1 %ige NaDOC-Lösung (Natriumsalz der Desoxycholsäure) gegeben (1:10 v/v). Direkt im Anschluss erfolgte die Zugabe von  $800\text{ }\mu\text{L}$  50 %iger TCA (1:5 v/v). Die Proben inkubierten dann 15 Minuten bei Raumtemperatur und es folgte die Zentrifugation ( $20.000 \times g$ , 20 min). Der Überstand wurde entfernt,  $100\text{ }\mu\text{L}$  Aceton zugegeben und gevortext. Eine erneute Inkubation für 15 Minuten bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  folgte. Im Anschluss erfolgte erneut die Zentrifugation ( $20.000 \times g$ , 20 min), die Entfernung des Überstands und die Probenvorbereitung.

### **3.2.9 Fällung I mit Ammoniumsulfat**

Erneut diente die Publikation von L. Jiang [Jiang et al. 2004] als Vorlage. Zunächst erfolgte die Herstellung einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung. Davon wurden dann jeweils  $450\text{ }\mu\text{L}$  zu den Proben gegeben, sodass eine 90% ige Fällung stattfand. Im Anschluss an die Zugabe erfolgte das Vortexen, sowie die Inkubation für zwei Stunden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Danach folgte die Zentrifugation ( $10.000 \times g$ , 30 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Die Überstände wurden entfernt und  $200\text{ }\mu\text{L}$  eiskaltes, 90 %iges Aceton zugegeben. Erneut schloss sich eine Inkubation für 15 Minuten bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  und eine Zentrifugation ( $10.000 \times g$ , 30 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) an. Die Überstände wurden entfernt und die Proben für die SDS-PAGE vorbereitet.

## **3.3 Methode J: Filtration**

Für die Filtration wurden die Vivaspin 500 Filtrationstubes von Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Deutschland) verwendet. Diese haben einen Cut-off von 5000 Dalton und die Membran besteht aus Polyethersulfon. Ziel dieser Methode war es,  $400\text{ }\mu\text{L}$  der Proben zunächst auf  $100\text{ }\mu\text{L}$  zu konzentrieren, das Konzentrat dann mit einem  $50\text{ mM}$  TRIS-Puffer (pH 8) zu waschen und dann erneut auf  $100\text{ }\mu\text{L}$  zu konzentrieren. Die Proben „Lysat“ und „P3“ wurden dem Procedere nicht unterzogen,

weil in der Ausgangsprobe aus dem Downstreamprozess unlösliche Bestandteile sichtbar waren („Lysat“), bzw. Die Viskosität extrem hoch war („P3“). Es war zu vermuten, dass dies zur Verstopfung der Membran führen kann und keine Konzentrierung stattfindet. Die beiden Proben wurden ohne Behandlung für die SDS-PAGE verwendet, weil kein Guanidin enthalten ist.

Um die übrigen Proben initial zu konzentrieren, wurden die Tubes mit jeweils 400 µL Probe zunächst 20 Minuten bei 20.200 x g und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Überprüfung des verbliebenen Volumens. Insgesamt mussten die Proben noch weitere 20 Minuten bei 20.200 x g und 4 °C zentrifugiert werden, bis bei allen Proben das gewünschte Volumen erreicht war. Entsprechend dem verbliebenen Volumen erfolgte die Zugabe von 200 bis 350 µL Tris-Puffer (50 mM, pH 8) und die Zentrifugation für zehn Minuten bei 20.200 x g und 4 °C. Dieser Zentrifugationsschritt erfolgte wiederholt, nachdem das verbliebene Volumen überprüft wurde. Dabei zerbrach ein Membrantube, sodass im Anschluss alle Zentrifugationsschritte bei 15.000 x g durchgeführt wurden. Insgesamt mussten die Tubes 60 Minuten zentrifugiert werden, bis bei allen das Volumen entsprechend reduziert war. Nach Abnahme von 24 µL Konzentrat und Zugabe des Probenpuffers präzipitierten die Proben „Auftrag IMAC“, „DL IMAC“, „Elu IMAC“ und „BII“, weil offensichtlich noch zu viel Guanidin enthalten war. Diese Proben wurden dann verdünnt („Auftrag IMAC“ und „DL IMAC“ jeweils 1:7,5; „Elu IMAC“ und BII 1:3) und dem Konzentrierungsprocedere erneut unterzogen. Die erste Konzentrierung erfolgte nach insgesamt 30 Minuten Zentrifugation (15.000 x g, 4 °C), der Waschschrift benötigte im Anschluss insgesamt 64 Minuten Zentrifugation (15.000 x g, 4 °C).

Die Proben, die nach Zugabe des Probenpuffers nicht präzipitiert waren, wurden ebenfalls verdünnt („Ü1“ 1:4,75; „Ü2“, „B I“ 1:4). Zur Verdünnung wurde XT Sample Buffer verwendet. Dieser Schritt diente dazu, die Proteinmenge, die auf das Gel aufgetragen wurde, an die Proteinmenge nach den Fällungsmethoden anzugleichen.

### **3.4 Bewertungsschema**

Die Entscheidung darüber, welche Aufbereitungsmethode am besten geeignet ist soll anhand verschiedener Kriterien erfolgen. Das wichtigste ist das Aussehen der Proben auf dem Gel, aber auch die Handhabung und die Praktikabilität spielen eine Rolle. Zudem sind der Aufwand und die Dauer des Vorgehens wichtig und auch die Kosten der Methoden sollen in Betracht gezogen werden. Um die Entscheidung transpa-

rent und nachvollziehbar zu gestalten, wurde ein Punktesystem entworfen. Die genauen Anforderungen, sowie die erreichbare Punktzahl sind in Tabelle 2 übersichtlich dargestellt.

Tabelle 2: Beurteilungskriterien für die Methoden, inklusive Beschreibung und erreichbarer Punktzahl.

<b>Kriterium</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Punktzahl</b>
Geloptik	Aussehen des Gels, Trennung, Klarheit der Banden, gerader Lauf	5 - sehr gut 4 - gut 3 - befriedigend 2 - ausreichend 1 - mangelhaft 0 - ungenügend
Handhabung	Festigkeit der Pellets bzw. Phasentrennung, Pellets sichtbar	5 - festes Pellet, sehr einfache H. 4 - festes Pellet, einfache H. 3 - Pellet etwas lose, H. aufwendiger 2 - Pellets lose, H. schwierig, oder Pellets nicht sichtbar Pellets sehr lose, sehr 1 - schwierige H. Pellets ohne Wandhaftung 0 -
Praktikabilität	Anzahl der Schritte, Verringerung des Ausgangsvolumen notwendig, nur Volumenzugabe oder -entnahme zählt als Schritt	3 - ein Schritt 2 - zwei Schritte 1 - drei Schritte 0 - > drei Schritte
Aufwand	Anzahl der Chemikalien, Ansatz notwendig	3 - eine, kein Ansatz 2 - eine, Ansatz 1 - mehrere, kein Ansatz 0 - mehrere, Ansatz
Dauer	Summe der Inkubationszeiten	3 - keine 2 - kurz (bis 1 h) 1 - lang (> 1 h) 0 - über Nacht
Kosten	Kosten pro Fällung für die Chemikalien, Laborausrüstung wird nicht berücksichtigt	2 - gering, gängige Chemikalien 1 - mittel, spezielle Chemikalien, extra angeschafft 0 - hoch, spezielles Produkt

Daraus folgt eine maximal mögliche Gesamtpunktzahl von 21 Punkten. Der erreichte Wert dient als Anhaltspunkt bei der Auswahl der Methode. Im Falle der Beurteilung mehrerer Aspekte unter einem Kriterium soll der Mittelwert der erreichten Punktzahlen in die Gesamtsumme integriert werden. Zum Kriterium des Aufwands muss noch angemerkt werden, dass es natürlich am einfachsten ist, wenn Chemikalien unbearbeitet, das heißt ohne Verdünnung oder Ansatz verwendet werden können. Wenn ein Ansatz erforderlich ist, kann aber ein entsprechend großes Volumen als Vorrat angesetzt werden, sodass nicht für jede Durchführung ein neuer Ansatz erforderlich ist. Dabei dürfen aber die Stabilität, Haltbarkeit und Standzeit der Lösung nicht außer Acht gelassen werden. Unter dem Kriterium der Praktikabilität werden die Arbeitsschritte etwas zusammengefasst. Ein Arbeitsschritt soll definiert sein als Volumenzugabe oder –abnahme inklusive des anschließenden Vortexen und Zentrifugieren. Zudem wird der Arbeitsschritt der Überstands Entfernung nach der letzten Zentrifugation und vor der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE nicht mitgezählt, weil dieser Schritt bei allen Methoden angewendet wird und gleich auswendig ist.

Die Filtrationsmethode J ist keine Fällung wie die übrigen Methoden. Dafür muss das Bewertungsschema leicht angepasst werden. Anstelle der Summe der Inkubationszeiten wird hier die Summe der Zentrifugationszeiten betrachtet. Zudem bezieht sich der Aspekt Handhabung nicht auf die Festigkeit der Pellets, sondern auf das Filtrationsverhalten.

## **4 Ergebnisse und Diskussion**

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Aufarbeitungsmethode zu finden, mit der die Proben aus dem Downstreamprozess zur Aufreinigung des DV-2-Hüllproteins für die SDS-PAGE zugänglich gemacht werden können. Dies ist notwendig, weil das für den Aufreinigungsprozess essentielle Guanidin mit SDS ausfällt und folglich eine SDS-PAGE nicht möglich ist. Die SDS-PAGE soll nach Durchführung der Prozedur verwendet werden, um diese zu bewerten. Die SDS-PAGE ist kostengünstig, vergleichsweise schnell und universell einsetzbar.

### **4.1 Bewertung der Geloptik**

Das wichtigste Kriterium für die Auswahl der Methode ist die Optik des Gels nach der SDS-PAGE, weil die Methode zur Bewertung des Downstreamprozesses genutzt werden soll. Folglich sollte das Gel eine ansprechende Trennung und scharfe Banden aufweisen. In den folgenden Abbildungen 3 und 4 sind alle Gele zusammengefasst, damit diese einfach vergleichbar sind.

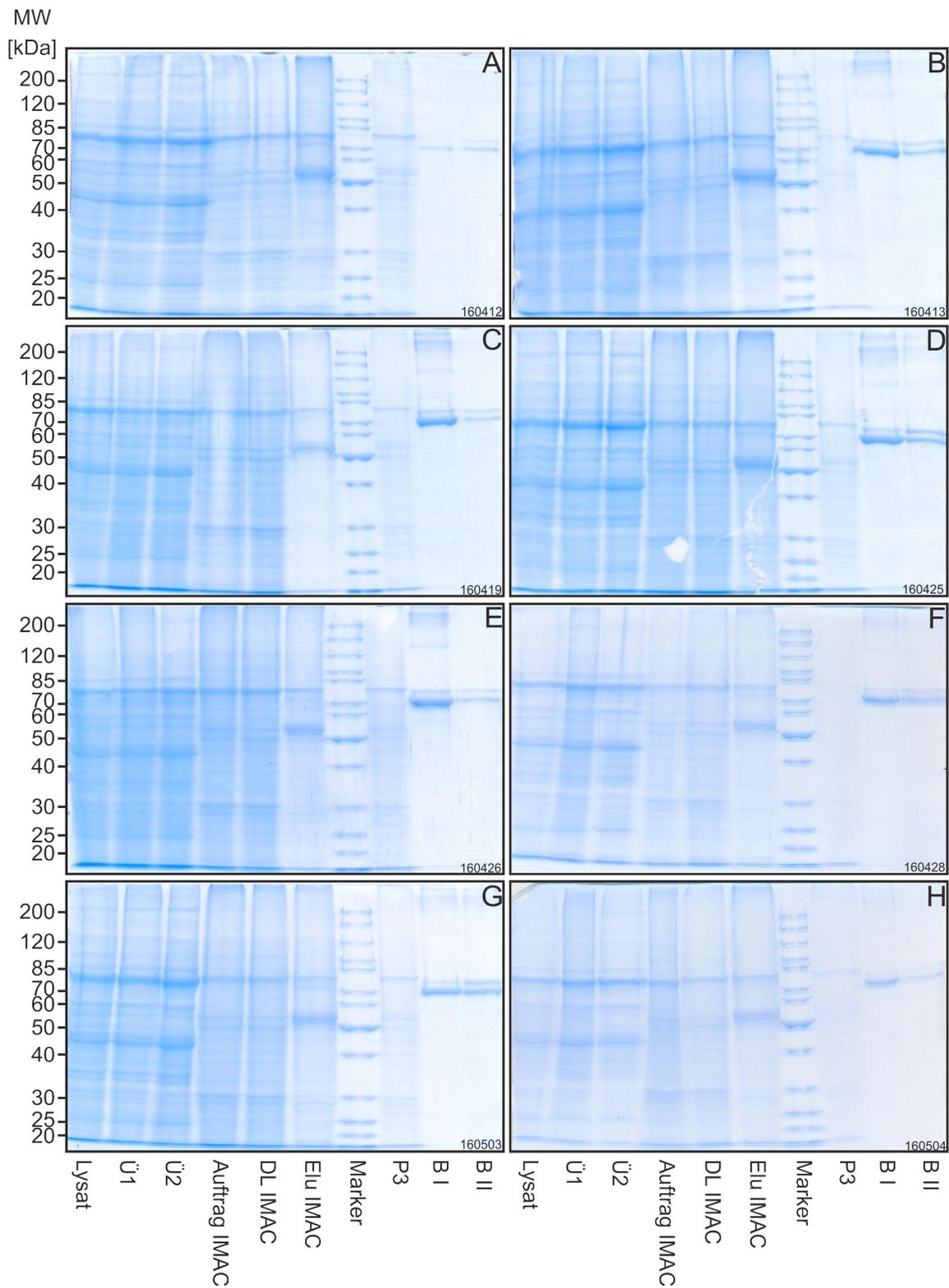


Abbildung 5: Gele der Fällungen A bis H. Die Probenbezeichnungen gelten für alle Gele, genauso die Markermarkierungen. Die Bezeichnung der Gele befindet sich jeweils in der rechten oberen Ecke.

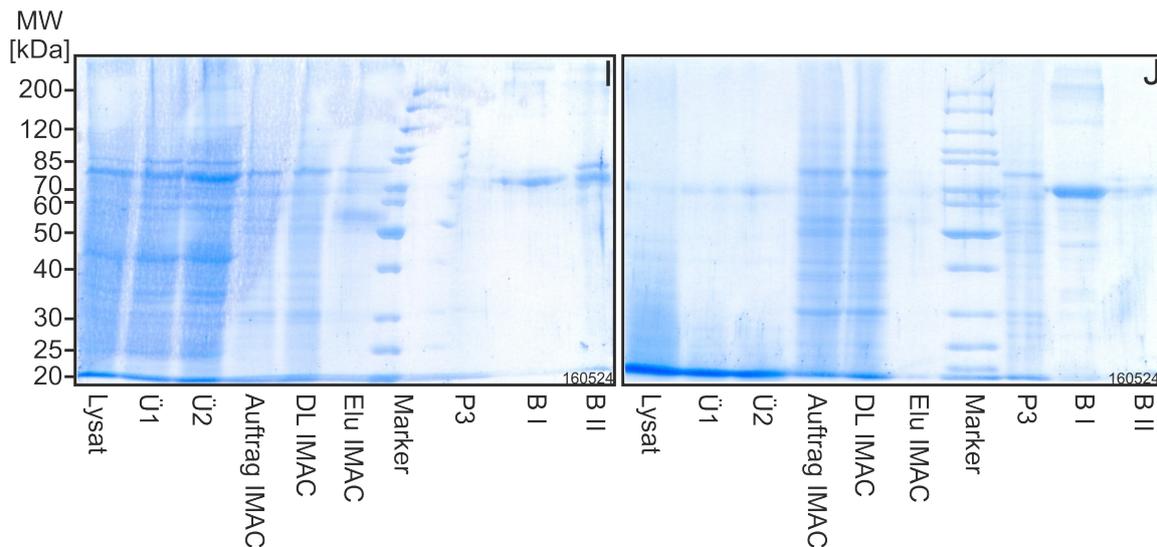


Abbildung 6: Gele der Fällung I und der Methode J.

Die Gele A bis H zeigen ein vergleichbares Aussehen, ohne dass sehr große Unterschiede wahrnehmbar wären. Die Gele A und B sind nicht ganz gerade gelaufen. Dafür sind verschiedene Ursachen denkbar, beispielsweise Unregelmäßigkeiten im Gel. Gel D wurde nach Beendigung des Elektrophoreselaufs bei der weiteren Bearbeitung beschädigt. Allerdings hat diese Beschädigung keinen Einfluss auf das Ergebnis der Fällung. Die Gele F und H sind blasser als die anderen Gele. Ursächlich dafür ist das Ausgangsvolumen, das vor der Fällung reduziert werden musste, weshalb die Proteinmenge geringer ist. Gel I zeigt das schlechteste Ergebnis. Vermutlich enthielten die Proben nach der Fällung mit Ammoniumsulfat einen sehr hohen Anteil des Salzes. Dies scheint die SDS-PAGE zu stören. Methode J ergab ebenfalls kein gutes Ergebnis. Die Abreicherung des Guanidins war eventuell nicht groß genug, wie an den Lanes „Auftrag IMAC“ und „DL IMAC“ erkennbar. Die Lane „Elu IMAC“ zeigt wiederum gar keine Banden. Zudem sind die Proben Ü1 und Ü2, im Gegensatz zu den anderen Methoden nur sehr schwach erkennbar. Eventuell trat ein Großteil der Probe bei der Filtration über die Membran.

Die Trennung der Banden ist bei allen Gelen ansprechend gelungen, allerdings immer dort etwas besser, wo weniger Protein aufgetragen wurde. Beispielsweise zeigen die Gele F und H eine sehr gute Trennung der Banden, da die Proteinkonzentration der Ausgangsproben geringer war, als bei allen anderen Gelen. Das Gel B zeigt eine eher schlechtere Trennung, weil die Banden recht dick sind. Die Banden der Referenzproben „B I“ und „B II“ fallen sehr unterschiedlich aus. BSA (67 kDa) ist et-

was größer als D1M1H (63 kDa) und verbirgt sich hinter der oberen Bande. Die Wiederfindung der beiden Proteine ist sehr unterschiedlich. So ist die Bande von D1M1H in der Probe „B I“ jeweils die deutlich dickere Bande, obwohl weniger Protein eingewogen wurde. Ursächlich dafür könnte sein, dass BSA nicht so effizient gefällt werden konnte. In Gel A sind die Banden der Lanes „B I“ und „B II“ extrem blass, hier scheint ebenfalls ein sehr großer Verlust der Proteine vorzuliegen. In den Lanes der Probe „B II“ sind die Unterschiede zwischen den beiden Banden nicht mehr so groß. Die Probe „B II“ liegt im Equilibrierungspuffer der IMAC vor. Dieser Unterschied zur Probe „B I“ kann hier den entscheidenden Einfluss gehabt haben.

Die wichtigste Lane ist die Lane mit der Probe „Elu IMAC“. Bei optimaler Prozedur verbirgt sich hier der Großteil des Zielproteins. Die Probe hat eine relativ hohe Reinheit im Vergleich zu den Proben aus früheren Schritten des Downstreamprozesses. In den Gelen A, B und D ist diese Lane deutlich stärker als beispielsweise in Gel C. Dieses zeigt hier eine sehr schwache Lane. In Gel J ist gar keine Bande erkennbar. Gel E zeigt eine gute Lane und die Gele F und H eher blasse Lanes, aus den genannten Gründen. In den Gelen A, B, D und F ist allerdings sichtbar dass die obere Bande eine Doppelbande ist. Dies spricht für eine gute Trennung.

Die Lane „P3“ zeigt wiederum sehr unterschiedliche Ergebnisse. Natürlich stellt die Art der Probenvorbereitung (vgl. Abschnitt 3.1) eine wichtige Ursache dar. Danach ist keine einheitliche Proteinkonzentration erwartbar. Entsprechend zeigen die Gele F und H hier quasi keine Banden. In den Gelen A – E, sowie G sind schwache Banden erkennbar, die zum Muster der links gelegenen Lanes passen. So erkennt man besonders in den Gelen A und C sehr schwache Banden auf Höhe der Zielproteinbande.

Alle Gele zeigen ein vielfältiges Bandenmuster. Das ist auf die vielen Fremdproteine der Hefezellen zurückzuführen. Das Zielprotein hat eine Größe von ca. 49 kDa. Wünschenswert ist eine klare Bande bei dieser Größe bei der Fraktion „Elu IMAC“. Stattdessen findet sich in allen Gelen eine dicke Bande bei ca. 55 – 60 kDa. Möglicherweise verbirgt sich hinter dieser Bande das Zielprotein, da das in einem Polyacrylamidgel apparente Molekulargewicht höher ist, als das berechnete. Die Wanderung eines Proteins im Gel ist entgegen der Theorie nicht völlig unabhängig von der 3D-Struktur des Proteins. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Zielprotein abweichende posttranslationale Modifikationen erfahren hat, als vorgesehen. Dieser Um-

stand könnte zu einer Erhöhung der Molekülmasse geführt haben. Banden im Bereich von 50 kDa finden sich in den Fraktionen „Auftrag IMAC“ und „DL IMAC“. Falls es sich dabei um das Zielprotein handelt, erfordert dies eine Optimierung der chromatographischen Methode. Dies wurde im Labor mittels Western Blot nachgewiesen. Die optisch ansprechendsten Gele sind die Gele der Fällungen D und G. Diese zeigen die beste Trennung und sehr scharfe Banden und werden folglich mit fünf Punkten bewertet. Die Gele C und E erhalten vier Punkte. Hier ist die Trennung ebenfalls gut. Daraus folgt, dass diese vier Fällungen, bezogen auf den optischen Aspekt, empfohlen werden können. Die Gele A, B und F erhalten drei Punkte. Die Gele zeigen eine befriedigende Optik. Da aber sehr gute Ergebnisse erzielt wurden, reicht dies nicht für eine Empfehlung aus. Das Gel H erhält zwei Punkte und die Gele I und J erhalten null Punkte.

## 4.2 Bewertung der Methoden

### 4.2.1 Fällung A

In Tabelle 3 sind die erreichten Punktzahlen in den einzelnen Kriterien, sowie die Punktsumme aufgelistet. Diese Fällung erfolgte mit Chloroform und Methanol.

Tabelle 3: Bewertung der Fällung A.

Kriterium	erreichte Punktzahl
Geloptik	3
Handhabung	3
Praktikabilität	0
Aufwand	1
Dauer	3
Kosten	2
Summe	12

Das Gel wurde mit drei Punkten bewertet, das Gel zeigt eine befriedigende Optik. Die Trennung der Banden war ansprechend, aber das Gel lief nicht sehr gerade. Zudem sind die Banden nicht sehr scharf. Die Handhabung erwies sich als gut in Bezug darauf, dass die Phasentrennung erkennbar war, obwohl die Reaktionsgefäße aus trübem Kunststoff bestanden. Das erleichterte die Abnahme der oberen Phase. Dieser Aspekt wurde mit fünf Punkten bewertet. Die Pellets zeigten eine sehr schlechte

Festigkeit, sodass dieser Aspekt mit einem Punkt bewertet wurde. Der Mittelwert führt zu den vergebenen drei Punkten. Die Festigkeit der Pellets kann möglicherweise verbessert werden, indem länger und schneller zentrifugiert wird. Das Kriterium der Praktikabilität wurde mit null Punkten bewertet, da die Methode fünf Volumenänderungen beinhaltet. Der Aufwand wiederum wurde mit einem Punkt bewertet. Für die Durchführung der Fällung benötigt man mehrere Chemikalien, die allerdings nicht angesetzt werden müssen. Für die Dauer können drei Punkte vergeben werden, da keine Inkubation notwendig ist. Die Kosten werden mit zwei Punkten bewertet, weil nur gängige Chemikalien zum Einsatz kamen. D. Wessel beschreibt eine quantitative Präzipitation mit sehr hoher Effizienz [Wessel, Flügge 1984]. Die Methode liefert eine zuverlässige Fällung.

#### 4.2.2 Fällung B

Die erreichten Punkte der Methode B im Bewertungsschema sind in Tabelle 4 aufgeführt. Diese Fällung erfolgte wiederum mit Chloroform und Methanol.

Tabelle 4: Bewertung der Fällung B.

Kriterium	erreichte Punktzahl
Geloptik	3
Handhabung	2
Praktikabilität	0
Aufwand	1
Dauer	3
Kosten	2
Summe	11

Die Optik des Gels wurde mit drei Punkten bewertet. Die Trennung verlief befriedigend, der Lauf war nicht gerade und die Banden sind nicht sehr scharf. Das Kriterium der Handhabung erhielt in Bezug auf die Phasentrennung null Punkte, weil diese nicht erkennbar war. Die Phasentrennung war nicht sichtbar. Der trübe Kunststoff der Reaktionsgefäße erschwerte die Erkennung der Phasentrennung. Die Pellets wiederum waren fest, sodass hier vier Punkte erreicht werden. Im Mittel ergibt das eine Punktzahl von zwei. Im Verlauf der Fällung erfolgten vier Schritte, sodass für die Praktikabilität null Punkte vergeben werden. Die Zentrifugationen fanden bei einer ähnlichen Geschwindigkeit, wie bei Fällung A statt. Allerdings war die Zentrifugati-

onsdauer länger, sodass deshalb die Pellets möglicherweise fester waren. Der Aufwand war erhöht, da mehrere Chemikalien zum Einsatz kamen. Allerdings mussten diese nicht angesetzt werden. Daraus folgt ein Punkt. Auch bei dieser Methode entfällt eine Inkubation, weshalb für die Dauer drei Punkte vergeben werden. Zum Einsatz kamen nur gängige Laborchemikalien, weshalb für die Kosten zwei Punkte vergeben werden. E. Fic bewertet diese Methode als die beste der untersuchten, da die höchste Wiederfindungsrate erreicht werden konnte [Fic et al. 2010]. In dieser Arbeit lieferte die Methode ein befriedigendes Ergebnis.

### 4.2.3 Fällung C

Die für Methode C vergebenen Punkte und die Gesamtpunktzahl sind in Tabelle 5 aufgelistet. Hierfür wurde Aceton mit 20 mM DTT verwendet.

Tabelle 5: Bewertung der Fällung C.

<b>Kriterium</b>	<b>erreichte Punktzahl</b>
Geloptik	4
Handhabung	5
Praktikabilität	3
Aufwand	2
Dauer	2
Kosten	2
Summe	18

Das Gel erreicht vier Punkte, es zeigt eine gute Optik. Die Trennung war gut und die Banden zeigen eine ansehnliche Schärfe. Zudem ist das Gel deutlich gerader gelaufen. Für das Kriterium der Handhabung werden fünf Punkte vergeben, denn die Pellets wiesen eine gute Festigkeit auf, sodass von einem sehr geringen Verlust durch die Abnahme des Überstands ausgegangen werden kann. Im Bereich Praktikabilität erhält diese Methode drei Punkte, da nur einmal ein Volumen Reagenz zugegeben wird. Zwei Punkte werden für den Aufwand vergeben. Nur eine Chemikalie wird verwendet, allerdings muss diese angesetzt werden. Die Inkubationszeit ist eher kurz, dafür erhält die Methode zwei Punkte. Die Kosten werden ebenfalls mit zwei Punkten bewertet, DTT gehört zum Laborinventar. Das DTT verstärkt die Denaturierung der Proteine durch das Aceton. Dadurch erscheint eine zügige und gute Fällung erreicht

zu werden. Die Quantität der Fällung in der Publikation ist ähnlich hoch, wie bei Fällung B [Fic et al. 2010].

#### 4.2.4 Fällung D

In Tabelle 6 ist die Punktzahl der Methode D aufgelistet. Die Fällung erfolgte unter Verwendung von Aceton mit und ohne 20 mM DTT, sowie 20 %iger TCA.

Tabelle 6: Bewertung der Fällung D.

Kriterium	erreichte Punktzahl
Geloptik	5
Handhabung	1
Praktikabilität	1
Aufwand	0
Dauer	2
Kosten	1
Summe	10

Die Optik des Gels erhält fünf Punkte. Es gehört zu den besten Gelen. Die Trennung war sehr gut, die Banden sind überwiegend scharf und der Lauf war gerade. Bei der Durchführung dieser Fällung ergab sich eine eher schlechte Handhabung, auf Grund der sehr losen Pellets. Das ergibt sich vor allem bei den Proben „DL IMAC“, „Elu IMAC“ und „B II“. Diese Proben enthalten Guanidin. Dieses präzipitiert durch die Zugabe von TCA. Eventuell ist dieser Umstand ursächlich für die losen Pellets. Zunächst präzipitiert das Guanidin und geht durch die Zugabe von Aceton wieder in Lösung. Dadurch wird das Pellet zum Teil wieder resuspendiert, sodass es danach nicht mehr fest wird. Daraus folgt ein Punkt für dieses Kriterium. Die Durchführung umfasste drei Prozessschritte, weshalb für die Praktikabilität ein Punkt vergeben wird. Der Aufwand der Methode ist sehr hoch, da mehrere Chemikalien eingesetzt werden, die auch angesetzt werden müssen. Daraus folgen null Punkte. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde, weshalb hier zwei Punkte erreicht werden. Für die Methode werden spezielle Chemikalien benötigt, darum werden die Kosten mit einem Punkt bewertet. In der Publikation wird diese Fällung eher schlecht bewertet, weil die Ausbeute nur bei 33 % lag [Fic et al. 2010]. In dieser Arbeit lieferte die Methode eine befriedigende Fällung.

#### 4.2.5 Fällung E

Die Beurteilung dieser Methode anhand des Bewertungsschemas ist in Tabelle 7 aufgeführt. Die Fällung erfolgte mit Aceton.

Tabelle 7: Bewertung der Fällung E.

<b>Kriterium</b>	<b>erreichte Punktzahl</b>
Geloptik	4
Handhabung	5
Praktikabilität	3
Aufwand	3
Dauer	0
Kosten	2
Summe	17

Das Gel dieser Methode wird mit vier Punkten bewertet. Es zeigt eine gute Trennung, allerdings sind die Banden nicht sonderlich scharf. Der Lauf wiederum war sehr gerade. Während der Durchführung der Methode ergab sich durch die Festigkeit der Pellets eine gute Handhabung. Dieser Aspekt wird mit fünf Punkten bewertet. Vermutlich wird dieser Umstand durch die lange Inkubation, folglich einer guten Denaturierung der Proteine und der vergleichsweise langen Zentrifugation verursacht. Die Praktikabilität erscheint vorteilhaft, da nur ein Prozessschritt durchgeführt werden muss. Daraus folgen drei Punkte. Der Aufwand ist gering, nur eine Chemikalie ohne Ansatz kommt zum Einsatz. Daraus folgen drei Punkte. Den einzigen Nachteil dieser Methode stellt die Inkubationszeit von 16 Stunden und 25 Minuten dar. Dafür werden null Punkte vergeben. Die Kosten können mit zwei Punkten bewertet werden, weil nur eine gängige Chemikalie zum Einsatz kommt. L. Jiang bewertet diese Methode als gut, in der Publikation zeigt sich eine gute Wiedergewinnung. Allerdings soll die Methode weniger gut geeignet sein, wenn verdünnte Proben verwendet werden [Jiang et al. 2004]. In dieser Arbeit lieferte die Methode gute Ergebnisse.

#### 4.2.6 Fällung F

Die Bewertung dieser Methode ist folgender Tabelle 8 zu entnehmen. Als Fällungsmittel diente Ethanol.

Tabelle 8: Bewertung der Fällung F.

Kriterium	erreichte Punktzahl
Geloptik	3
Handhabung	5
Praktikabilität	2
Aufwand	3
Dauer	2
Kosten	2
Summe	17

Die Optik des Gels wird mit drei Punkten bewertet. Die Trennung war befriedigend und die Schärfe der Banden war gut. Der Lauf war etwas ungerade. Das Gel ist insgesamt sehr blass. Die Handhabung dieser Fällung erhält fünf Punkte, da die Pellets fest waren. Die Praktikabilität wird mit vier Punkten bewertet. Der Ethanol wird im massiven Überschuss zugegeben, was vermutlich zur schnellen Aggregation der Proteine führte. Diese begannen vermutlich schon während der Inkubationszeit zu sedimentieren, weshalb trotz sehr kurzer Zentrifugation feste Pellets entstanden sind. Zwar ist nur ein Prozessschritt notwendig, allerdings muss vor der Durchführung der Fällung das Ausgangsvolumen der Probe reduziert werden. Zu einem Ausgangsvolumen der Probe von 50  $\mu\text{L}$  hätten 2000  $\mu\text{L}$  Ethanol gegeben werden müssen. Das übersteigt das Fassungsvermögen der Reaktionsgefäße. Der Aspekt erhält deshalb zwei Punkte. Der Punktabzug kann vermieden werden, wenn die Proben vor Beginn nicht auf ein Volumen von 50  $\mu\text{L}$  gebracht würden. Drei Punkte erhält die Methode für den Aufwand, dieser ist gering. Nur eine Chemikalie wird verwendet, die nicht angesetzt werden muss. Die Inkubationszeit liegt bei einer Stunde, woraus für die Dauer zwei Punkte resultieren. Die Kosten sind ebenfalls mit zwei Punkten bewertet. Nur eine gängige Laborchemikalie kommt zum Einsatz. In der Veröffentlichung wurden guanidinhaltige Proben mit einer sehr guten Wiederfindungsrate präzipitiert [Pepinsky 1991]. Das Ergebnis lässt sich gut auf diese Arbeit übertragen, auch hier konnte ein gutes Ergebnis erzielt werden.

#### 4.2.7 Fällung G

In folgender Tabelle 9 ist die Bewertung der Methode G im Bewertungsschema aufgetragen. Die Fällung erfolgte mit 20 %iger TCA, sowie Aceton mit 20 mM DTT.

Tabelle 9: Bewertung der Fällung G.

Kriterium	erreichte Punktzahl
Geloptik	5
Handhabung	1
Praktikabilität	1
Aufwand	0
Dauer	2
Kosten	1
Summe	10

Das Gel wird mit fünf Punkten bewertet. Es zeigt eine sehr gute Optik. Die Trennung ist sehr gut und die Banden sind ansprechend scharf. Der Lauf ist zudem gerade. Die Handhabung dieser Methode erhält nur einen Punkt. Die Pellets nach beiden Zentrifugationen waren sehr lose. Das führt zu großem Verlust bei der Entfernung des Überstands, allerdings ist das im Gel nicht erkennbar. Ursächlich dafür ist möglicherweise, dass mit Zugabe der Trichloressigsäure neben den Proteinen auch das Guanidin präzipitiert. Das ergibt sehr große, lockere Pellets. Nach Zugabe des Acetons geht das Guanidin wieder in Lösung und das Pellet wird zum Teil resuspendiert und bleibt lose. Die Fällung umfasst drei Arbeitsschritte, weshalb die Praktikabilität mit einem Punkt bewertet wird. Für die Durchführung der Fällung werden zwei Reagenzien benötigt, die angesetzt werden müssen. Folglich wird der Aufwand mit null Punkten bewertet. Die Dauer wiederum ist eher kurz. Eine Inkubation für eine Stunde erfolgt. Das ergibt zwei Punkte. Durch die spezielle Chemikalie werden erhöhte Kosten verursacht. Dieser Aspekt wird mit einem Punkt bewertet. Die Methode erreichte in der Publikation keine gute Wiederfindung [Fic et al. 2010] und kann auch hier nicht uneingeschränkt empfohlen werden, trotz eines guten Gels.

#### 4.2.8 Fällung H

Die von der Fällung erreichten Punkte im Bewertungsschema sind in Tabelle 10 aufgeführt. Hier dienten eine 1 %ige NaDOC-Lösung, 50 %ige TCA und Aceton als Fällungsmittel.

Tabelle 10: Bewertung der Fällung H.

Kriterium	erreichte Punktzahl
Geloptik	2
Handhabung	5
Praktikabilität	0
Aufwand	0
Dauer	2
Kosten	1
Summe	10

Die Geloptik wird mit zwei Punkten bewertet, sie ist ausreichend. Die Trennung verlief befriedigend, aber die Schärfe war weniger gut. Zudem war der Lauf nicht ganz gerade. Die Handhabung war gut und erhält fünf Punkte. Die Pellets waren fest. Die Durchführung dieser Fällung umfasst vier Schritte, aber vor Beginn muss das Ausgangsvolumen reduziert werden. Zu einer Probe mit dem Ausgangsvolumen von 50  $\mu\text{L}$  hätten 450  $\mu\text{L}$  NaDOC 1 % und 2000  $\mu\text{L}$  TCA 50 % gegeben werden. Das Endvolumen hätte bei 2500  $\mu\text{L}$  betragen und übersteigt das Fassungsvermögen des Reaktionsgefäßes. Deshalb erhält die Methode null Punkte für den Aspekt Praktikabilität. Der Aufwand ist hoch, da mehrere Reagenzien angesetzt werden müssen. Das führt zu null Punkten. Die Dauer wird mit zwei Punkten bewertet. Die Inkubationszeit beträgt in Summe nur 30 Minuten. Die Kosten wiederum sind erhöht und erhalten einen Punkt. Zwei Chemikalien mussten angeschafft werden. NaDOC wird üblicherweise zur Solubilisierung von Membranproteinen eingesetzt. Da diese überwiegend hydrophob sind, hat NaDOC möglicherweise den gegenteiligen Effekt auf eher hydrophile Proteine, weshalb hier ein gutes Ergebnis erzielt werden konnte. Der gegenteilige Effekt kann auch durch die geringe Konzentration des NaDOC bedingt sein. In der Publikation konnten gute Ergebnisse mit der Fällung erzielt werden [Arnold, Ulbrich-Hofmann 1999]. Dort wurde ebenfalls die Fällung aus guanidinhaltigen Lösungen untersucht und eine hohe quantitative Wiederfindung erreicht.

#### 4.2.9 Fällung I

In Tabelle 11 ist die erreichte Punktzahl der einzelnen Kriterien für die Fällung I eingetragen. Diese Fällung erfolgte mit Ammoniumsulfat.

Tabelle 11: Bewertung der Fällung I.

<b>Kriterium</b>	<b>erreichte Punktzahl</b>
Geloptik	0
Handhabung	0
Praktikabilität	0
Aufwand	0
Dauer	1
Kosten	2
Summe	3

Die Optik des Gels wird mit null Punkten bewertet, sie ist ungenügend. Ursächlich dafür ist wahrscheinlich die Störung durch den hohen Salzgehalt der Proben. Die Trennung war sehr schlecht und die Schärfe der Banden ebenfalls. Der Lauf war zudem extrem schief, vermutlich ebenfalls durch das störende Salz. Während der Durchführung dieser Methode ergaben sich sehr große, krümelige und extrem lose Pellets. Eine Wandhaftung war nicht erkennbar. Deshalb wird der Aspekt Handhabung mit null Punkten bewertet. Die Durchführung umfasste vier Arbeitsschritte. Das ergibt null Punkte für den Aspekt Praktikabilität. Der Ansatz der gesättigten Ammoniumsulfatlösung war mit dem höchsten Aufwand aller Ansätze verbunden. Eine weitere Chemikalie musste angesetzt werden, sodass für den Aufwand ebenfalls null Punkte vergeben werden. Die Dauer erhält einen Punkt. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden und 15 Minuten. Die verwendeten Chemikalien gehören zum Inventar sodass die Kosten mit zwei Punkten bewertet werden.

Eine Optimierung der Methode müsste eine Reduktion des Salzgehalts der Proben zum Ziel haben. Das kann erreicht werden, indem im Anschluss an die Fällung eine Dialyse oder eine Größenausschlusschromatographie im Entsalzungsmodus durchgeführt wird. Dieses Procedere widerspricht aber dem Ziel, eine einfache, schnelle und leicht zu implementierende Aufbereitungsmethode zu finden. Folglich kann diese Methode nicht empfohlen werden.

In der Publikation von L. Jiang kann kein störender Effekt des Salzes auf das Gel festgestellt werden. Allerdings enthielten die Proben kein Guanidin, was den Unterschied erklären könnte [Jiang et al. 2004].

#### 4.2.10 Methode J

Diese Methode wurde ebenfalls dem Bewertungssystem unterzogen. Die erreichten Punkte sind in Tabelle 12 übersichtlich zusammengefasst. Es handelt sich um die Filtrationsmethode.

Tabelle 12: Bewertung der Methode J.

Kriterium	erreichte Punktzahl
Geloptik	0
Handhabung	1
Praktikabilität	1
Aufwand	2
Dauer	1
Kosten	0
Summe	5

Das Gel wurde mit null Punkten bewertet. Es ergab sich eine ungenügende Trennung und die Banden sind zum Teil nicht erkennbar. Die Bewertungskriterien müssen für diese Methode etwas angepasst werden. Das Kriterium der Handhabung bezieht sich hier nicht auf Pellets. Das Volumen der Proben wurde unterschiedlich schnell reduziert. Die Proben „Auftrag“, „DL“ und „Elu IMAC“ mussten am längsten zentrifugiert werden. Möglicherweise stört das Guanidin oder die hohe Viskosität bedingt durch das Guanidin den Übertritt der Flüssigkeit über die Membran. Die Handhabung der Membrantubes war aber einfach und selbsterklärend, deshalb erhält die Methode für diesen Aspekt einen Punkt. Der Aspekt der Praktikabilität wird mit einem Punkt bewertet. Vor Durchführung der Filtration mussten die Proben speziell verdünnt werden. Nach Applikation in das Tube erfolgte nur noch eine weitere Volumenzugabe. Dadurch ergeben sich nach Definition des Kriteriums drei Schritte bzw. ein Punkt. Die Geloptik wurde mit einem Punkt beurteilt. Für den Waschschrift wird ein Puffer benötigt, der angesetzt werden muss. Folglich erhält die Methode für den Aspekt Aufwand zwei Punkte. Die Dauer bezieht sich bei den Fällungen auf die Inkubationszeiten. Diese entfällt hier. Auch wurden Zentrifugationsschritte bisher unter

dem Aspekt Praktikabilität berücksichtigt. Da diese Methode aber vom üblichen Schema abweicht, wird die Zentrifugationsdauer anstelle der Inkubationszeit unter dem Aspekt Dauer betrachtet. Die Zentrifugationen dauerten in Summe 94 Minuten. Für den Aspekt Dauer wird ein Punkt vergeben. Die benötigten Membrantubes der Firma Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Deutschland) sind ein Spezialprodukt. Folglich wird das Kriterium Kosten mit null Punkten bewertet.

### 4.3 Vergleich der Methoden

Die Entscheidung darüber, welche Methode am besten geeignet ist, soll anhand des unter 3.5 beschriebenen Bewertungsschemas stattfinden. Die maximal zu erreichende Gesamtpunktzahl beträgt 21 Punkte. Keine Methode erreichte diese. In Tabelle 13 werden die erreichten Punktzahlen übersichtlich dargestellt. Zudem erfolgt direkt eine Sortierung nach der Punktzahl.

Tabelle 13: Übersicht über die erreichten Gesamtpunktzahlen der Methoden, sowie die Gewichtung mittels Ranking.

Rang	Methode	Punktzahl
1	C	18
2	E	17
2	F	17
4	A	12
5	B	11
6	D	10
6	G	10
6	H	10
9	J	5
10	I	3

Im Falle gleicher Punktzahl wurden die Methoden alphabetisch sortiert. Entsprechend dieser Darstellung ist die Fällung C am besten geeignet, um die Prozessproben aufzuarbeiten. Dabei handelt es sich um eine Acetonfällung mit DTT. Sie erreicht mit 18 Punkten das beste Ergebnis. Ebenfalls geeignet sind die Fällungen E und F, die jeweils 17 Punkte erhalten. Die Methode E ist gleichermaßen eine Acetonfällung und die Methode F ist eine Ethanol-fällung.

Die drei Methoden gehören vom Ablauf her zu den einfachsten, die durchgeführt wurden. Die hohe Punktzahl kommt natürlich auch zustande, weil der Aspekt der Handhabbarkeit stark gewichtet wurde. Fällung E erhielt einen Punktabzug bei dem Aspekt der Inkubationsdauer. Diese wurde mit „über Nacht“ angegeben und dauerte in diesem Fall 16 Stunden und 25 Minuten. Eine Inkubation über Nacht kann aber auch von Vorteil sein, da die Weiterbearbeitung der Proben nicht am gleichen Tag erfolgen muss.

Die Unterschiede zwischen den beiden Acetonfällungen (Fällung C und E) liegen zum einen im zugesetzten DTT bei Fällung C. Das führt zur unterschiedlichen Punktzahl im Bereich Aufwand. Zum anderen ist die Inkubationszeit für Fällung C nur mit einer Stunde veranschlagt, was zum Vorteil bei dem Kriterium der Dauer führt. Eventuell führt das DTT durch seine denaturierende Eigenschaft also zu einer schnelleren Präzipitation, als wenn Aceton alleine verwendet wird. Hier bietet sich ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. So könnte die Methode E einmal mit Aceton inklusive 20 mM DTT durchgeführt werden, aber mit verkürzter Inkubationszeit. Andererseits könnte auch die Inkubationszeit allein untersucht werden, indem sie bei Methode E auf eine Stunde verkürzt wird. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Methoden liegt in dem variierenden Acetonvolumen, welches zugegeben wurde. So wurden bei Fällung C 200  $\mu\text{L}$  Aceton und bei Methode E 150  $\mu\text{L}$  hinzugefügt. Auch dieser Umstand scheint wenig Einfluss auf das Ergebnis der Fällung zu haben. Allerdings könnte das größere Volumen eine höhere Effektivität haben, sodass bei kürzerer Inkubationszeit ein ähnliches Ergebnis erzielt wird.

Die Ethanolfällung F wurde ebenfalls mit 17 Punkten bewertet, kann aber nicht uneingeschränkt empfohlen werden. Das Gel erhielt nur drei Punkte. Diese Methode zeigte sich allerdings vorteilhaft in Bezug auf Handhabung und Praktikabilität. Der Punktabzug bei diesem Aspekt kam dadurch zustande, dass die Proben ein Ausgangsvolumen von 50  $\mu\text{L}$  hatten. Wenn dem Volumen entsprechend Ethanol zugegeben worden wäre, hätten 2000  $\mu\text{L}$  Ethanol hinzugefügt werden müssen. Das übersteigt das Fassungsvermögen der Reaktionsgefäße von 1500  $\mu\text{L}$ . Wenn aber das Ausgangsvolumen der Proben von vornherein kleiner gewählt würde, entfielen der Schritt der Volumenreduktion. Die Praktikabilität wäre gesteigert. Die Präzipitationseffizienz von Ethanol ist geringer als von Aceton, weshalb so ein großer Überschuss Ethanol verwendet wird.

Unter Abschnitt 4.1 werden nach Beurteilung der Optik auch die Methoden D und G empfohlen. Nach Auswertung der weiteren Kriterien kann dieser Empfehlung nicht mehr uneingeschränkt gefolgt werden, da die Handhabung und Praktikabilität deutlich schlechter bewertet wurden. Die beiden Methoden erhielten insgesamt nur 10 Punkte. Ob die Methoden trotzdem gewählt werden, hängt von der Auslegung des Anwenders ab.

Um eine weiter gehende Untersuchung der Fällungseffizienz der Methoden zu erreichen, stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Dazu gehören beispielsweise die densitometrische Untersuchung der Banden und die Messung der Proteinkonzentration vor und nach der Fällung.

Die empfohlene Methode beinhaltet die Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Aceton mit 20 mM DTT zum Probenvolumen von 50  $\mu\text{L}$ . Im Anschluss folgt die Inkubation für eine Stunde bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  und die Zentrifugation (10.000 x g, 15 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ).

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war es, eine Aufbereitungsmethode zu finden, die sich leicht in den Downstreamprozess zur Aufbereitung des DV-2-Hüllproteins integrieren lässt. Der Prozess soll während der Optimierung schnell und leicht bewertet werden. Daher ist die Methode der Wahl die SDS-PAGE. Im Downstreamprozess muss Guanidin in einer sehr hohen Konzentration zugegeben werden. Das Guanidin denaturiert das Zielprotein. In der Folge kann es nicht zu VLPs aggregieren und eine Aufreinigung mittels Chromatographie ist möglich. Das Guanidin stört aber in der SDS-PAGE, weil Guanidin mit SDS Komplexe bildet und ausfällt. Um die guanidinhaltigen Prozessproben für die SDS-PAGE zugänglich zu machen, sollen diese aufbereitet werden. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit zehn Methoden untersucht. Insgesamt erfolgte die Erprobung von neun Fällungen und einer Filtrationsmethode. Bei acht der neun Fällungen kamen organische Lösungsmittel zum Einsatz, bei der neunten diente mit Ammoniumsulfat das einzige Salz als Fällungsmittel. In der anschließenden Auswertung wurde die Erfüllung der Kriterien bewertet. Da die Methode in einen komplizierten und umfangreichen Downstreamprozess integriert werden soll, sind die Handhabung und die Praktikabilität die wichtigsten Kriterien. Über allem steht aber natürlich die Geloptik. Ebenfalls in die Bewertung einbezogen wurden die Aspekte des Aufwands, der Dauer und der Kosten. Nach Auswertung aller Methoden hinsichtlich der genannten Kriterien, erwies sich keine Methode als perfekt. Allerdings konnten drei Methoden gefunden werden, die die Ansprüche hinreichend erfüllen. Diese sind zwei unterschiedliche Acetonfällungen und eine Ethanol-fällung. Diese Fällungen lieferten die überzeugendsten Ergebnisse bei ansprechender Handhabbarkeit und Praktikabilität und werden für die Integration in den Downstreamprozess empfohlen. Welche Methode letztendlich gewählt wird, hängt davon ab, welche Vorlieben bezüglich der Inkubationszeit und der Reagenzien vorliegen.

## I Literaturverzeichnis

- Arnold, U., Ulbrich-Hofmann, R. (1999): *Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid*, Analytical Biochemistry 271(2): 197-199
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O. (2013): *The global distribution and burden of dengue*, Nature 496(7446): 504-507
- Fic, E., Kedracka-Krok, S., Jankowska, U., Pirog, A., Dziedzicka-Wasylewska, M. (2010): *Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis*, Electrophoresis 31(21): 3573-3579
- Gubler, D. J. (2002): *Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century*, Trends in microbiology 10(2): 100-103
- Jiang, L., He, L., Fountoulakis, M. (2004): *Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis*, Journal of Chromatography A 1023(2): 317-320
- Laemmli, U. K. (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*, Nature 227: 680-685
- Mani, S., Tripathi, L., Raut, R., Tyagi, P., Arora, U., Barman, T., Sood, R., Galav, A., Wahala, W., de Silva, A. (2013): *Pichia pastoris-expressed dengue 2 envelope forms virus-like particles without pre-membrane protein and induces high titer neutralizing antibodies*, PloS one 8(5): e64595
- Nayak, V., Dessau, M., Kucera, K., Anthony, K., Ledizet, M., Modis, Y. (2009): *Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion*, Journal of virology 83(9): 4338-4344
- Pepinsky, R. B. (1991): *Selective precipitation of proteins from guanidine hydrochloride-containing solutions with ethanol*, Analytical Biochemistry 195(1): 177-181
- Rigau-Pérez, J. G., Clark, G. G., Gubler, D. J., Reiter, P., Sanders, E. J., Vorndam, A. V. (1998): *Dengue and dengue haemorrhagic fever*, The Lancet 352(9132): 971-977
- Schwartz, L. M., Halloran, M. E., Durbin, A. P., Longini, I. M. (2015): *The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control*, Vaccine 33(29): 3293-3298

---

Scopes, R. K. (1987): *Separation by precipitation*: 41-71

Shang, W., Liu, J., Yang, J., Hu, Z., Rao, X. (2012): *Dengue virus-like particles: construction and application*, Applied Microbiology and Biotechnology 94(1): 39-46

Shih, Y., Prausnitz, J. M., Blanch, H. W. (1992): *Some characteristics of protein precipitation by salts*, Biotechnology and bioengineering 40(10): 1155-1164

Wessel, D., Flügge, U. (1984): *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*, Analytical Biochemistry 138(1): 141-143

Zhang, Y., Cremer, P. S. (2006): *Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series*, Current opinion in chemical biology 10(6): 658-663

## II Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Ae.	<i>Aedes</i> , Gattung der Familie der Stechmücken
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Capsidprotein des Denguevirus
ca.	circa
D1M1H	rekombinantes Oberflächenprotein des Malariaerregers <i>Plasmodium falciparum</i>
DV	Denguevirus
DHF	Dengue Hämorrhagisches Fieber
DL	Durchlauf
DTT	Dithiotreitol
DVE-2	Hüllprotein des Denguevirus Typ 2
E	Hüllprotein des Denguevirus (von envelope)
Elu	Elutionsfraktion
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Hydrogenphosphat-Anion
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Dihydrogenphosphat-Anion
IMAC	immobilized metal ion affinity chromatography, Metall- chelatchromatographie, Affinitätschromatographie
kp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Membranprotein des Denguevirus
M	molar
mM	millimolar
min	Minute
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid

---

NaDOC	Natriumsalz der Desoxycholsäure
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
pI	isoelektrischer Punkt
$\text{PO}_4^{3-}$	Phosphat-Anion
prM	Prämembranprotein des Denguevirus
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gelelectrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	volume per volume, Volumenkonzentration
VE H <sub>2</sub> O	voll entmineralisiertes Wasser
vgl.	vergleiche
VLPs	virus like particles, virusähnliche Partikel
x g	multipliziert mit g, der Erdbeschleunigung

### III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Downstreamprozess zur Aufreinigung des Zielproteins aus den Zellen der <i>Pichia pastoris</i> .....	5
Abbildung 2: Verhalten der Löslichkeit bei steigender Salzkonzentration, log S steht für Logarithmus der Solubility (Löslichkeit). (adaptiert aus [Shih et al. 1992]) .....	7
Abbildung 3: Hofmeisterreihe der Anionen. Die links von Cl <sup>-</sup> stehenden Anionen werden als kosmotrop bezeichnet, die rechts davon als chaotrop. Die kosmotropen Ionen sind stark hydratisiert, erhöhen die Proteinstabilität und führen zur Präzipitation von Proteinen und Makromolekülen. Die chaotropen Ionen destabilisieren gefaltete Proteine, erhöhen die Löslichkeit von Makromolekülen und Proteinen und führen somit zum Salting-in. (Abbildung übernommen von [Zhang, Cremer 2006])...	8
Abbildung 4: Die Interaktion des organischen Lösungsmittels mit den hydrophoben Bereichen des Proteins führt zur Aggregation der Proteine. (Abbildung übernommen aus [Scopes 1987]) .....	10
Abbildung 5: Gele der Fällungen A bis H. Die Probenbezeichnungen gelten für alle Gele, genauso die Markermarkierungen. Die Bezeichnung der Gele befindet sich jeweils in der rechten oberen Ecke. ....	23
Abbildung 6: Gele der Fällung I und der Methode J. ....	24

**IV Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Übersicht über die Probenverdünnungen .....	15
Tabelle 2: Beurteilungskriterien für die Methoden, inklusive Beschreibung und erreichbarer Punktzahl. ....	20
Tabelle 3: Bewertung der Fällung A. ....	26
Tabelle 4: Bewertung der Fällung B. ....	27
Tabelle 5: Bewertung der Fällung C. ....	28
Tabelle 6: Bewertung der Fällung D. ....	29
Tabelle 7: Bewertung der Fällung E. ....	30
Tabelle 8: Bewertung der Fällung F. ....	31
Tabelle 9: Bewertung der Fällung G. ....	32
Tabelle 10: Bewertung der Fällung H. ....	33
Tabelle 11: Bewertung der Fällung I. ....	34
Tabelle 12: Bewertung der Methode J. ....	35
Tabelle 13: Übersicht über die erreichten Gesamtpunktzahlen der Methoden, sowie die Gewichtung mittels Ranking. ....	36