



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

HAW Hamburg-Fakultät Life Sciences

Biotechnologie

Bachelorarbeit

**Einfluss des Puffersystems auf die Durchbruchkurve von Ovotransferrin, Ovalbumin
und Rinderserumalbumin in der präparativen Anionenaustauschchromatographie**

Vorgelegt von:

Lauritz Wilkowsky



1. Gutachter:

Herr Prof. Dr. Birger Anspach

2. Gutachterin:

Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen

Zeitraum: 27.03.2019 bis 05.06.2019

INHALT

1. Einleitung.....	3
2. Theoretischer Hintergrund.....	3
2.1 Ionenaustauschchromatographie.....	3
2.2 Funktionelle Gruppe der Säule.....	9
2.3 Säulenmatrix.....	10
2.4 Proteine.....	12
2.4.1 Ovotransferrin.....	12
2.4.2 Ovalbumin.....	12
2.4.3 Rinderserumalbumin.....	13
2.5 Puffer.....	13
2.5.1 BisTris.....	17
2.5.2 Imidazol.....	17
2.5.3 Phosphat.....	18
2.5.4 HEPES.....	18
2.6 Größenausschlusschromatographie.....	19
2.7 SDS-PAGE.....	19
3. Material und Methoden.....	20
3.1 Material.....	20
3.1.1 Chemikalien.....	20
3.1.2 Proteine.....	20
3.1.3 Säulen.....	21
3.1.4 Geräte.....	21
3.2 Methoden.....	21
3.2.1 Equilibrierung.....	21
3.2.2 Auftragen der Proteinlösung auf die Säule.....	22
3.2.3 Elution des gebundenen Proteins.....	22
3.2.4 Reinigung der Säule.....	22
3.2.5 Mittelung der Ergebnisse.....	22
3.2.5 Integration der Ergebnisse.....	23
3.2.6 Berechnung der Nettoladung der Proteine.....	23
3.2.7 Berechnung Ladung der Puffer.....	24
3.2.8 Herstellung der selbstgepackten Säule.....	26
3.2.9 Größenausschlusschromatographie.....	27
3.2.10 SDS-PAGE.....	27
4. Ergebnisse.....	27

4.1	Größenausschlusschromatographie.....	28
4.2	SDS-Page	32
4.2	Frontalchromatographie	33
5.	Diskussion.....	54
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	56
7.	Literaturverzeichnis	57
	Literatur	57

1. EINLEITUNG

In dieser Arbeit sollen Effekte in der Anionenaustauschchromatographie näher untersucht werden, die sich auf das Adsorptionsverhalten von Proteinen auswirken. Hierbei werden die Effekte ausschließlich in der Frontalchromatographie untersucht, nicht in der Zonalchromatographie. Die Untersuchung von drei Effekten steht hierbei im Vordergrund. Der erste Schwerpunkt ist darauf ausgerichtet, wie sich das Adsorptionsverhalten von verschiedenen Proteinen unterscheidet. Hier werden drei verschiedene Proteine miteinander in ihren Eigenschaften und ihrem Adsorptionsverhalten verglichen, um von Proteineigenschaften auf Effekte im Adsorptionsverhalten Rückschlüsse ziehen zu können. Diese Proteine sind Ovalbumin, Ovotransferrin und Rinderserumalbumin. Zu Ovalbumin und Rinderserumalbumin gibt es bereits Arbeiten, die das Adsorptionsverhalten der Proteine untersuchen, allerdings in einem anderen pH-Bereich. Dennoch wird auf diese Arbeiten Bezug genommen und es werden Vergleiche angestellt. Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigt sich mit verschiedenen Puffersalzen und deren Einfluss auf das Adsorptionsverhalten der drei Proteine. Hierbei sollen auch die Auswirkungen des Puffersystems auf den Massentransport und die ionischen Wechselwirkungen zwischen Protein und stationärer Phase untersucht werden. Hier soll insbesondere betrachtet werden, welchen Einfluss unterschiedlich stark geladene Puffer haben. Der dritte Schwerpunkt beschäftigt sich mit dem Einfluss der stationären Phase auf das Adsorptionsverhalten. Hierbei werden die beiden funktionellen Gruppen Diethylaminoethyl und Quarternäres Aminomethyl miteinander verglichen. Außerdem werden zwei Säulenmaterialien mit unterschiedlich langem Spacer zwischen funktioneller Gruppe und Säulenmatrix untersucht.

Da die Ergebnisse miteinander vergleichbar sein sollen, muss ein pH- Bereich gewählt werden, indem alle Säulen als Anionenaustauscher wirken können und alle Proteine eine negative Nettoladung besitzen. Hierdurch ergibt sich ein pH- Bereich von 6,5 bis 8. Die verwendeten Puffer werden entsprechend dieses pH-Bereichs ausgewählt.

2. THEORETISCHER HINTERGRUND

2.1 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie gehört zur Flüssigchromatographie. Die zu untersuchende Substanz wird in einer Flüssigkeit gelöst. Dies ist meist eine Pufferlösung mit definierter Salzkonzentration und definiertem pH-Wert, die mobile Phase. Außerdem handelt es sich um eine Säulenchromatographie, somit bildet eine Säule die stationäre Phase des Systems. Diese Säule beinhaltet eine poröse Matrix, an welche funktionelle Gruppen gebunden sind. Diese

funktionelle Gruppe interagiert mit der mobilen Phase und der darin enthaltenen Stoffe aufgrund von Ladungen. Dies funktioniert aber nur dann, wenn die funktionelle Gruppe der Säule und die Substanz, welche an die Säule binden soll, entgegengesetzte Ladungen besitzen. Es wird zwischen Anionenaustauschchromatographie und Kationenaustauschchromatographie unterschieden. Bei der Anionenaustauschchromatographie ist die funktionelle Gruppe an der Säule positiv geladen, während die Substanz in der mobilen Phase negativ geladen ist. Umgekehrt ist es bei der Kationenaustauschchromatographie. Hierbei spielt der pH-Wert eine große Rolle, denn er kann sowohl die Ladung der stationären Phase beeinflussen, als auch die Ladung der mobilen Phase. Bei der Anionenaustauschchromatographie muss der pH-Wert der mobilen Phase über dem pK_s -Wert der Substanz liegen, welche an die Säule binden soll, damit die Substanz negativ geladen ist. Bei Proteinen muss der pH-Wert über dem pI , dem isoelektrischen Punkt des Proteins, liegen, damit die Nettoladung des Proteins negativ ist. Um eine ausreichend negative Nettoladung des Proteins zu gewährleisten, sollte der pH-Wert mindestens eine Einheit über dem pI des Proteins liegen. Ob der pH-Wert auch die Ladung der stationären Phase beeinflusst, hängt davon ab, ob es sich um eine starke funktionelle Gruppe oder eine schwache funktionelle Gruppe handelt. Die Ladung einer starken funktionellen Gruppe bleibt vom pH-Wert unbeeinflusst, während die Ladung einer schwachen funktionellen Gruppe durch den pH-Wert beeinflusst wird. Bei der Anionenaustauschchromatographie sollte der pH-Wert mindestens eine Einheit unter dem pK_s -Wert der funktionellen Gruppe der stationären Phase liegen, um eine ausreichend positive Ladung zu gewährleisten. Bei der Kationenaustauschchromatographie verhält es sich genau umgekehrt. Der pH-Wert sollte mindestens eine Einheit unter dem pK_s -Wert der Substanz bzw. pI des Proteins in der mobilen Phase liegen und mindestens eine Einheit über dem pK_s -Wert der funktionellen Gruppe an der stationären Phase [(1) B. Anspach].

Bevor diese Bindung allerdings erfolgen kann, ist zuerst eine Equilibrierung der stationären Phase erforderlich. Hierbei wird die mobile Phase mit bereits eingestelltem pH-Wert und definierter Salzkonzentration, allerdings noch ohne die Substanz, welche gebunden werden soll, auf die Säule gegeben. Dies ist nötig, da sich erst ein Gleichgewicht in Bezug auf die Ladungsträger zwischen mobiler und stationärer Phase einstellen muss. Anschließend kann dann die mobile Phase mitsamt der zu bindenden Substanz auf die Säule gegeben werden. Hier binden neben der gewünschten Substanz aber auch alle anderen Substanzen, welche eine entgegengesetzte Ladung zur stationären Phase besitzen. Dies können andere Proben sein, aber auch Verunreinigungen oder Bestandteile des verwendeten Puffers. Nach der Bindung kann die Elution erfolgen. Diese Elution kann entweder durch einen pH-Wechsel oder eine erhöhte

Salzkonzentration verursacht werden. Bei dem pH-Wechsel wird der pH-Wert verändert, was eine Veränderung der Ladung der gebundenen Substanzen bewirkt. Aufgrund dieser Ladungsänderung werden die Substanzen nicht länger von der stationären Phase gebunden und daher freigegeben. Die Elution kann als Gradient oder als Sprung erfolgen. Bei einer Gradientenelution eluieren zuerst die Substanzen deren Ladung und damit auch Bindung durch den pH-Wechsel am schnellsten beeinflusst wird. Bei der Elution mit einer erhöhten Salzkonzentration treten die Salzionen in Konkurrenz zur gebundenen Substanz an der stationären Phase und verdrängen diese. Auch hier werden bei einer Gradientenelution zuerst die Substanzen mit der schwächsten Bindung eluiert. Somit ist es hiermit möglich, die gebundenen Substanzen nach ihrer Bindungsstärke zu trennen [(1) B. Anspach].

Des Weiteren wird zwischen Zonalchromatographie und Frontalchromatographie unterschieden. Bei der Zonalchromatographie wird nach der Equilibrierung nur ein verhältnismäßig geringes Volumen aufgetragen. Anschließend erfolgt dann die Elution der gebundenen Substanzen. In einigen Fällen erfolgt vor der Elution noch ein Waschschrift. Die ungebundenen Substanzen sowie eluierten gebundenen Substanzen, können dann als Peaks detektiert werden und auch mittels eines Fraktionierers aufgefangen werden. Dieses Verfahren wird zum Beispiel in der Analytik eingesetzt, um eine Probe auf unterschiedlich geladene Substanzen zu untersuchen.

In der Frontalchromatographie findet hingegen nach der Equilibrierung ein kontinuierlicher Probenauftrag statt. Hierbei ist zu Beginn noch keine Substanz an die stationäre Phase gebunden, somit ist die stationäre Phase frei zugänglich und Substanzen aus der mobilen Phase können schnell an diese binden. Mit der Zeit ist die stationäre Phase aber immer stärker besetzt und in der Folge kann immer weniger der Substanz noch an die stationäre Phase binden, bis die stationäre Phase schließlich vollständig besetzt ist. Wird die Konzentration am Ausgang der Säule gemessen, ergibt sich eine Durchbruchskurve. Hierbei liegt die Konzentration am Anfang bei null und steigt schließlich bis zur Konzentration am Eingang der Säule. Diese Durchbruchskurve hat häufig einen sigmoidalen Verlauf. Frontalchromatographie kann dazu eingesetzt werden dynamische und statische Kapazität der Säule in diesem Versuch zu ermitteln. Außerdem wird sie häufig zur Aufreinigung in der Industrie eingesetzt [(1) B. Anspach].

Die statische Kapazität einer Säule gibt an, wie viel des jeweiligen Proteins unter den gegebenen Versuchsbedingungen maximal an die Säule binden kann. Solche statischen Kapazitäten können aber immer nur auf das jeweilige Protein unter den gleichen Versuchsbedingungen angewendet werden. So hätte ein anderes Protein mit einer anderen

Größe auch eine andere statische Kapazität, da es mehr oder weniger Platz an der Oberfläche der stationären Phase einnehmen könnte. Ein anderer pH-Wert könnte auch andere Ladungen an der stationären Phase oder der zu bindenden Substanz bedeuten. Somit könnten die Kräfte zwischen diesen auch stärker oder schwächer werden, was einen Einfluss auf das Reaktionsgleichgewicht hätte. Somit würde sich auch wieder eine andere statische Kapazität ergeben. Die statische Kapazität ist also nur begrenzt übertragbar auf andere Versuche. Sie ist allerdings unabhängig von der Fließgeschwindigkeit. Abbildung 1 zeigt hierbei eine exemplarische Durchbruchskurve. Um aus einer Durchbruchskurve die statische Kapazität zu berechnen, muss die Fläche ermittelt werden, welche zwischen der Kurve und $c/c_0=1$ liegt. Hierfür gibt es unterschiedliche Verfahren. Das in dieser Arbeit angewendete Verfahren wird im Methodenteil beschrieben. Diese Fläche muss dann mit c_0 multipliziert werden. Zeigt die Durchbruchskurve eine Punktsymmetrie wie in dem Beispiel kann auch das Volumen, bei dem die Kurve $c/c_0=0,5$ erreicht mit c_0 multipliziert werden [(1) B. Anspach].

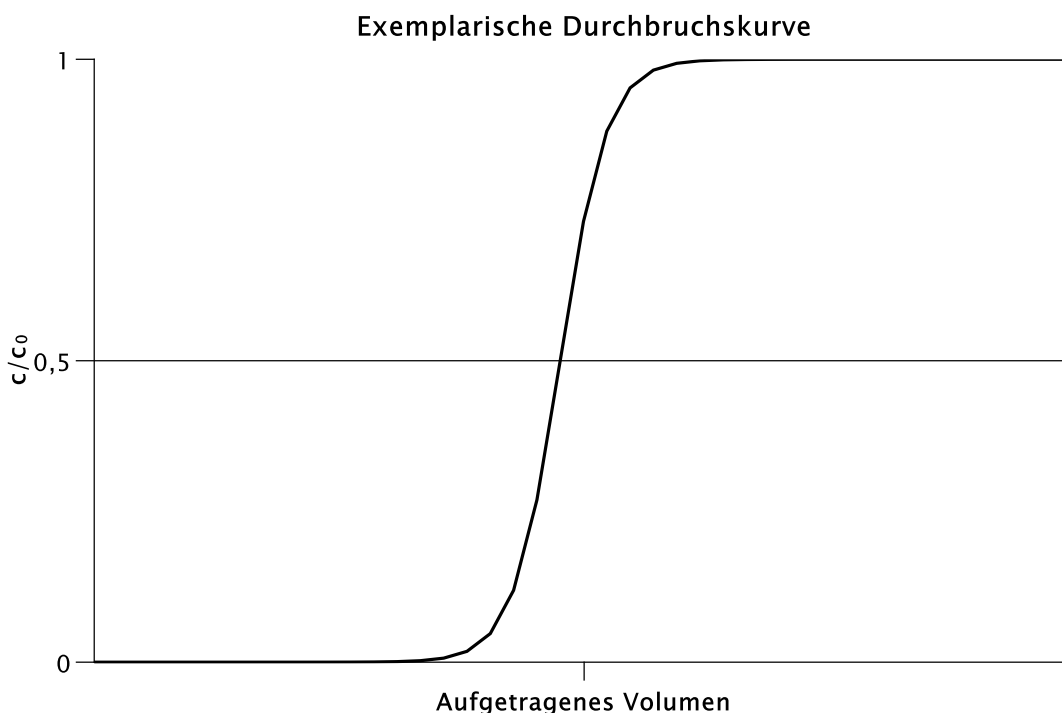


Abbildung 1: Exemplarische Durchbruchskurve mit sigmoidalem Verlauf. Im Verlauf der Abzisse nimmt das auf die Säule aufgetragene Volumen zu. An der Ordinate ist die Ausgangskonzentration dividiert durch die Eingangskonzentration aufgetragen.

In einem präparativen Prozess ist es allerdings wenig sinnvoll die gesamte statische Kapazität einer Säule zu nutzen. Denn die Fläche unter der Kurve stellt den Anteil dar, der bei dem

Prozess nicht an die Säule bindet und dann als Verlust auftritt. Zu Anfang ist das Verhältnis zwischen gebundenem Protein und Verlust noch sehr gut. Mit zunehmendem Volumen wird dieses Verhältnis allerdings immer schlechter. Aus diesem Grund wird bei präparativen Prozessen nur ein Teil der statischen Kapazität genutzt. Hierbei sind die dynamischen Kapazitäten zu beachten. Die dynamische Kapazität gibt die Menge des gebundenen Proteins bis zu einer bestimmten Verlustrate an. Beispielsweise die Menge des gebundenen Proteins bis ein Verlustverhältnis von $c/c_0=0,1$ erreicht wird. Je nach Kostenpunkt des Proteins kann dieses Verlustverhältnis aber auch einen anderen Wert annehmen. Bei der dynamischen Kapazität nehmen zahlreiche Faktoren Einfluss, auch die Fließmittelgeschwindigkeit. Die Versuchsbedingungen werden so gewählt, dass die dynamische Kapazität der statischen möglichst nah kommt, sofern hierdurch keine anderen Nachteile, wie beispielsweise ein zu großer Zeitaufwand entstehen [(1) B. Anspach]. Zwei Faktoren spielen für die Differenz zwischen statischer Kapazität und dynamische Kapazität eine Rolle. Dies ist zum einen die Adsorptionskinetik. Ist die Adsorptionskinetik sehr langsam, wirkt sich dies negativ auf die dynamische Kapazität aus, da im Gegensatz zur statischen Kapazität für die Adsorption nicht unendlich viel Zeit gegeben ist. Bei der Ionenaustauschchromatographie läuft die Adsorption allerdings sehr schnell ab [(1) B. Anspach]. Insofern hat die Adsorptionskinetik keinen großen Einfluss auf das Verhältnis von dynamischer und statischer Kapazität.

Der zweite Faktor ist der Massentransport. Dieser kann mitunter stark limitierend auf die dynamische Kapazität wirken. In der Säule können in Bezug auf den Massentransport zwei unterschiedliche Bereiche unterschieden werden. Dies ist zum einen der Bereich zwischen den Partikeln, in diesem unterliegt der Massentransport nur geringen Limitierungen. Der Massentransport läuft in diesem Bereich hauptsächlich durch die Konvektion ab. Diffusion spielt in diesem Bereich eher eine untergeordnete Rolle. Der zweite Bereich ist das poröse System innerhalb der Partikel und ein schmaler Film um den Partikel. So nimmt die Strömungsgeschwindigkeit mit zunehmender Nähe zum Partikel ab. Um den Partikel herum bildet sich dann ein schmaler Film, der keiner Strömung unterliegt. Der Massentransport durch diesen Film in das Porensystem und innerhalb des Porensystems ist fast nur noch durch Diffusion gegeben. Die Konvektion spielt in diesem Bereich nur eine sehr geringere Rolle. In diesem Bereich kann der Massentransport unter Umständen sehr stark limitiert sein. Wichtige Größen sind hier die Partikelgröße und die Porengröße[G. Carta und A. Jungbauer (2)].

Zum einen sorgen kleinere Partikel auf demselben Volumen nach dem Prinzip der Oberflächenvergrößerung für eine größere Oberfläche. Somit gibt es auch mehr Fläche, an die Substanzen adsorbieren können. Die statische Kapazität einer Säule kann also durch kleinere

Partikel steigen. Zum anderen hat die Partikelgröße Einfluss auf die Länge der Diffusionswege. Somit sorgen kleinere Diffusionswege dafür, dass die Substanz in der mobilen Phase schneller auf die stationäre Phase stößt und somit schneller gebunden wird [(1) Anspach].

Poren müssen groß genug sein, damit die Substanzen, hier Proteine, in das Porensystem gelangen können. Außerdem erschweren kleinere Poren auch den weiteren Massentransport, da die Diffusion in viele Richtungen behindert wird. So wird unter Umständen das gesamte Porensystem erst sehr spät von den Proteinen erreicht und es wird nur ein Teil der Oberfläche der stationären Phase genutzt. Diese Behinderung der Diffusion ist bei größeren Poren weniger stark ausgeprägt. Daraus kann eine verbesserte dynamische Kapazität mit einer steileren Durchbruchskurve resultieren. Auf der anderen Seite sorgen aber kleinere Poren nach dem Prinzip der Oberflächenvergrößerung auch wieder für eine erhöhte Gesamtoberfläche der stationären Phase [(1) Anspach].

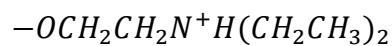
Neben diesen Effekten spielt auch die Proteingröße eine Rolle für den Massentransport innerhalb des Partikels. Kleinere Proteine haben in wässriger Lösung eine höhere Diffusivität als größere[G. Carta und A. Jungbauer (3)]. Zudem unterliegen die Poren einer Porengrößenverteilung. Es gibt also Poren mit unterschiedlicher Größe in demselben Material. Wie auch in der Größenauschlusschromatographie haben größere Proteine zu sehr kleinen Poren keinen Zugang. Insofern ist also der Massentransport von größeren Proteinen in einige Poren gar nicht möglich.

Die Flussrate wirkt sich auf die dynamische Kapazität aus. Bei einer höheren Flussrate durchqueren die Proteine die Säule schneller und somit wird ihnen weniger Zeit gegeben in das Porensystem der Säule vorzudringen. So resultiert eine unterschiedliche Flussrate in unterschiedlich steilen Durchbruchskurven[(4) R.Hahn et al.]. Die Flussrate wirkt sich allerdings nicht auf die statische Kapazität aus, sondern nur auf den Massentransport. Insofern werden die flachen Durchbruchskurven bei einer hohen Flussrate nur durch die Limitierung des Massentransportes verursacht[(4) R.Hahn et al.].

Es konnte gezeigt werden, dass es in der Ionenaustauschchromatographie bei einer Erhöhung der Konduktivität erst zu einer Erhöhung der dynamischen Kapazität kommt bis ein Maximum erreicht wird und die dynamische Kapazität danach mit zunehmender Konduktivität wieder abnimmt[C. Harinarayan et al.]. Hier wurde als Grund für die zunächst steigende dynamische Kapazität angenommen, dass Proteine am Eingang des Porensystems adsorbiert werden. Diese stoßen aufgrund gleicher Ladung weitere Proteine ab und sorgen so dafür, dass der Massentransport limitiert ist. Eine steigende Konduktivität soll dieser Abstoßung entgegenwirken[C. Harinarayan et al.].

2.2 Funktionelle Gruppe der Säule

Die funktionelle Gruppe der Säule ist der Teil der Säule, welcher mit der mobilen Phase und der Probe interagiert. Wie bereits beschrieben gibt es Kationenaustauscher und Anionenaustauscher. Außerdem ist innerhalb dieser Unterscheidung auch zwischen starken und schwachen funktionellen Gruppen zu unterscheiden. Innerhalb der Anionenaustauscher wird als schwache funktionelle Gruppe meistens die DEAE-Gruppe verwendet. Als starke funktionelle Gruppe meistens die Quarternäre Aminomethyl-Gruppe. Die Säulen, welche als stationäre Phase dienen, werden hierbei auch häufig nach der funktionellen Gruppe benannt, da dies ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist. DEAE bedeutet Diethylaminoethyl [(1) B. Anspach].



Die folgende Abbildung zeigt die Struktur der funktionellen Gruppe:

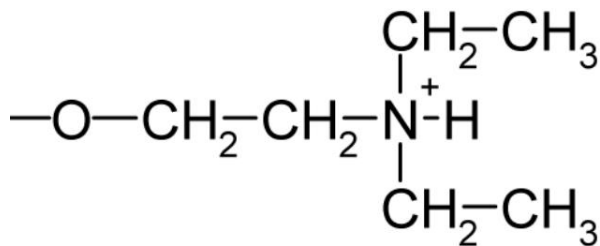
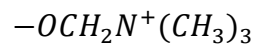


Abbildung 2: Diethylaminoethylgruppe im geladenen Zustand Quelle: <https://de.wikipedia.org> (5).

Wie bereits beschrieben handelt es sich hierbei um eine schwache funktionelle Gruppe, somit ist ihre Ladung pH-abhängig. Der pK_s -Wert dieser Gruppe liegt zwischen 9 und 9,5 [(1) B. Anspach]. Unter diesem pK_s -Wert ist die DEAE-Gruppe überwiegend positiv geladen. Um eine ausreichend positive Ladung zu gewährleisten, sollte der pH-Wert also kleiner als 8 sein. Über diesem Wert ist die DEAE-Säule zunehmend ungeladen und dann nicht mehr als Anionenaustauscher einsetzbar. Dies kann in einigen Fällen aber auch ein Vorteil gegenüber einer starken funktionellen Gruppe sein. Ist zum Beispiel eine negative Substanz gebunden, welche in ihrer Ladung durch einen pH-Wechsel nicht beeinflusst werden kann und eine Elution über eine Erhöhung der Salzkonzentration nicht möglich oder nicht ausreichend, so kann die DEAE-Gruppe durch einen Wechsel des pH-Wertes entladen werden.

Q steht für Quarternäres Aminomethyl:



Die folgende Abbildung zeigt die Struktur der funktionellen Gruppe:

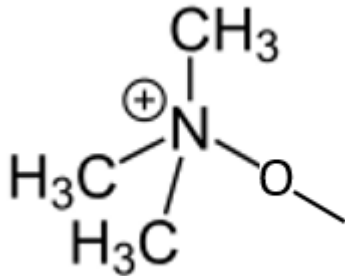


Abbildung 3: Quarternäre Aminoethylgruppe im geladenen Zustand. Verändert aus: <https://de.wikipedia.org> (6)

Da die Ladung der Q-Gruppe fast gänzlich unabhängig vom pH-Wert ist, kann diese Gruppe in einem größeren pH-Bereich eingesetzt werden und ist gerade in einem sehr basischen Milieu die einzige Möglichkeit für einen Anionenasutauscher. Aber auch in einem schwach basischen Milieu könnte die Q-Gruppe Vorteile gegenüber der DEAE-Säule bieten, da auch hier der Protonierungsgrad der Q-Gruppe höher ist, als der der DEAE-Gruppe [(1)B. Anspach].

2.3 Säulenmatrix

Neben der funktionellen Gruppe hat auch die Säulenmatrix einen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten. Ebenso die Verbindung zwischen Matrix und funktioneller Gruppe, welche auch als Spacer bezeichnet wird. Dieser bewirkt, dass sich die funktionelle Gruppe nicht direkt auf der Säulenmatrix befindet, sondern in einem Abstand dazu. Die Firma Merck hat ein Säulenmaterial entwickelt, welches über einen längeren Spacer verfügt als die meisten anderen Säulenmaterialien.

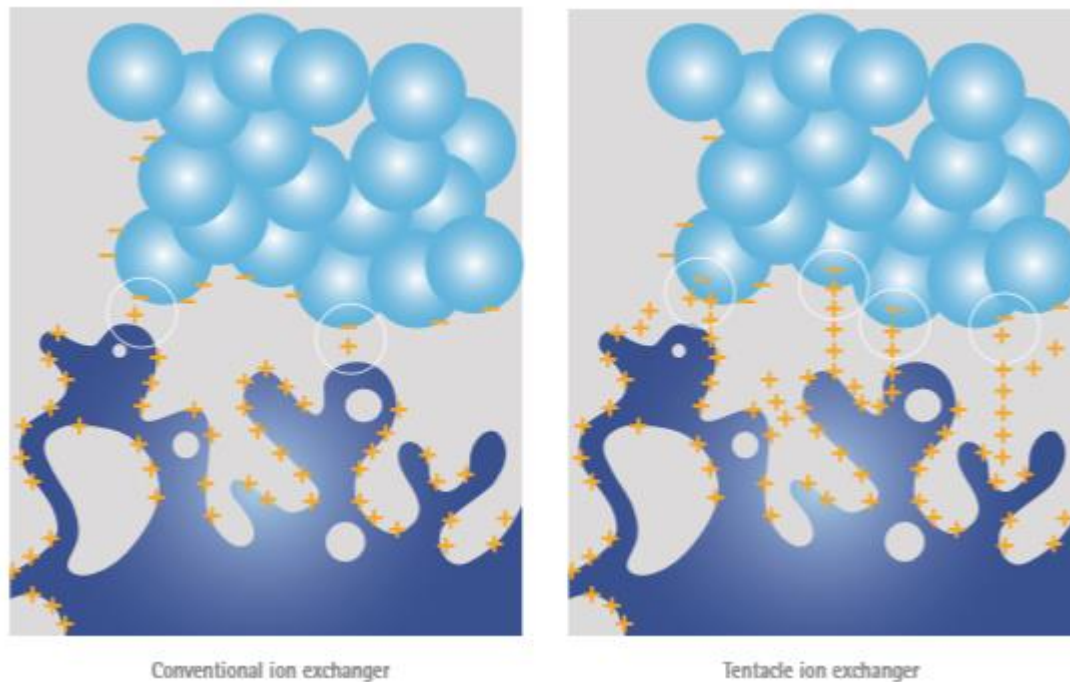


Abbildung 4 Darstellung aus einer Broschüre des Herstellers Merck, welche ein Säulenmaterial mit einem verlängerten Spacer bewirbt. Der verlängerte Spacer soll ein effizienteres Adsorbieren in der Chromatographie bewirken. Quelle : Fractogel® EMD Chromatography Resin: <http://www.merckmillipore.com/> Zugriff am 07.05.2019 (7)

Laut Merck sollen die längeren Spacer dafür sorgen, dass mehr funktionelle Gruppen an das gleiche Protein binden können. Dies soll, aufgrund der längeren Spacer möglich sein, da bei kürzeren Spacern weniger funktionelle Gruppen dasselbe Protein erreichen können. Dadurch soll sich das Adsorptionsverhalten verbessern (7). Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 4 verdeutlicht.

Das Säulenmaterial der HiTrap DEAE FF-Säule und der HiTrap Q FF-Säule ist ein 6%ige quervernetzte Agarosematrix. Die Partikelgröße befindet sich in einem Bereich von 45µm-165µm mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 90µm. Das Material ist in einem pH-Bereich von 2 bis 12 einsetzbar. Für die Reinigung beträgt der pH- Bereich 2-14. Für diese Matrix wird für die Größenausschlusschromatographie ein Wirkungsbereich von 10kDa bis 1000kDa angegeben (8).

Das Fraktogel EMD DEAE-Material ist ein quervernetztes Polymer aus Methacrylat. Dieses hat eine Partikelgröße zwischen 40µm und 90µm. Es ist ebenfalls in einem pH-Bereich von 2-

12 einsetzbar. Es wird eine Kapazität von 100mg BSA angegeben. Für die Größenausschlusschromatographie wird für dieses Material ein Wirkungsbereich von 5kDa bis 1000kDa angegeben (9).

2.4 Proteine

2.4.1 Ovotransferrin

Ovotransferrin (Conalbumin) ist mit 12% das zweithäufigste Protein im Eiklar des Hühnereis. Es gehört zu den Transferrinen, welche allesamt Eisen binden können. Ovotransferrin ist dazu im Stande zwei Eisen-Ionen binden zu können. Je nachdem wie viel Eisen gebunden ist können sich Struktur und Eigenschaften von Ovotransferrin unterscheiden. In dieser Arbeit wird ausschließlich das eisenfreie Ovotransferrin untersucht. Im Hühnerei dient Ovotransferrin als Eisenlieferant. Neben dieser Funktion erfüllt Ovotransferrin aber noch weitere Funktionen. So hat es antibakterielle Eigenschaften. Eine dieser Eigenschaften wirkt bakteriostatisch, da es das Eisen bindet, welches Bakterien für ihr Wachstum benötigen. Diese Eigenschaft soll sich in Gegenwart von Dicarbonat noch verstärken. Darüberhinaus konnte noch eine weitere bakterientötende und eisenunabhängige Eigenschaft des Ovotransferrins nachgewiesen werden. Diese Eigenschaften machen es auch als Bestandteil für Tierfutter interessant. Zudem werden Ovotransferrin auch antifungale Eigenschaften sowie Krebs hemmende Eigenschaften zugeschrieben. [J. Wu et al.]

Die Polypeptidkette von Ovotransferrin ist 686 Aminosäuren lang. Zusammen mit den Glykolysierungen ergibt sich eine Masse von 77,9kDa. Es beinhaltet 15 Disulfidbrücken, allerdings ist keine Thiolgruppe mehr frei. Der pI-Wert von Ovotransferrin liegt bei 6,0. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus haben eine kugelähnliche Form. Diese beiden Enden sind durch eine α -Helix verbunden. [J. Wu et al.]

2.4.2 Ovalbumin

Ovalbumin ist mit 60%-65% das häufigste Protein im Eiklar des Hühnereis. Außerdem gehört Ovalbumin zu den Serpinen, im Gegensatz zu den meisten Serpinen inhibiert es allerdings keine Serin-Proteasen. Die Funktion von Ovalbumin im Ei ist noch nicht geklärt. Es wird allerdings vermutet, dass es als Transportprotein für Metallionen dient [P. Stein et al.] Ovalbumin besteht aus 386 Aminosäuren. Und ist Glykolysierungen unterzogen. Es hat eine Masse von 45kDa. Es besitzt sechs Cysteine, von denen allerdings nur zwei eine Disulfidbrücke bilden. Bei vier Cysteinen ist die Seitenkette also frei. [A. Huntington et al.] Der pI-Wert von Ovalbumin liegt bei 4,5 [M. Pereira et al.].

2.4.3 Rinderserumalbumin

Rinderserumalbumin, kurz BSA, ist ein Protein aus dem Blutplasma des Rindes. Es dient als Transportprotein. Es transportiert unter anderem Metallionen, Proteine oder Fettsäuren, die ohne Serumalbumin im Blutplasma nicht löslich wären. Außerdem trägt es dazu bei den osmotischen Druck und den pH- Wert im Blut konstant zu halten [(10) Huang et al.].Darüber hinaus, nimmt BSA bei unterschiedlichen pH Werten unterschiedliche Formen an. Außerdem können Substanzen, die von BSA transportiert werden, auch Veränderungen in der Struktur von BSA bewirken. Diese Veränderungen können in einigen Fällen auch irreversibel sein [W. Norde et al.]. Die Aminosäurekette von BSA ist 583 Aminosäuren lang. Es hat eine Masse von 66,43kDa. Weiter verfügt es über 17 Disulfidbrücken und ein freie Thiolgruppe [I. Rombouts et al.]. Der pI-Wert von BSA liegt bei 4,7 (11).

2.5 Puffer

Puffer erfüllen in der Ionenaustauschchromatographie den Zweck den pH-Wert konstant zu halten und Schwankungen des pH-Wertes zu vermeiden. Dies ist sehr wichtig, für das Verfahren, da der pH-Wert maßgeblich für das Funktionieren des Verfahrens ist. Schwankungen des pH-Wertes könnten somit auch große Schwankungen im Adsorptionsverhalten verursachen. Um eine ausreichende Pufferkapazität zu gewährleisten, werden Puffer in Konzentrationen von 10mM bis 50mM verwendet [(1) B. Anspach]. Neben diesem Effekt können Puffer aber noch weitere Effekte auf das Adsorptionsverhalten von Proteinen in der Ionenaustauschchromatographie besitzen. Zum einen können Puffer eine Ladung besitzen, die ebenfalls entgegengesetzt zur stationären Phase ist. Hier treten Pufferionen und Proteine dann in Konkurrenz zueinander um den Platz an der stationären Phase. Besonders wenn der Puffer nicht nur eine einfache Ladung besitzt, sondern eine mehrfache, weist er eine höhere Ladungsdichte als die Proteine auf und stellt eine starke Konkurrenz dar.

Besitzt der Puffer hingegen eine Ladung, welche entgegengesetzt zum Protein ist, sind mehrere Effekte denkbar. Eine Möglichkeit ist, dass das Protein und der Puffer miteinander interagieren und das Pufferion an das Protein bindet. Geschieht dies in einem starken Maße, könnte die Masse des Proteins dadurch soweit steigen, dass der Massentransport in das Porensystem behindert wird. Dies könnte insbesondere dann auftreten, wenn ein Pufferion an mehrere Proteine bindet. So könnten größere Protein-Puffer-Komplexe entstehen, die keinen Zugang oder zumindest einen erschwerten Zugang zum Porensystem haben. Dies würde die dynamische Kapazität enorm verringern. Ein solcher Effekt wurde als Ursache für ein

unterschiedliches Adsorptionsverhalten von IgG bei bei unterschiedlichen Puffern vermutet [J. Otte].

Einen weiteren Effekt können Pufferionen auf das Zeta-Potential des Proteins ausüben. Wobei hiermit die einzelnen Zeta-Potenziale der geladenen Gruppen des Proteins gemeint ist. Befinden sich größere geladene Partikel, wie Proteine, in einer wässrigen Lösung, welche Ionen beinhaltet, kommt es zur Ausbildung einer Doppelschicht um den geladenen Partikel. Die innere Schicht dieser Doppelschicht wird als stationäre Schicht bezeichnet. Diese Schicht besteht ausschließlich aus Ionen, welche entgegengesetzt zum Partikel geladen sind. Als stationär wird diese Schicht deswegen bezeichnet, weil sie sich nur schwer wieder vom Partikel löst. Auch Reibung oder Scherkräfte können diese Schicht nicht wieder ablösen. Das elektrische Potential des Partikels, also die Kraft die der Partikel auf entgegengesetzte Ladungsträger ausübt, wird durch diese erste Schicht bereits abgeschwächt. Dieses durch die erste Schicht abgeschwächte Potential wird als Stern-Potential bezeichnet. Um diese erste Schicht lagert sich jetzt noch eine zweite Schicht. Diese Schicht wird als die diffuse Schicht bezeichnet. Sie ist ungeordneter als die erste und beinhaltet sowohl positive als auch negative Ionen. Die Diffuse Schicht ist zwar breiter als die erste Schicht, kann aber mitunter durch Scherkräfte oder Reibung wieder abgelöst werden. Am äußeren Rande dieser zweiten Schicht ist das Potential nochmal geringer. Dieses Potential ist das Zeta-Potential. Dies ist das Potential, welches dann noch auf Träger entgegengesetzter Ladungen wirken kann. Dieses ist also kleiner, als das eigentlich Potential des Partikels. (12)

Die folgende Abbildung verdeutlicht den Aufbau der Doppelschicht:

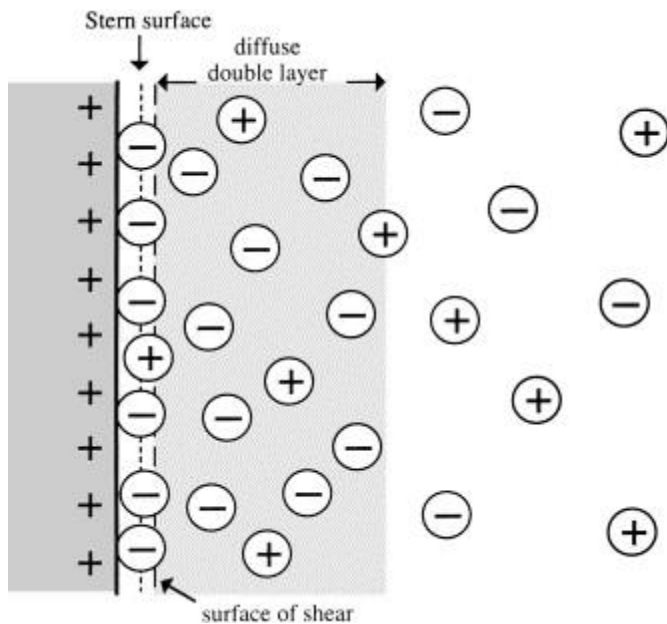


Abbildung 5: Aufbau der Doppelschicht eines geladenen Partikels in wässriger Lösung.

Quelle: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S037673880000315X-gr1.jpg>

Zugriff am 12.05.2019

Weiter wurde gezeigt, dass bei der Ultrafiltration unterschiedliche Puffer ein unterschiedliches Zeta-Potential ergeben. Besonders mehrfach geladene Puffer setzen das Zeta-Potential stark herab. [B. Burns et al.] Eine Verringerung des Zeta-Potentials wirkt sich auch in der Ionenaustauschchromatographie negativ auf das Adsorptionsverhalten von Proteinen aus. In einer Arbeit über das Adsorptionsverhalten von OVA wird dies auch als ein möglicher Grund für unterschiedliche Ergebnisse, bei unterschiedlichen Puffern angegeben [S. Erdal]

Ein weiterer Effekt der Puffer ist, dass sie das Löslichkeitsverhalten von Proteinen beeinflussen. Hier spielen zwei Effekte eine Rolle, der Einsalzeffekt und der Aussalzeffekt. Der Einsalzeffekt beruht darauf, dass die Seitenketten einiger Aminosäuren geladen sind. Durch diese Ladungen entsteht ein elektrochemisches Potential, das eine Aggregation von Proteinen bewirken kann und somit die Löslichkeit verringert. Ionen mit einer entgegengesetzten Ladung aus der Lösung können sich aber jetzt an diese geladenen Seitenketten anlagern. Dadurch wird die Ladung abgeschirmt und die elektrochemischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen werden abgeschwächt. Infolgedessen erhöht sich die Löslichkeit. [W. Maurer et al.]

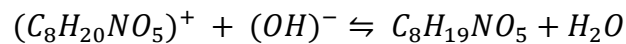
Dem gegenüber entsteht der Aussalzeffekt. Dieser beruht auf den Hydrathüllen, welche in wässriger Lösung um Proteine gebildet werden. Hierbei ordnen sich die Wassermoleküle um die Proteine in einer Art Hülle an. Die hydrophoben Bestandteile des Proteins sind dann im Inneren des Proteins, während die hydrophilen Bestandteile überwiegend nach außen zum Wasser zeigen. Die Proteine liegen dann überwiegend einzeln in dieser Hydrathülle vor. Steigt die Salzkonzentration immer weiter an, werden immer mehr Wassermoleküle für die Hydrathüllen um die Salzionen benötigt. Dadurch stehen weniger Wassermoleküle für die Hydrathüllen um die Proteine zur Verfügung. Dies kann dazu führen, dass sich Proteine mit ihren hydrophoben Bestandteilen aneinanderlegen. Die Hydrathüllen werden dann nicht mehr um jedes Protein einzeln gebildet, sondern um mehrere Proteine. Da zusammengelagerte Proteine dann eine geringere Oberfläche haben, welche mit Wassermolekülen umgeben werden muss, als voneinander getrennte Proteine, bewirkt eine höhere Salzkonzentration eine Aggregation und eine Herabsetzung der Löslichkeit [(13) B.Ansbach].

Für Aussalzeffekte sind die verwendeten Konzentrationen in der Ionenaustauschchromatographie während Adsorption allerdings zu niedrig. Während der Elution unter Hochsalzbedingungen können sie allerdings eine Rolle spielen. Der Einsalzeffekt kann allerdings eine Rolle bei der Adsorption spielen, da diese unter einer sehr niedrigen Pufferkonzentration abläuft. Hierbei spielt dann auch die Ladung des Puffers eine Rolle. Ein ungeladener Puffer spielt im Einsalzeffekt keine Rolle. Für BSA konnte bereits gezeigt werden, dass unterschiedlicher Puffer ein unterschiedliches Verhältnis von Monomeren und Dimeren hervorbringen können [N. Mashhori]. In derselben Arbeit wurde gezeigt, dass eine Zugabe von NaCl im millimolaren Bereich eine verbesserte Adsorption bewirken kann. Es wurde allerdings noch nicht untersucht, wie sich diese Effekte in einem Puffersystem auswirken, in welchem die Puffermoleküle fast gänzlich ungeladen vorliegen.

Insofern können Puffer also durch mehrere Effekte Einfluss auf die Adsorption nehmen. Zum einen werden sie benötigt um den pH-Wert konstant zu halten und durch den Einsalzeffekt die Löslichkeit zu erhöhen. Auf der anderen Seite können Sie durch Wechselwirkungen mit der stationären Phase oder dem Protein aber auch störend wirken. Bei Proteinen, welche nicht zur Dimerisierung neigen oder nur in schwachem Maße, kann eventuell auf den Einsalzeffekt verzichtet werden. Hier könnte ein Puffer, der im entsprechenden pH-Bereich überwiegend ungeladen vorliegt, eine Lösung darstellen. So würde er den pH-Wert konstant halten, aber weder mit der stationären Phase noch mit dem Protein interagieren.

2.5.1 BisTris

BisTris ist eine Abkürzung für Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane und hat eine molare Masse von 209,24g/mol. In Lösungen reagiert es basisch. BisTris hat einen pK_s -Wert von 6,5 (25°C) und einen Pufferbereich von 5,8 bis 7,2. Unterhalb des pK_s -Wertes liegt BisTris überwiegend einfach positiv geladen vor, überhalb des pK_s -Wertes liegt es überwiegend ungeladen vor [(14)].



Die nachfolgende Abbildung zeigt die Strukturformel.

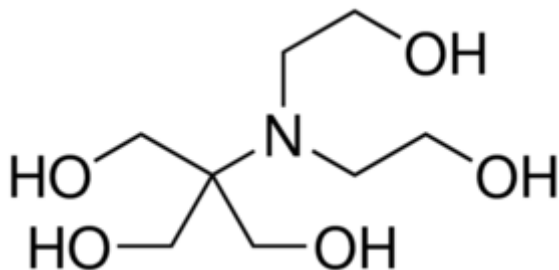
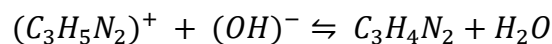


Abbildung 6 Strukturformel von BisTris. Quelle: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b9754?lang=de®ion=DE>
Zugriff am 28.04.2019

2.5.2 Imidazol

Imidazol reagiert in Lösungen basisch und hat eine molare Masse von 68,079g/mol. Der pK_s -Wert von Imidazol ist 6,95 (25°C). Der Pufferbereich von Imidazol reicht von 6,2 bis 7,8. Unterhalb des pK_s -Wertes ist Imidazol überwiegend einfach positiv geladen, überhalb des pK_s -Wertes ist Imidazol überwiegend ungeladen. (15)



Die nachfolgende Abbildung zeigt die Strukturformel:

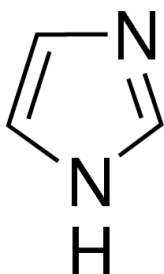
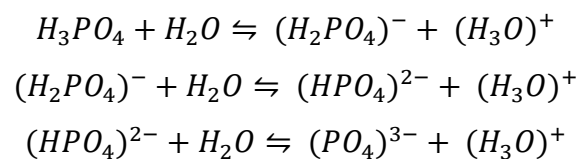


Abbildung 7 Strukturformel von Imidazol; Quelle: <https://www.sigmaaldrich.com> (15)
Zugriff am 28.04.2019

2.5.3 Phosphat

Natriumdihydrogenphosphat reagiert in Lösungen sauer und hat eine molare Masse von 119,98g/mol. Hierbei liegen dann in Lösungen ein positives Natriumion und ein negativ geladener Rest getrennt voneinander vor. Außerdem kann der Phosphatpuffer bis zu drei Protonen abgeben. Somit ergeben sich auch drei pK_s -Werte. Diese liegen bei 2,0, 7,2 und 12,3. Somit kann der Phosphatpuffer in einem sehr sauren Bereich überwiegend ungeladen vorliegen. Je basischer das Milieu wird, desto mehr negative Ladungen trägt das Phosphat bis zu einem Maximum von drei negativen Ladungen. [(16)]



Die nachfolgende Abbildung zeigt die Strukturformel:

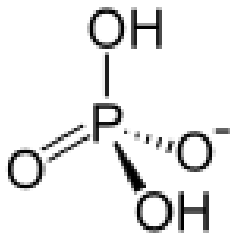
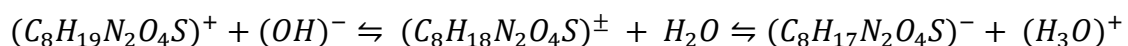


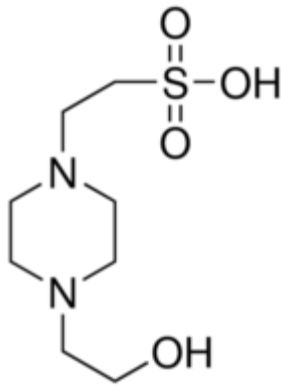
Abbildung 8 Strukturformel eines einfach deprotonierten Phosphats; Quelle: <https://de.wikipedia.org> (17)Zugriff am 29.04.2019

2.5.4 HEPES

HEPES ist die Abkürzung für 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid und hat eine molare Masse von 238,3g/mol. HEPES hat sowohl einen sauren als auch einen basischen Bestandteil. Die pK_s -Werte liegen bei 3 und 7,5 (25°C). Unterhalb von pH 3 liegt HEPES somit überwiegend einfach positiv geladen vor. Zwischen pH 3 und pH 7,5 liegt es überwiegend als Zwitterion vor und hat sowohl eine positive Ladung als auch eine negative Ladung. Über pH 7,5 liegt es überwiegend einfach negativ geladen vor. Der erste Pufferbereich liegt zwischen pH 2,5 und pH 3,5 und der zweite zwischen pH 6,8 und pH 8,2. (18)



Die folgende Abbildung zeigt die Strukturformel



**Abbildung 9 Strukturformel von HEPES; Quelle: <https://www.sigmaaldrich.com/> (18)
Zugriff am 29.04.2019**

2.6 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie findet im Gegensatz zur Ionenaustauschchromatographie keine Adsorption an die stationäre Phase statt. Die Auftrennung von Substanzen, in dieser Arbeit von Proteinen, erfolgt durch eine unterschiedlich lange Retentionszeit. So beinhaltet die SEC-Säule eine poröse Gelmatrix mit unterschiedlich großen Poren. Proteine, die zu groß für diese Poren sind, können nicht in das Porensystem gelangen. Sie gelangen auf direktem Weg aus der Säule hinaus und eluieren zuerst. Kleinere Proteine, die in einige Poren gelangen können, legen durch das Porensystem einen längeren Weg zurück und eluieren später. Noch kleinere Proteine, welche in alle Poren gelangen können, werden durch das Porensystem noch stärker retardiert. Insofern erfolgt bei der Größenausschlusschromatographie eine Auftrennung nach der Proteingröße, wobei größere Proteine früher eluieren als kleinere Proteine. Dieses Verfahren kann auch dazu genutzt werden Proteinmonomere von Proteindimeren zu trennen. Da die Proteindimere größer sind, eluieren sie früher[(1) B. Anspach].

2.7 SDS-PAGE

Bei einer SDS-Page werden Proteinproben auf ein Acrylamidgel aufgetragen und in diesem ihrer Größe nach aufgetrennt. Vor dem Auftragen werden die Proteine durch Aufkochen denaturiert. Eine Zugabe von DTT kann zusätzlich denaturierend wirken, da dieses Disulfidbrücken spaltet. Das SDS im Gel lagert sich an das Protein an und überdeckt durch seine negative Ladung die Eigenladung des Proteins. Insofern sind durch das SDS alle Proteine negativ geladen. Wenn jetzt eine Spannung angelegt wird, bewegen sich alle Proteine durch das Gel zur Anode hin. Hierbei wandern die Proteine durch das poröse System des

Polyacrylamids. Dieses poröse System hält größere Proteine stärker zurück als kleinere Proteine. Insofern erfolgt eine Auftrennung nach der Größe, wobei kleinere Proteine im Gel weiterlaufen. Mittels einer Proteinfärbung können anschließend die unterschiedlichen Proteinbanden detektiert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
HEPES	Biochrom
Acrylamid Xtra Lösung	BioFroxx
BisTris Pufferan $\geq 99\%$	Roth
Imidazol \geq	Roth
Natriumchlorid $\geq 99,5\%$	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat $\geq 99\%$	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Roti Blue Färbelösung	Roth
SDS Pellets $\geq 99,5\%$	Roth
Tris Pufferan $\geq 99,5\%$	Roth

3.1.2 Proteine

Tabelle 2: Verwendete Proteine

Protein	Bezeichnung	Hersteller
Rinderserumalbumin	Albumin Fraktion V $\geq 98\%$	Roth
Ovalbumin	Albumin from chicken egg white $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
Ovotransferrin	Conalbumin from chicken egg white, substantially iron free	Sigma-Aldrich

3.1.3 Säulen

- HiTrap DEAE FF-Säule
- HiTrap Q FF-Säule
- selbstgepackte Säule (EMD Fractogel (M))
- SEC Superdex 200-Säule

3.1.4 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
ÄKTApurifier		GE Healthcare
ÄktaStart		GE Healthcare
Externe Pumpe	P-500	Amersham Biosciences
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Vakuumpumpe		KNF Neuberger
Waage	ENTRIS3231- 1S	Satorius
Waage	BP221S	Satorius

3.2 Methoden

3.2.1 Equilibrierung

Equilibriert wird die Säule mit dem zwanzigfachen Volumen des Säulenvolumens. In diesem Fall sind das 20mL. Hierbei wird der gleiche Puffer verwendet, in welchem auch das zu untersuchende Protein gelöst wird. Die Lösung zur Equilibrierung wird über die Pumpe der Äkta zugeführt. Die Flussrate bei der Equilibrierung beträgt 1 mL/min. Art des Puffers und pH-Wert ändern sich, je nachdem welcher Versuch durchgeführt werden soll.

3.2.2 Auftragen der Proteinlösung auf die Säule

Nach der Equilibrierung kann die Proteinlösung auf die Säule aufgetragen werden. Dies geschieht ebenfalls mit einer Flussrate von 1mL/min. Hierfür wird allerdings die externe Pumpe verwendet, die Pharmaceutical P500. Damit diese aber im Versuch sofort die Proteinlösung auf die Säule gibt, muss sie vorher mit der Proteinlösung gespült werden. Das Volumen der Anlage beträgt ca. 40mL. Verwendeter Puffer und pH-Bereich sind auch hier von Versuch zu Versuch unterschiedlich. Die Konzentration des Proteins in der Lösung beträgt in allen Versuchen 1mg/mL.

3.2.3 Elution des gebundenen Proteins

Um das gebundene Protein von der Säule wieder zu lösen wird ein 1,5 molare NaCl-Lösung verwendet. Diese hat den gleichen pH-Wert und dasselbe Puffersystem wie die Equilibrierungslösung. Die Elution wird ebenfalls mit einer Flussrate von 1mL/min durchgeführt und wird als Stufenelution durchgeführt. Hierbei wird gleich zu Beginn der Elution ausschließlich die NaCl-Lösung zugeführt. Das Elutionsvolumen beträgt 20mL. Zur Elution wird ebenfalls die Pumpe der Äkta verwendet.

3.2.4 Reinigung der Säule

Da auch nach der Elution einige Verunreinigungen auf der Säule verbleiben, ist hin und wieder eine Reinigung der Säule notwendig. Insbesondere nach dem Gebrauch von Ovalbumin, kann die Säule stärker verunreinigt sein. Dies zeigt sich dann in einer niedrigeren Kapazität. Um diese Verunreinigungen zu entfernen, kann die Säule mit einmolarer Natronlauge gespült werden. Außerdem kann die Säule auch in umgekehrter Richtung gespült werden. Hierbei können auch Flussraten von 2mL/min eingesetzt werden. Auch zur Reinigung wird die Pumpe der Äkta verwendet.

3.2.5 Mittelung der Ergebnisse

In den Ergebnissen der UV-Adsorption können sich kleine Ausreißer befinden. Diese können verursacht werden durch Luftblasen, die ungewollt in das System gelangt sind, oder durch die Pumpe. Schaltet die externe Pumpe von einem Kolben auf den anderen, kommt es zu kleinen Unregelmäßigkeiten zu diesen Zeitpunkten im Druck. Auch dies kann zu Ausreißerwerten führen, die nicht durch die zu untersuchenden Effekte begründet sind. Solche Ausreißer können allerdings zum großen Teil durch Mittelung der Werte aus den Ergebnissen entfernt werden. Das angewandte Verfahren zur Mittelung der Werte in dieser Arbeit ist ein zentrierter gleitender Mittelwert 9. Ordnung:

$$x_{MA}^{(9)}(t) = \frac{1}{9} \sum_{i=(-4)}^4 x(t+i)$$

Durch die Verwendung dieser Mittelung ergeben sich allerdings gemittelte Ergebnisse, welche acht Werte weniger als die ursprüngliche Ergebnisreihe besitzen, da die Art dieser Mittelung erst ab dem fünften Wert und bis zum fünftletzten Wert durchgeführt werden kann. Durch die sehr große Anzahl der Ergebniswerte und den kleinen Zeitabstand der Ergebnisse, ist der dadurch entstandene Fehler allerdings minimal.

3.2.5 Integration der Ergebnisse

Es ist für die Bestimmung der dynamischen Kapazität notwendig, die Fläche zwischen der Durchbruchskurve und einem Wert von $c/c_0=0,1$ bis zu Schnittpunkt der Durchbruchskurve und des Wertes zu errechnen. Diese kann dann mit c_0 multipliziert werden und ergibt die dynamische Kapazität. Hierfür wird die Fläche unter der Kurve berechnet und dann von der Fläche unter c/c_0 abgezogen. Für die Berechnung unter der Kurve bis zum Schnittpunkt wird die Trapezformel angewendet. Hierdurch entsteht ein Fehler, da die Durchbruchskurve sich in ihrer Form von Trapezen unterscheidet. Durch hinreichend kleine Berechnungsintervalle minimiert sich allerdings der Fehler. Die Ergebnisse der UV- Adsorption haben einen Zeitabstand bei dem dieser Fehler vernachlässigt werden kann. Die Formel für die Berechnung ist die folgende:

$$X = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{(x(t+i) + x(t+i+1)) \cdot ((t+i+1) - (t+i))}{2}$$

Dabei ist n die Anzahl der Ergebniswerte.

3.2.6 Berechnung der Nettoladung der Proteine

Die Nettoladung der Proteine für den jeweiligen pH-Wert kann aufgrund ihrer Aminosäurekette berechnet werden. Hierbei müssen nur die Aminosäuren berücksichtigt werden, die eine basische oder saure Seitenkette besitzen. Da der pH-Wert bei den Versuchen teilweise im basischen Milieu liegt, müssen auch Tyrosin und Cystein berücksichtigt werden, da auch diese im basischen pH-Bereich deprotonieren können. Hier kann dann der Protonierungsgrad der jeweiligen Aminosäure berechnet werden und mit der Anzahl der Aminosäuren im jeweiligen Protein multipliziert werden. Somit ergibt sich für jede der Aminosäuren eine bestimmte Anzahl positiver oder negativer Ladungen, diese können dann addiert werden. Außerdem ist auch die Ladung der Carboxylgruppe am C-Terminus und der

Aminogruppe am N-Terminus zu beachten. Das Verhältnis von geladenen zu nicht geladenen Seitenketten kann mittels der Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet werden.

Für die sauren Seitenketten:

$$\frac{c(A^-)}{c(HA)} = 10^{(pH-pk_s)}$$

Der Deprotonierungsgrad ergibt sich dann durch:

$$\frac{\left(\frac{c(A^-)}{c(HA)}\right)}{\left(\frac{c(A^-)}{c(HA)}\right) + 1}$$

Und für die basischen:

$$\frac{c(AH^+)}{c(A)} = 10^{(pk_s-pH)}$$

Hier ergibt sich der Protonierungsgrad durch:

$$\frac{\left(\frac{c(AH^+)}{c(A)}\right)}{\left(\frac{c(AH^+)}{c(A)}\right) + 1}$$

Da diese Rechnung aber keine Glykolisierung und keine räumlichen Strukturen berücksichtigt oder andere Effekte, die sich auf das Gleichgewicht auswirken, stellt diese Berechnung lediglich eine Näherung dar.

3.2.7 Berechnung Ladung der Puffer

Da BisTris und Imidazol jeweils nur zwei Zustände haben, kann die Verteilung der Zustände mittels der Henderson-Hasselbalch-Gleichung, wie oben beschrieben, berechnet werden. Bei Phosphat und HEPES ist dies allerdings komplizierter, da diese nicht nur zwei Zustände besitzen. Bei Phosphat gibt es drei pk_s -Werte, die jeweils die Ladungsverteilung zwischen zwei Zuständen beschreiben.

Dies sind:

$$\frac{c(HA)}{c(A^-)} = 10^{(pk_{s,1}-pH)}$$

$$\frac{c(A^-)}{c(A^{2-})} = 10^{(pk_{s,2}-pH)}$$

$$\frac{c(A^{2-})}{c(A^{3-})} = 10^{(pk_{s,3}-pH)}$$

Hieraus lassen sich die folgenden Quotienten bilden:

$$\frac{c(HA)}{c(A^{2-})} = \frac{c(HA)}{c(A^-)} \frac{c(A^-)}{c(A^{2-})}$$

$$\frac{c(HA)}{c(A^{3-})} = \frac{c(HA)}{c(A^-)} \frac{c(A^-)}{c(A^{2-})} \frac{c(A^{2-})}{c(A^{3-})}$$

Daraus lässt sich das Verhältnis des ungeladenen Zustands zu den anderen Zuständen formulieren:

$$\frac{c(HA)}{c(A^{3-}) + c(A^{2-}) + c(A^-)} = \left(\left(\frac{c(HA)}{c(A^-)} \right)^{-1} + \left(\frac{c(A^-)}{c(A^{2-})} \right)^{-1} + \left(\frac{c(A^{2-})}{c(A^{3-})} \right)^{-1} \right)^{-1}$$

$$\frac{c(HA)}{c(A^{3-}) + c(A^{2-}) + c(A^-) + c(HA)} = \frac{\left(\frac{c(HA)}{c(A^{3-}) + c(A^{2-}) + c(A^-)} \right)}{\left(\frac{c(HA)}{c(A^{3-}) + c(A^{2-}) + c(A^-)} + 1 \right)}$$

Aus diesem lässt sich jetzt durch die Verhältnisse zwischen den Zuständen auch der Anteil der anderen Zustände beim jeweiligen pH-Wert berechnet werden.

Bei HEPES sind nur drei verschiedenen Zustände zu berücksichtigen:

$$\frac{c(HEPES^+)}{c(HEPES^\pm)} = 10^{(pk_{S,1} - pH)}$$

$$\frac{c(HEPES^\pm)}{c(HEPES^-)} = 10^{(pk_{S,2} - pH)}$$

Hieraus lässt sich der folgende Quotient bilden:

$$\frac{c(HEPES^+)}{c(HEPES^-)} = \frac{c(HEPES^+)}{c(HEPES^\pm)} \frac{c(HEPES^\pm)}{c(HEPES^-)}$$

Daraus lässt sich das Verhältnis des einfach positiv geladenen Zustands zu den anderen Zuständen formulieren:

$$\frac{c(HEPES^+)}{c(HEPES^-) + c(HEPES^\pm)} = \left(\left(\frac{c(HEPES^+)}{c(HEPES^\pm)} \right)^{-1} + \left(\frac{c(HEPES^+)}{c(HEPES^-)} \right)^{-1} \right)^{-1}$$

$$\frac{c(HEPES^+)}{c(HEPES^-) + c(HEPES^\pm) + c(HEPES^+)} = \frac{\left(\frac{c(HEPES^+)}{c(HEPES^-) + c(HEPES^\pm)} \right)}{\left(\frac{c(HEPES^+)}{c(HEPES^-) + c(HEPES^\pm)} + 1 \right)}$$

Auch hier können die Anteile der anderen Zustände über die oben angegebenen Verhältnisse berechnet werden.

3.2.8 Herstellung der selbstgepackten Säule

Für die selbstgepackte Säule wird die Säulenhülle der 1mL-GEHealthcare- Säule verwendet. Die rote Verschlusskappe kann mittels eines Schraubenziehers leicht von der Säule gelöst werden und dann einfach abgenommen werden. Ist die Verschlusskappe abgenommen, muss als nächste der schwarze Verschluss der Säule entfernt werden. Dieser ist in Abbildung 10 am oberen Ende der Säule zu erkennen. Dieser ist nicht verschraubt oder an die Säulenhülle geklebt. Dennoch lässt er sich nur schwer entfernen. Es kann ein Teil der oberen Säulenhülle abgesägt werden. Dies erleichtert das Herausziehen des Verschlusses. Anschließend müssen die in der Säule enthaltenen Filter und das Säulenmaterial entfernt werden. Die Säulenhülle kann dann mit Ethanol oder Wasser ausgespült werden. Für das erneute Packen der Säule muss der untere Verschluss geöffnet werden und der Untere Filter wieder in die Säulenhülle gelegt werden. Mit einer Größeren Pasteurpipette kann nun das Säulen EMD-Fractogel (M-Typ)-Material in die Hülle gefüllt werden. Hierbei muss beachtet werden, das sich das Material noch etwas zusammenziehen kann. Vor dem verschließen muss der obere Filter noch auf das Säulenmaterial gelegt werden.



Abbildung 10: 1mL-Säule wird geöffnet um die Säule mit einem anderen Material zu befüllen

3.2.9 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie wird die Säule mit dem zweifachen ihres Volumens des jeweiligen Puffers equilibriert. Die Flussrate beträgt hierbei 0,5mL/min. Nach der Equilibrierung wird die jeweilige Proteinprobe, welche im selben Puffer gelöst ist, auf die Säule gegeben. Das Probenvolumen beträgt hierbei 1mL und die Proteinkonzentration 1mg/mL. Zum Eluieren wird ebenfalls derselbe Puffer verwendet, der auch für die Equilibrierung und die Probenapplikation verwendet wurde. Nach dem Benutzen wird die Säule wieder mit 20%igem Ethanol zur Lagerung befüllt.

3.2.10 SDS-PAGE

Als Sammelgel wird ein 8%iges Acrylamidgel verwendet. Das Trenngel ist 12%ig. Vor dem Auftragen werden die Proben mit Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten aufgeköcht. Die Proben enthalten jeweils 2mg des jeweiligen Proteins. Die Proben werden bei 80V in das Sammelgel einlaufen gelassen. Die Auftrennung erfolgt bei 120V.

4. ERGEBNISSE

Für die Ergebnisse spielt die Pufferladung bei dem jeweiligen pH-Wert eine große Rolle, aus diesem Grund sind die Pufferladungen hier aufgeführt.

Tabelle 4: Ladung des Imidazol-Puffers

pH-Wert	(Imidazol) ⁺	Imidazol
7,5	21,99%	78,01%
6,5	73,81%	26,19%

Tabelle 5: Ladung des BisTris-Puffers

pH-Wert	(BisTris) ⁺	BisTris
7,5	90,91%	9,10%
6,5	50,00%	50,00%

Tabelle 6: Ladung des Phosphat-Puffers

pH-Wert	H ₃ PO ₄	(H ₂ PO ₄) ⁻	(HPO ₄) ²⁻	(PO ₄) ³⁻
7,5	0,00%	33,39%	66,61%	0,00%
6,5	0,00%	83,36%	16,63%	0,00%

Tabelle 7: Ladung des HEPES-Puffers

pH-Wert	(HEPES) ⁺	(HEPES) [±]	(HEPES) ⁻
6,5	0,03%	90,88%	9,09%
7,5	0,00%	50,00%	50,00%
8	0,00%	24,03%	75,97%

Tabelle 8: errechnete Nettoladung der Proteine Ovalbumin, BSA und Ovotransferrin bei den pH-Werten 6,5; 7,5 und 8

pH-Wert	Ovalbumin	BSA	Ovotransferrin
6,5	-10	-9	2
7,5	-13	-17	-5
8	-14	-24	-12

Die Berechnung in Tabelle 8 stellt, wie im Methodenteil beschrieben, nur eine Annäherung da. Die tatsächliche Nettoladung weicht von diesen Werten ab. Deutliche Unterschiede in der Nettoladung können durch diese Berechnung aber aufgezeigt werden.

4.1 Größenausschlusschromatographie

Im Folgenden sind die Elutionspeaks der drei untersuchten Proteine dargestellt. Hierbei wurde die SEC für jedes Protein einmal mit einem Phosphat-Puffer, einmal mit einem BisTris-Puffer und einmal mit einem BisTris-Puffer unter NaCl-Zugabe durchgeführt. Die NaCl-Zugabe erfolgt in einem Maße, dass sich in der Lösung 20mM positiv und negativ geladene Ladungsträger pro Liter befinden.

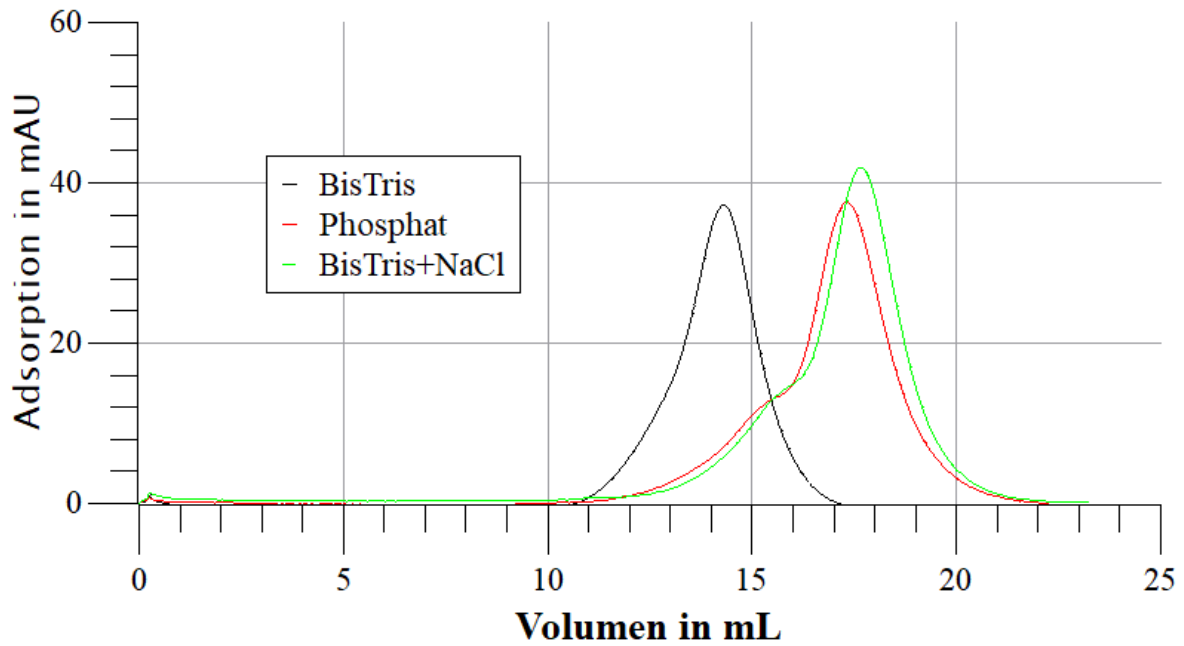


Abbildung 11: Größenausschlusschromatographie von BSA bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM Puffers bei einer Flussrate von 0,5mL/min und einer Konzentration von 1mg/mL.

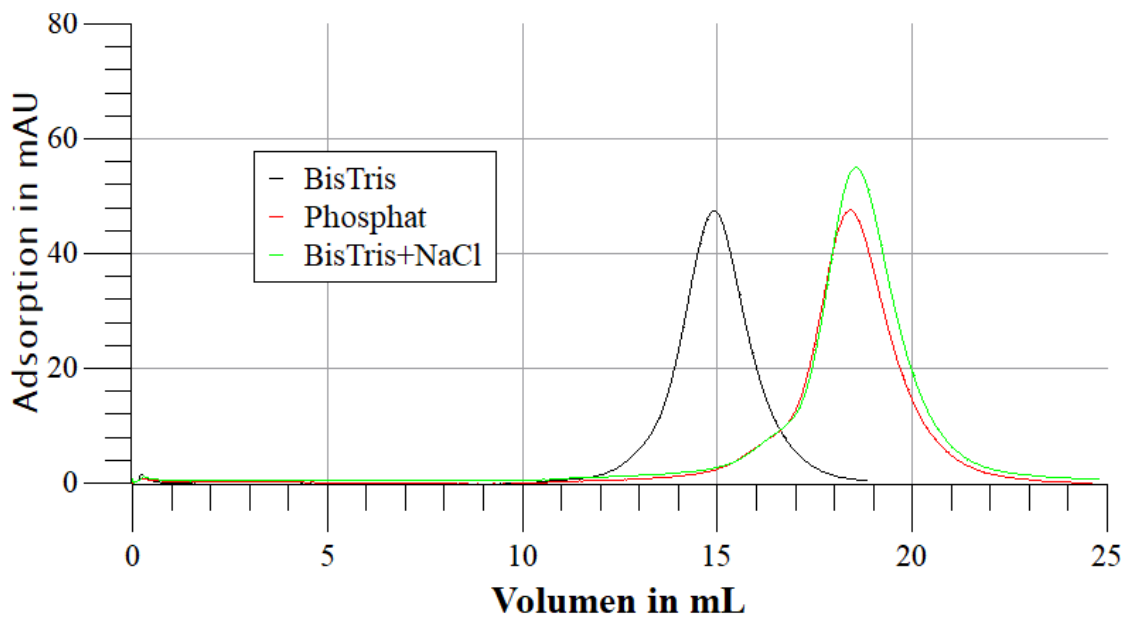


Abbildung 12: Größenausschlusschromatographie von OVA bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM Puffers bei einer Flussrate von 0,5mL/min und einer Konzentration von 1mg/mL.

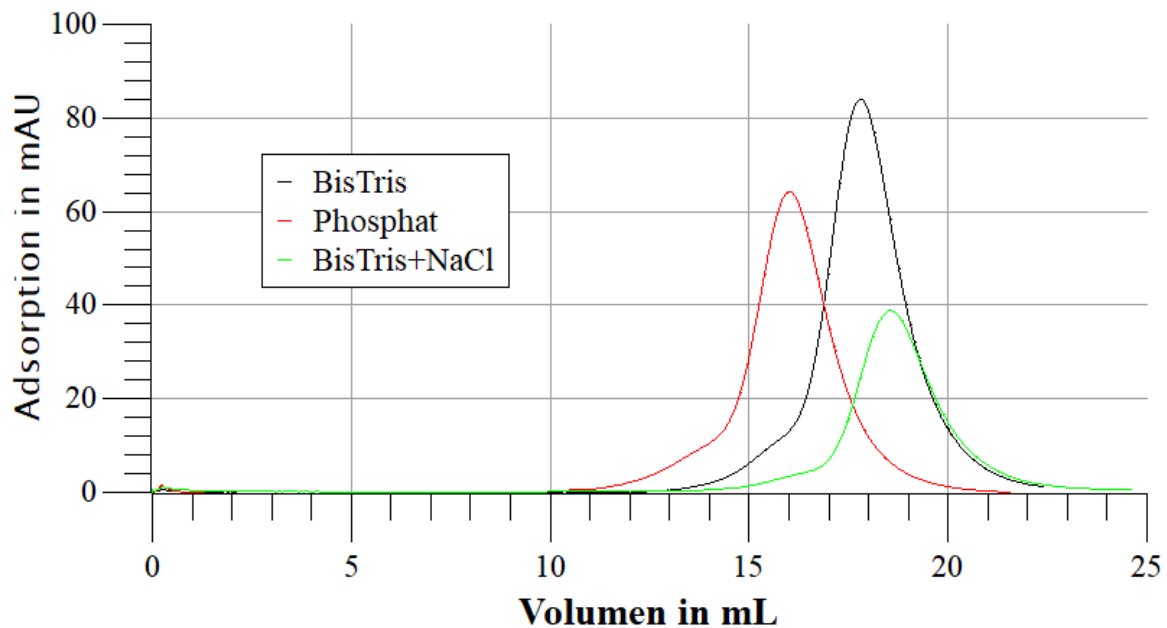


Abbildung 13: Größenausschlusschromatographie von Ovotransferrin bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM Puffers bei einer Flussrate von 0,5mL/min und einer Konzentration von 1mg/mL.

Die Versuche werden durchgeführt um zu ermitteln, ob die Proteine im jeweiligen Puffersystem als Monomere vorliegen oder als Dimere oder Aggregate höheren Grades. Die Auflösung der Säule reicht hierbei nicht aus, um Dimere und Monomere als getrennte Peaks zu eluieren. Es ist allerdings eine Verschiebung des Peaks erkennbar. Bei allen drei Proteinen ist erkennbar, dass die Elution der Proteine unter Verwendung des Phosphatpuffers später erfolgt, als unter Verwendung des BisTris-Puffers. Die SEC trennt die Proteine nach ihrer Größe. Kleinere Proteine eluieren früher als größere Proteine. Liegen die Proteine als Dimer oder Aggregat höheren Grades vor, haben sie eine höhere Größe. Dies bewirkt ein schnelleres eluieren. Die Verschiebung des Elutionspeaks lässt darauf schließen, dass die Proteine unter Verwendung des BisTris-Puffers einer stärkeren Aggregation unterliegen als unter Verwendung des Phosphat-Puffers. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Ladung der Puffer bei pH 7,5 erklären.

Der Phosphat-Puffer ist in diesem pH-Bereich überwiegend zweifach negativ geladen. Der BisTris-Puffer ist überwiegend ungeladen. Dadurch ist der Einsalzeffekt durch den Phosphat-Puffer größer als durch den BisTris-Puffer. Eine Dimerisierung oder Aggregation höheren Grades wird durch den Phosphat-Puffer stärker verringert als durch den BisTris-Puffer. Es lässt sich aber auch ein Unterschied zwischen den Proteinen erkennen. Obwohl Ovotransferrin das größte Protein ist und somit als erstes eluieren müsste, eluiert es unter Verwendung des BisTris-

Puffers als letztes. Außerdem ist der Abstand der Maxima der Elutionspeaks von Ovotransferrin unter Verwendung von BisTris und Phosphat geringer als der von BSA und OVA. Dies lässt darauf schließen, dass Ovotransferrin in einem überwiegend ungeladenen Puffersystem weniger stark dimerisiert vorliegt als die beiden anderen Proteine. Der Elutionspeak von BSA unter Verwendung des BisTris-Puffers zeigt ein stärkeres Fronting. Dies lässt darauf schließen, dass BSA unter diesen Bedingungen neben Dimeren auch Aggregate höheren Grades bildet. Der Elutionspeak von BSA unter Verwendung des Phosphat-Puffers zeigt ein noch stärkeres Fronting. Dies zeigt, dass BSA auch noch bei der hohen Ionenstärke des Phosphatpuffers Dimere bildet. Ein leichtes Fronting ist zwar bei allen Peaks erkennbar, bei BSA ist dieses aber besonders ausgeprägt. OVA zeigt unter der Verwendung von BisTris ein stärkeres Dimerisierungsverhalten als Ovotransferrin. Es eluiert allerdings später als BSA, und zeigt nicht so ein ausgeprägtes Fronting. Dies lässt darauf schließen, dass OVA nicht so stark zur Dimerisierung und zur Bildung von Aggregaten höheren Grades neigt wie BSA. Auch der Elutionspeak von OVA unter Verwendung des Phosphatpuffers ist symmetrischer als der Elutionspeak von BSA unter diesen Bedingungen. Insgesamt kann daraus geschlossen werden, dass BSA am stärksten zur Dimerisierung neigt und Ovotransferrin am wenigsten. Hierbei ist mit Dimerisierung auch die Bildung von Aggregaten höheren Grades gemeint, die zu einem kleinen Teil stattfindet. Im weiteren Text ist dies unter dem Begriff Dimerisierung mit eingeschlossen.

Unter der Zugabe NaCl lässt sich auch mit dem BisTris-Puffer die Dimerisierung reduzieren. Dies dient dem Nachweis, dass tatsächlich die Ionenstärke für die unterschiedlichen Dimer/Monomer-Verhältnisse des jeweiligen Proteins verantwortlich ist.

4.2 SDS-Page

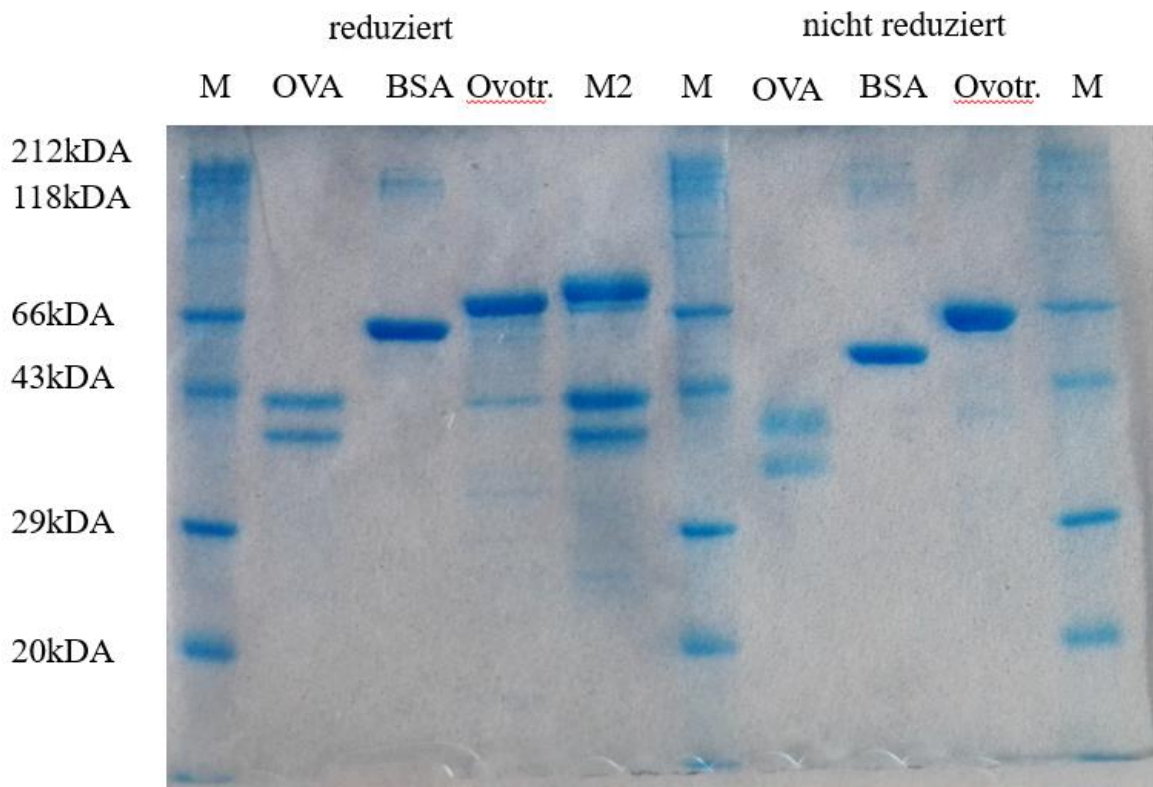


Abbildung 14: In einem SDS-Gel werden reduzierte und nicht reduzierte Proteinproben von OVA, BSA und Ovotransferrin aufgetragen. Als Marker wird Roti-Mark Standard verwendet. M2 ist ein selbst hergestellter Marker aus Lactoferrin und Ovalbumin.

Im abgebildeten SDS-Gel sind die Banden für die Monomere von OVA, BSA und Ovotransferrin gut erkennbar. Bei BSA ist allerdings noch eine weitere kürzer gelaufene Bande erkennbar. BSA hat als einziges in einem Maße Aggregate gebildet, dass diese innerhalb der Nachweisgrenze einer SDS-PAGE liegen. In einem SDS Gel liegen Bedingungen vor, die der Aggregation entgegenwirken. Dies ist der geladene Tris-Puffer, sowie das SDS. Dass BSA auch unter diesen Bedingungen Aggregate bildet, zeigt die stärkere Neigung von BSA zur Dimerisierung gegenüber OVA und Ovotransferrin. Diese Aggregate erscheinen sowohl in der reduzierten Probe als auch in der nicht reduzierten. Dies lässt darauf schließen, dass die Aggregation unter diesen Bedingungen nicht durch Disulfidbrücken zwischen den BSA-Proteinen begründet ist. Ansonsten wäre diese Aggregation nur in der nicht reduzierten Probe erkennbar.

4.2 Frontalchromatographie

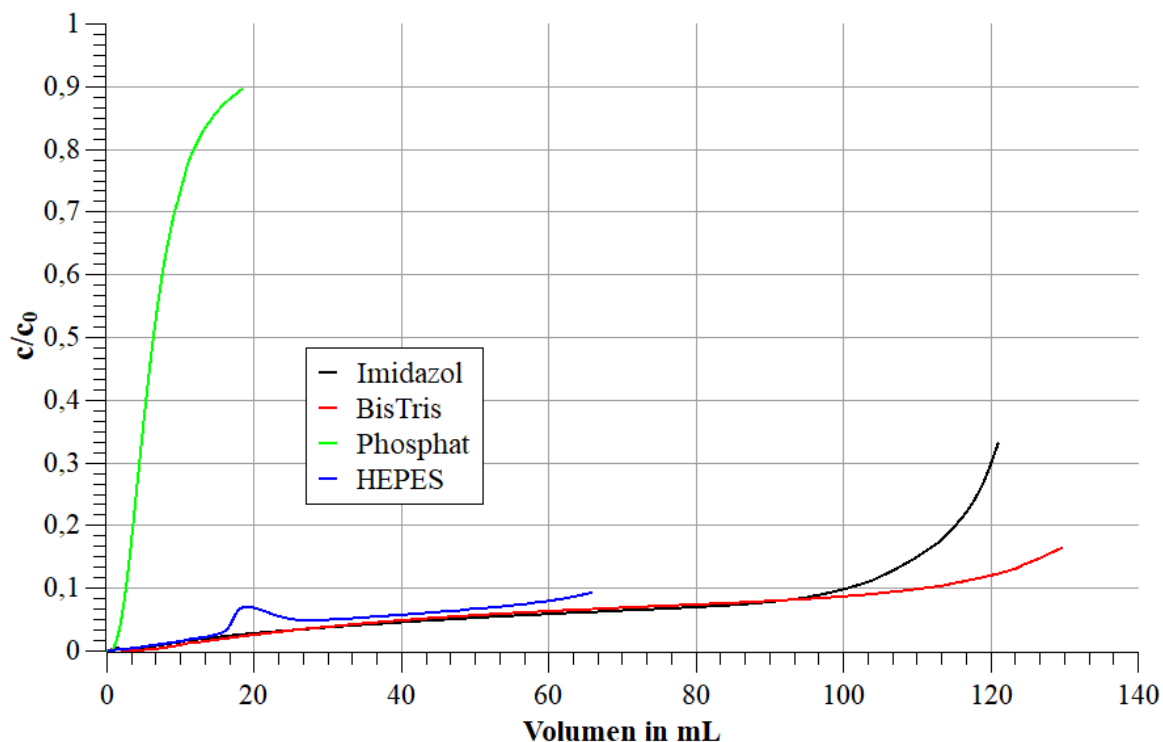


Abbildung 15: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-Säule. Hierbei wird 1mg/mL Ovotransferrin mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM Puffers aufgetragen. Bei Imidazol ergibt sich eine dynamische Kapazität von 96,7mg, bei BisTris 105,3mg, bei Phosphat 2,5mg, bei HEPES 62,8mg.

In den abgebildeten Durchbruchkurven von Ovotransferrin unter Verwendung der verschiedenen Puffer sind große Unterschiede zu erkennen im Verlauf der Kurve und der dynamischen Kapazität. Besonders die Durchbruchkurve, welche unter Verwendung des Phosphat-Puffers entsteht, zeigt einen deutlich anderen Verlauf, als die anderen drei Durchbruchkurven. Hierbei wird die beste dynamische Kapazität unter der Verwendung von BisTris erreicht. Eine ähnlich hohe dynamische Kapazität wird unter der Verwendung von Imidazol erreicht. Der Versuch unter Verwendung des HEPES-Puffers war beendet, bevor die Durchbruchkurve $c/c_0=0,1$ erreicht. Insofern kann die dynamische Kapazität hier nicht bestimmt werden. Es lässt sich allerdings vermuten, dass die Durchbruchkurve $c/c_0=0,1$ bei ca. 70mL aufgetragenem Probenvolumen erreichen würde. Da die Kurve in ihrem abgebildeten

Verlauf über den Kurven von BisTris und Imidazol liegt, würde dies in einer geringeren dynamischen Kapazität resultieren als bei BisTris und Imidazol. Die dynamische Kapazität des HEPES-Puffers ist aber deutlich höher als die des Phosphat-Puffers. Die Durchbruchskurve, welche unter Verwendung des Phosphat-Puffers entsteht, hat einen sehr frühen und auch einen sehr steilen Anstieg, der sich bis zu hohen c/c_0 -Werten hinzieht und erst dann langsam abflacht. Hierbei fällt auf, dass der BisTris-Puffer, welche die beste dynamische Kapazität bewirkt, die geringste Ladung besitzt. So liegt der BisTris-Puffer überwiegend ungeladen vor. Der Imidazol-Puffer liegt auch überwiegend ungeladen vor, allerdings in einem geringeren Maße als BisTris. Dieser hat die zweithöchste dynamische Kapazität. Der HEPES-Puffer liegt gleichermaßen als Zwitterion wie einfach negativ geladen vor. Er hat also schon eine höhere Ladung und bewirkt auch eine schlechtere dynamische Kapazität als BisTris und Imidazol. Der Phosphatpuffer ist am stärksten geladen. Er liegt überwiegend zweifach negativ geladen vor. Aus dieser Abfolge entsteht der Eindruck, dass eine stärkere Pufferladung eine geringere dynamische Kapazität bewirkt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die Ladungen auf die Wechselwirkungen zwischen Protein und stationärer Phase auswirken. Der Phosphat-Puffer besitzt eine Ladung, die entgegengesetzt zur stationären Phase ist. Somit lagern sich die Phosphat-Pufferionen an den funktionellen Gruppen der stationären Phase an und schirmen diese von den Proteinen durch eine Herabsetzung des Zeta-Potentials ab. Da die Phosphat-Pufferionen überwiegend zweifach negativ geladen sind, ist diese Abschwächung sogar noch stärker. Der Teil der HEPES-Pufferionen, welcher einfach negativ geladen ist, wird sich ebenfalls an der stationären Phase anlagern und die Ladung abschirmen. Da die HEPES-Pufferionen aber nur teilweise eine negative Nettoladung besitzen und dies auch nur eine einfache negative Ladung ist, fällt die Abschirmung schwächer aus. Der Teil der BisTris und Imidazol Moleküle, welcher geladen vorliegt, besitzt eine positive Ladung. Hier wäre denkbar, dass sich diese Pufferionen an die negativ geladenen Gruppen des Proteins anlagern und dadurch die Wechselwirkung zwischen Protein und stationärer Phase abschwächen. Da diese Puffermoleküle aber überwiegend ungeladen vorliegen, spielt dieser Effekt kaum eine Rolle. Es könnte allerdings begründen, weshalb die dynamische Kapazität unter der Verwendung von BisTris noch höher ist, als unter der Verwendung von Imidazol. Bei BisTris liegt das Gleichgewicht noch weiter auf der Seite des ungeladenen Zustands.

Durch die Ergebnisse der SEC wurde gezeigt, dass die Ladung der Puffer auch einen Einfluss auf die Dimerisierung von Proteinen hat. Weiter wurde aber auch gezeigt, dass Ovotransferrin nur wenig zur Dimerisierung neigt und dass auch unter Verwendung eines überwiegend ungeladenen Puffers, wie BisTris, verhältnismäßig wenig Dimere gebildet werden. Insofern

entsteht bei Ovotransferrin keine große Behinderung des Massentransportes durch Dimere bei der Verwendung von ungeladenen Puffern. Daher stellen Puffer, die überwiegend ungeladen vorliegen, für Ovotransferrin eine gute Wahl dar, da diese die Adsorption des Proteins an die stationäre Phase nicht behindern.

An dieser Stelle muss aber auch festgehalten werden, dass die errechneten dynamischen Kapazitäten sich nicht dieselbe statische Kapazität haben. Die unterschiedlichen Puffer wirken sich unterschiedlich auf die Adsorptionskinetik aus und erzeugen so verschiedene statische Kapazitäten. Die unterschiedlichen dynamischen Kapazitäten sind hier also überwiegend eine Folge unterschiedlicher statischer Kapazitäten. Dies kann durch die statische Kapazität des Phosphat-Puffers gezeigt werden. Die Durchbruchskurve unter Verwendung des Phosphat-Puffers läuft hier nur bis ca. $c/c_0=0,9$. Insofern kann die statische Kapazität nicht endgültig bestimmt werden. Dennoch ist eine Abschätzung der statischen Kapazität möglich, indem die Kurve als punktsymmetrisch behandelt wird, auch wenn dies dem Kurvenverlauf nicht ganz entspricht. So ergibt sich hier eine statische Bindungskapazität von ca. 10mg. Hier zeigt sich, dass die statische Kapazität unter Verwendung des Phosphat-Puffers kleiner ist, als die dynamische Kapazität unter Verwendung der anderen Puffer. Da aber bei gleichbleibender Adsorptionskinetik die dynamische Kapazität maximal so groß sein kann wie die statische Kapazität, aber nicht größer, ist hiermit gezeigt, dass den Versuchen andere statische Kapazitäten zu Grunde liegen. Die unterschiedliche Ladung der Puffer wirkt sich also auf die Adsorptionskinetik aus.

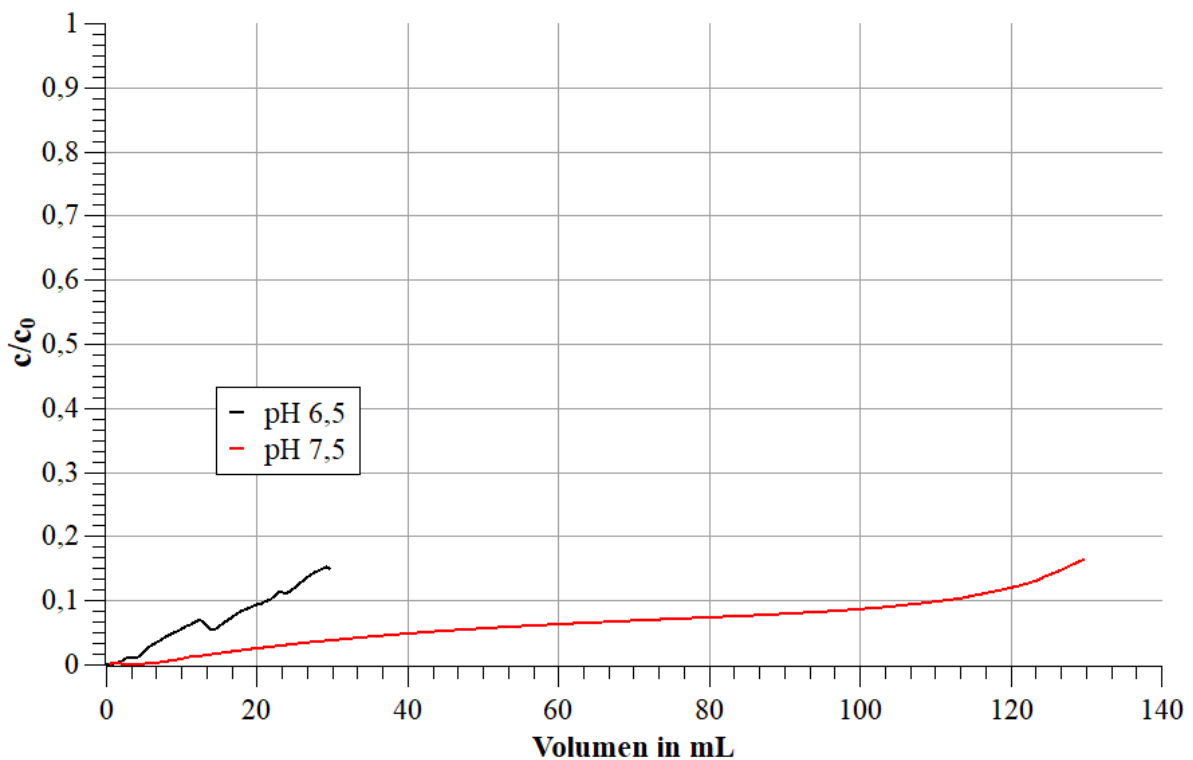


Abbildung 16: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-Säule. Hierbei wird 1mg/mL Ovotransferrin mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min unter Verwendung eines 20mM BisTris-Puffers aufgetragen. Bei pH 7,5 ergibt sich eine dynamische Kapazität von 105,3mg bei pH 6,5 20,7mg.

Abbildung 16 zeigt hierbei, dass auch der pH-Wert einen Einfluss auf die Durchbruchkurven nimmt. Bei der Verwendung von BisTris wird dabei für Ovotransferrin bei pH 6,5 eine geringere dynamische Kapazität erreicht als bei pH 7,5. Dies könnte dadurch begründet sein, dass BisTris bei diesem pH-Wert stärker geladen vorliegt und sich negativ auf die Adsorptionskinetik auswirkt. Wahrscheinlicher ist aber, dass der frühere Durchbruch dadurch bedingt ist, dass dieser pH-Wert sehr nah am pI von Ovotransferrin liegt. Dies bedeutet Ovotransferrin besitzt hier fast eine neutrale Nettoladung, was sich negativ auf die Adsorptionskinetik auswirkt.

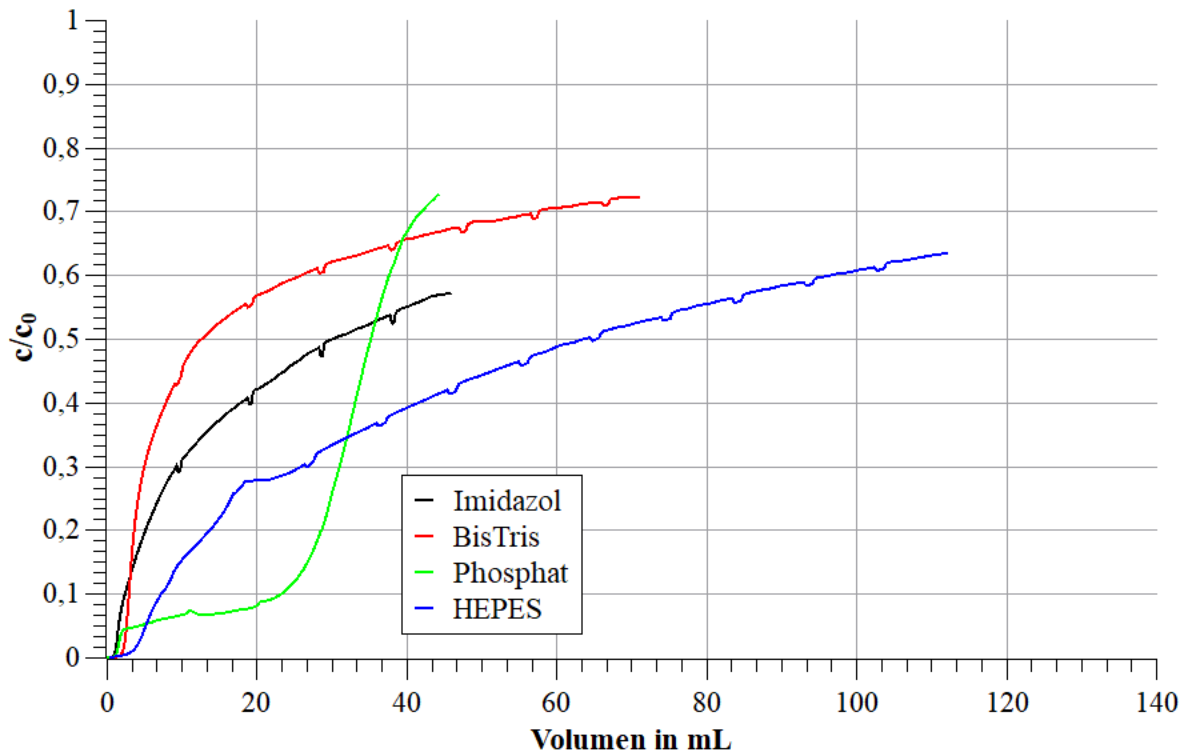


Abbildung 17: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-Säule. Hierbei wird 1mg/mL BSA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM Puffers aufgetragen. Bei Imidazol ergibt sich eine dynamische Kapazität von 2,9mg, bei BisTris 3mg, bei Phosphat 24,8mg und bei HEPES 7,2mg.

Die Durchbruchkurven von BSA zeigen einen ganz anderen Verlauf als die Durchbruchkurven von Ovotransferrin. Hierbei ist nicht nur die Form und die dynamische Kapazität eine andere. Auch lässt sich hier nicht die höchste dynamische Kapazität der geringsten Pufferladung zuordnen, wie es bei Ovotransferrin der Fall ist. Dies ist dadurch begründet, dass bei BSA die Limitierung des Massentransports einen wesentlich stärkeren Einfluss nimmt. So wurde durch die Ergebnisse der SEC gezeigt, dass BSA bei Puffersystemen mit niedriger Ionenstärke hauptsächlich dimerisiert vorliegt. Obwohl BSA als einzelnes Protein eigentlich kleiner ist, als Ovotransferrin, wird es durch diese Dimerisierung erheblich größer. Dies behindert den Massentransport in das Porensystem der Säule. Größere Proteine haben eine geringere Diffusität und können nicht in alle Poren eindringen. Außerdem wird ihre Diffusion durch die Porenwände noch stärker behindert und auch das Verhältnis Porengröße zu Proteingröße ist kleiner. Auch die Kurvenform zeigt, dass die schlechte dynamische Kapazität unter der Verwendung von BisTris, Imidazol und HEPES durch Limitierung des Massentransportes verursacht ist. So ist der Durchbruch unter Verwendung des

Phosphatpuffers am steilsten. Dies weist darauf hin, dass hier der Massentransport am wenigsten gestört ist. Dies erklärt sich auch durch die Ergebnisse der SEC. Bei der Verwendung einer höheren Ionenstärke treten, durch den Einsalzeffekt, bei BSA wesentlich weniger Dimere auf. Insofern wird der Massentransport hier weniger stark limitiert. HEPES hat eine geringere Ladung als der Phosphatpuffer. Insofern bewirkt er einen geringeren Einsalzeffekt. Die BSA Proteine liegen zu einem größeren Anteil dimerisiert vor und limitieren somit den Massentransport stärker. Dies sorgt für die geringere dynamische Kapazität. Die Durchbruchskurve hat keinen sigmoidalen Verlauf mehr, sie steigt zu Beginn etwas schneller an und flacht dann bei noch niedrigen c/c_0 -Werten ab. Auch dies weist auf einen limitierten Massentransport hin. Imidazol und BisTris sind noch schwächer geladen. Deshalb bewirken sie einen schwächeren Einsalzeffekt, was, wie in den SEC-versuchen gezeigt, zu einer stärkeren Dimerisierung und damit zu einer stärkeren Limitierung des Massentransportes führt. Somit sind die dynamischen Kapazitäten hier noch geringer.

Der Effekt, dass die Stärke der Ladung der Puffer sich auf die Adsorptionskinetik zwischen Protein und stationärer Phase auswirkt ist auch hier vorhanden. Er wird allerdings durch den Effekt der Limitierung des Massentransportes überdeckt. Dass dieser Effekt aber dennoch da ist, zeigt die nächste Abbildung.

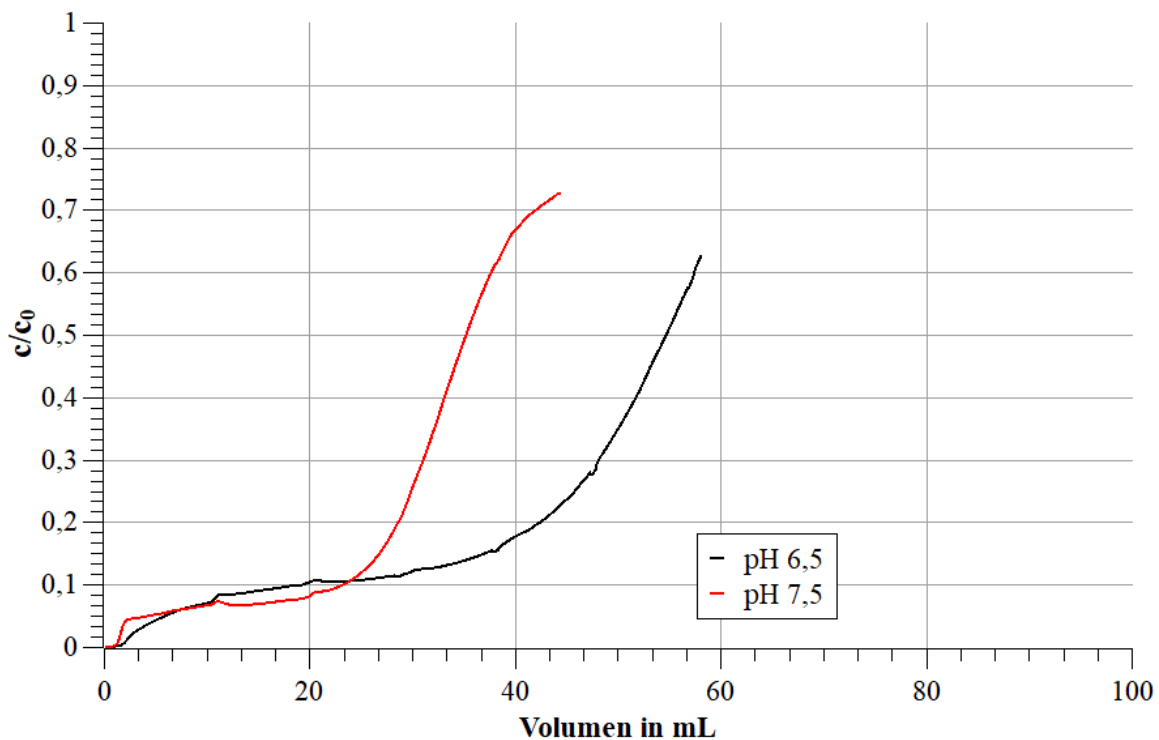


Abbildung 18: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-Säule bei pH 6,5 und pH 7,5. Hierbei wird 1mg/mL BSA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min unter der Verwendung eines 20mM Phosphat-Puffers aufgetragen. Bei pH 7,5 ergibt sich eine dynamische Kapazität von 24,8mg und bei pH 6,5 16,4mg.

Hier sind die Durchbruchkurven von BSA unter Verwendung des Phosphatpuffers bei pH 6,5 und bei pH 7,5 dargestellt. Hierbei muss erwähnt werden, dass die Säule zum Zeitpunkt der Versuche leichten Verunreinigungen unterlag. Diese wurden später durch waschen mit NaOH beseitigt, sind allerdings noch in beiden Versuchen auf der Säule vorhanden. Ohne diese Verunreinigungen ist es wahrscheinlich, dass die Durchbruchkurven insbesondere vor dem Durchbruch niedriger verlaufen würden. Dies würde auch darin resultieren, dass die dynamische Kapazität der Durchbruchskurve bei pH 6,5 größer wäre, als die bei pH 7,5. Es ist allerdings auch so zu erkennen, dass der Durchbruch bei pH 6,5 später erfolgt als bei pH 7,5. Dies ist dadurch begründet, dass bei pH 6,5 der Phosphatpuffer überwiegend einfach negativ geladen ist. Insofern schirmt er die stationäre Phase nicht so stark, wie es bei pH 7,5 der Fall ist. Dadurch steigt die statische Kapazität an und der Durchbruch verschiebt sich zu höheren Volumina. Allerdings ist auch zu erkennen, dass der Durchbruch bei pH 6,5 weniger steil verläuft als bei pH 7,5. Dieser Effekt ist eher klein. Es kann darauf hinweisen, dass bei pH 6,5

durch die niedrigere Ladung des Phosphatpuffers die Dimerisierung wieder ansteigt und den Massentransport etwas stärker limitiert. Da sich die Steilheit aber nicht wesentlich unterscheidet, könnte dieser Unterschied auch durch den späteren Durchbruch begründet sein. Bei späteren Durchbrüchen nimmt die Steilheit des Durchbruchs ab [(1) B.Ansbach].

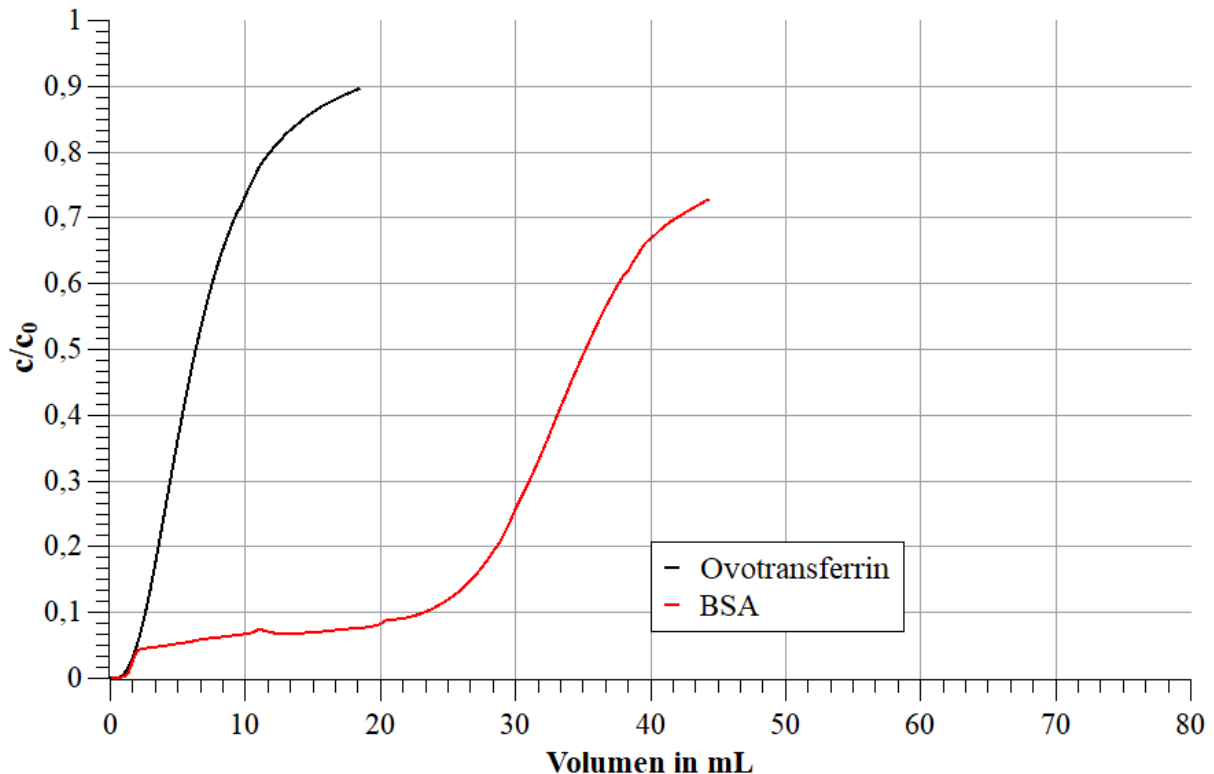


Abbildung 19: Vergleich der Durchbruchkurven von BSA und Ovotransferrin unter Verwendung eines 20mM Phosphatpuffers bei pH 7,5. Die Konzentration der Proteinlösungen beträgt 1mg/mL und wird mit einer Flussrate von 1mL/min auf eine DEAE-Säule gegeben. Für Ovotransferrin ergibt sich eine dynamische Kapazität von 2,5mg und bei BSA 24,8mg.

In Abbildung 19 zeigt sich noch ein weiterer Effekt. Die dynamische Kapazität ist für BSA unter der Verwendung von Imidazol, BisTris und HEPES schlechter als für Ovotransferrin. Unter Verwendung des Phosphatpuffers hat BSA allerdings eine höhere dynamische Kapazität. Dies begründen vor allem zwei Faktoren. Zum einen ist die Limitierung des Massentransportes, wie bereits beschrieben, unter Verwendung des Phosphatpuffers bei BSA weniger stark. Es ist zu erkennen, dass der Durchbruch bei BSA weniger steil ist, als bei Ovotransferrin, was darauf hindeutet, dass der Massentransport bei BSA immer noch stärker limitiert ist. Aber der Effekt hat nicht so einen starken Einfluss wie bei der Verwendung der anderen Puffer. Der zweite Effekt ist dadurch hervorgerufen, dass den dynamischen Kapazitäten andere statische Kapazitäten zu Grunde liegen. Dies lässt sich dadurch zeigen, dass die dynamische Kapazität

von BSA in diesem Versuch höher ist als die statische Kapazität von Ovotransferrin. Diese wurde für diesen Versuch auf 10mg abgeschätzt, was bereits bei den Durchbruchkurven von Ovotransferrin beschrieben wurde. Die unterschiedlichen statischen Kapazitäten lassen sich vor allem durch die unterschiedlich starke Nettoladung erklären. Der Phosphat-Puffer schirmt die stationäre Phase ab und schwächt somit die Wechselwirkung zwischen Protein und stationärer Phase. Da BSA aber eine wesentlich höhere Nettoladung bei pH 7,5 besitzt, sind die Wechselwirkungen zwischen BSA und der stationären Phase stärker als zwischen Ovotransferrin und der stationären Phase. Dadurch ergibt sich eine höhere statische Kapazität mit einer ebenfalls höheren dynamischen Kapazität.

Die Effekte des Puffersystems auf den Massentransport und auf die Adsorptionskinetik lassen sich auch bei Ovalbumin zeigen.

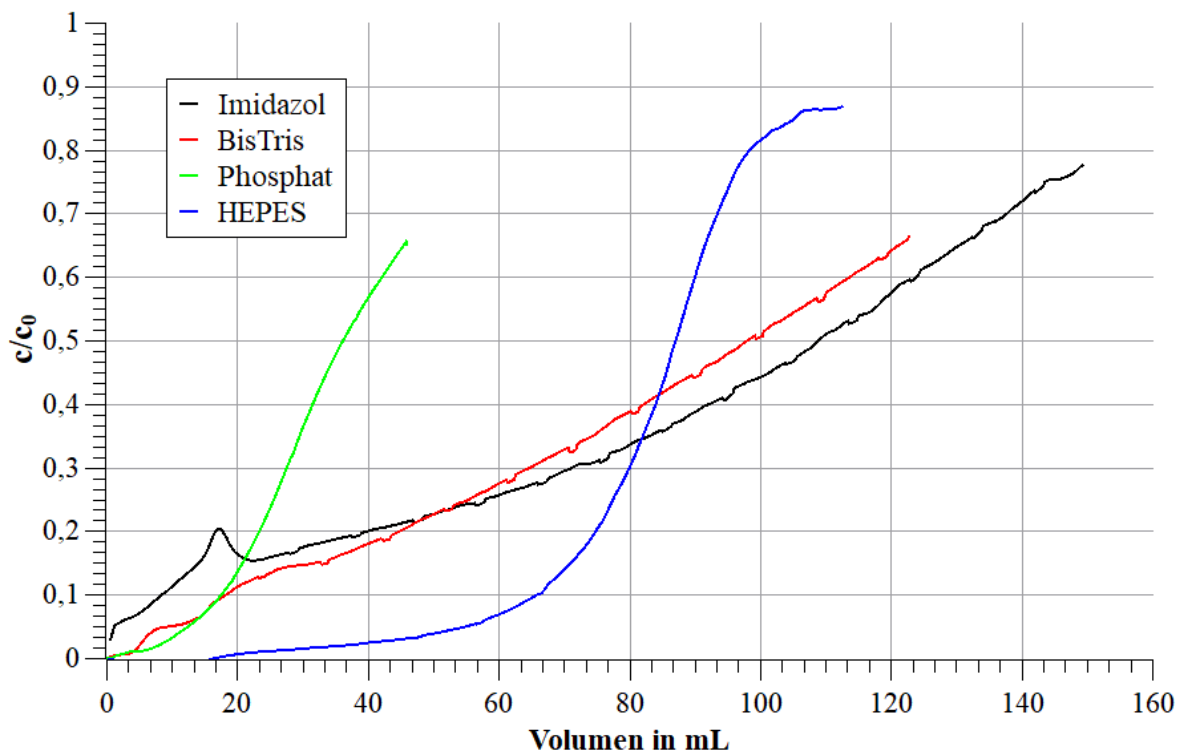


Abbildung 20: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-Säule. Hierbei wird 1mg/mL OVA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM Puffers aufgetragen. Bei Imidazol ergibt sich eine dynamische Kapazität von 8,0mg, bei BisTris 17,6mg, bei Phosphat 17,6mg und bei HEPES 64,5mg.

Wie die SEC zeigt, neigt Ovalbumin in einem stärkeren Maße zur Dimerisierung als Ovotransferrin, jedoch nicht so stark wie BSA. Die Berechnung der Nettoladung zeigt, dass Ovalbumin eine niedrigere negative Nettoladung hat als BSA, jedoch eine höhere negative Nettoladung als Ovotransferrin. Durch diese Eigenschaften erklären sich auch die Durchbruchskurven. Bei der Verwendung von BisTris und Imidazol ist der Massentransport durch eine erhöhte Dimerisierung limitiert. Insofern sind hier keine steilen Durchbrüche zu erkennen, sondern Durchbruchskurven, die fast linear verlaufen. Allerdings ist hier der Massentransport nicht so stark limitiert wie bei BSA unter Verwendung dieser Puffer. Die Ladung des HEPES-Puffers scheint dazu auszureichen, die Dimerisierung von OVA in einem ausreichenden Maße zu unterbinden, sodass hier eine dynamische Kapazität erreicht wird, die der dynamischen Kapazität unter Verwendung des HEPES-Puffers bei Ovotransferrin sehr ähnlich ist. Hier muss auch beachtet werden, dass die Ovalbumin-Dimere, sofern sie auftreten, eine deutlich geringere Masse haben als die BSA-Dimere. Insofern wird also auch beim Auftreten von Dimeren der Massentransport weniger stark limitiert. Als nächstes fällt auch auf, dass die dynamische Kapazität unter Verwendung des Phosphatpuffers niedriger ist als unter der Verwendung des HEPES-Puffers. Der Massentransport läuft unter Verwendung des Phosphatpuffers durch die geringe Dimerisierung besser ab. Hier lässt sich wieder der Effekt des Puffers auf die Adsorptionskinetik beobachten. Der stark geladene Phosphatpuffer beeinträchtigt die Adsorptionskinetik so stark, dass trotz eines verbesserten Massentransportes die dynamische Kapazität verringert wird. Es fällt außerdem auf, dass die dynamische Kapazität unter der Verwendung des Phosphat-Puffers bei Ovalbumin höher ist als bei Ovotransferrin, aber niedriger als bei BSA. Dies ist durch die Nettoladung begründet. Die negative Nettoladung von Ovalbumin ist höher als die von Ovotransferrin, insofern verbessert sich die Adsorptionskinetik. Die negative Nettoladung ist allerdings geringer als bei BSA, was eine schwächere Adsorptionskinetik bedeutet. Dieser Effekt scheint insbesondere dann besonders stark in Erscheinung zu treten, wenn die Adsorptionskinetik zusätzlich durch einen stark geladenen Puffer abgeschwächt wird.

Wie die folgenden Durchbruchskurven zeigen, kann aber nicht nur ein stark geladener Puffer eine Dimerisierung unterbinden. Es ist ebenfalls möglich einen schwach geladenen Puffer unter der Zugabe von NaCl zu verwenden. Die NaCl-Zugabe erfolgt in einem Maße, dass sich in der Lösung 20mM positiv und negativ geladene Ladungsträger pro Liter befinden.

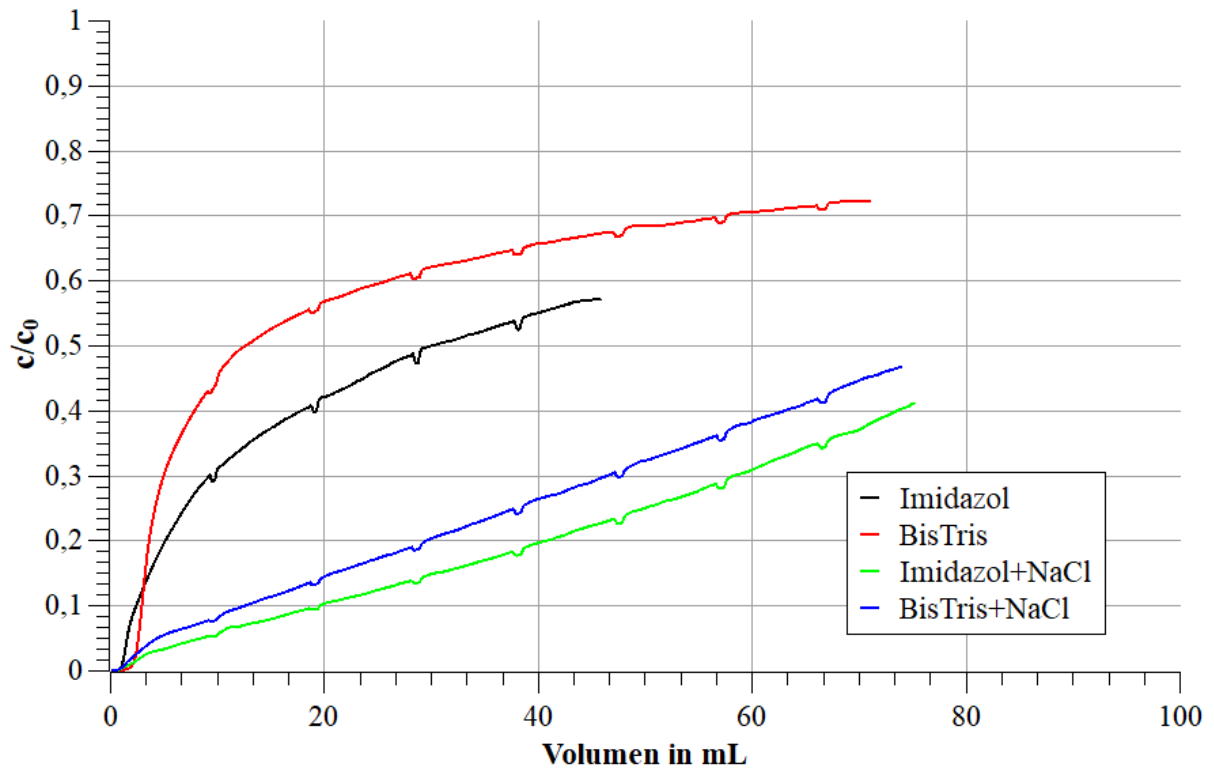


Abbildung 21: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-Säule. Hierbei wird 1mg/mL BSA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM Puffers aufgetragen. Bei Imidazol ergibt sich eine dynamische Kapazität von 2,9mg, bei BisTris 3,0mg, bei Imidazol+NaCl 18,6mg und bei BisTris+NaCl 11,9mg.

In dieser Abbildung zeigt sich, dass bei der Verwendung von schwach geladenen Puffern eine Zugabe von NaCl den Massentransport verbessern kann. So wurde in den SEC-Versuchen gezeigt, dass eine Zugabe von NaCl eine Dimerisierung ebenfalls unterdrücken kann. So ist sowohl bei der Verwendung von BisTris als auch bei der Verwendung von Imidazol eine Verbesserung der dynamischen Kapazität durch die Zugabe von NaCl erkennbar.

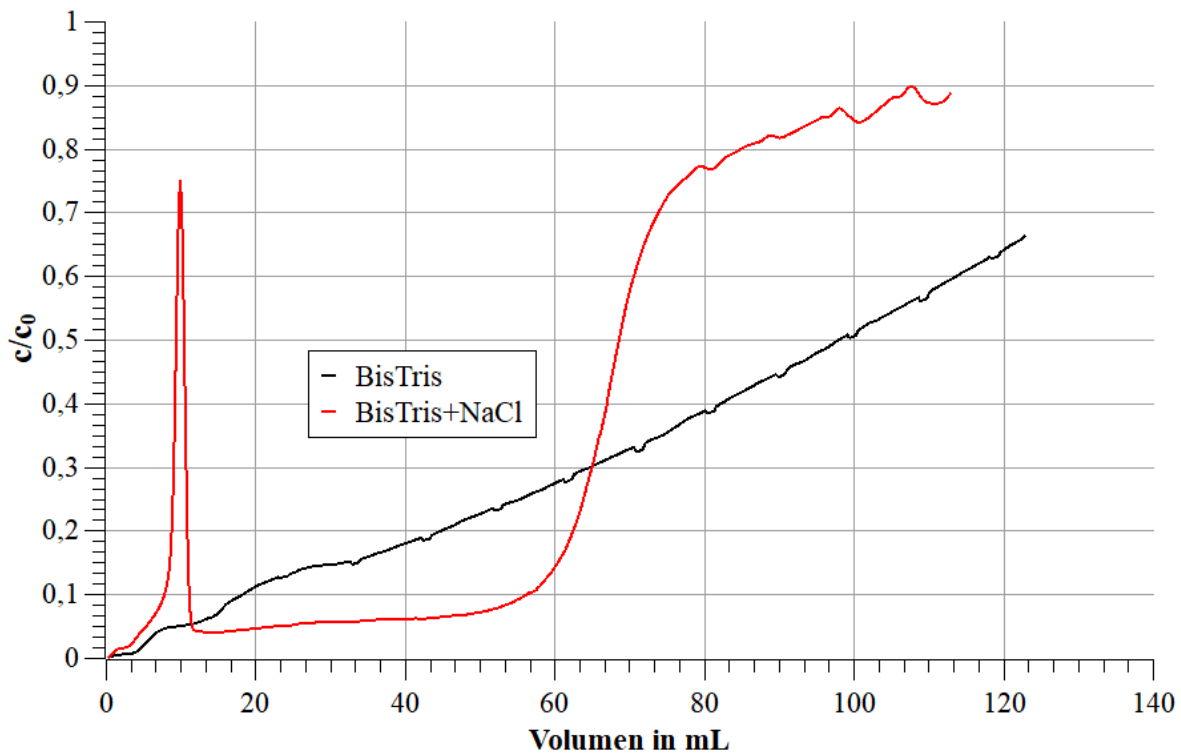


Abbildung 22: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-Säule. Hierbei wird 1mg/mL OVA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM Puffers aufgetragen. Bei Bis Tris ergibt sich eine dynamische Kapazität von 17,6mg und bei BisTris+NaCl 53,0mg.

Bei dem Versuch mit OVA unter der Verwendung von BisTris und NaCl erfolgte ein früher Durchbruch, möglicherweise war dies durch einen vorherigen Waschschritt mit NaOH begründet. Dennoch lässt sich erkennen, dass eine Zugabe von NaCl die dynamische Kapazität erhöht. Dies lässt sich wieder durch den Einzalzeffekt begründen, der eine Dimerisierung verringert und so den Massentransport verbessert. Die Verbesserung des Massentransportes ist auch daran erkennbar, dass der Durchbruch unter Zugabe von NaCl sehr viel steiler verläuft.

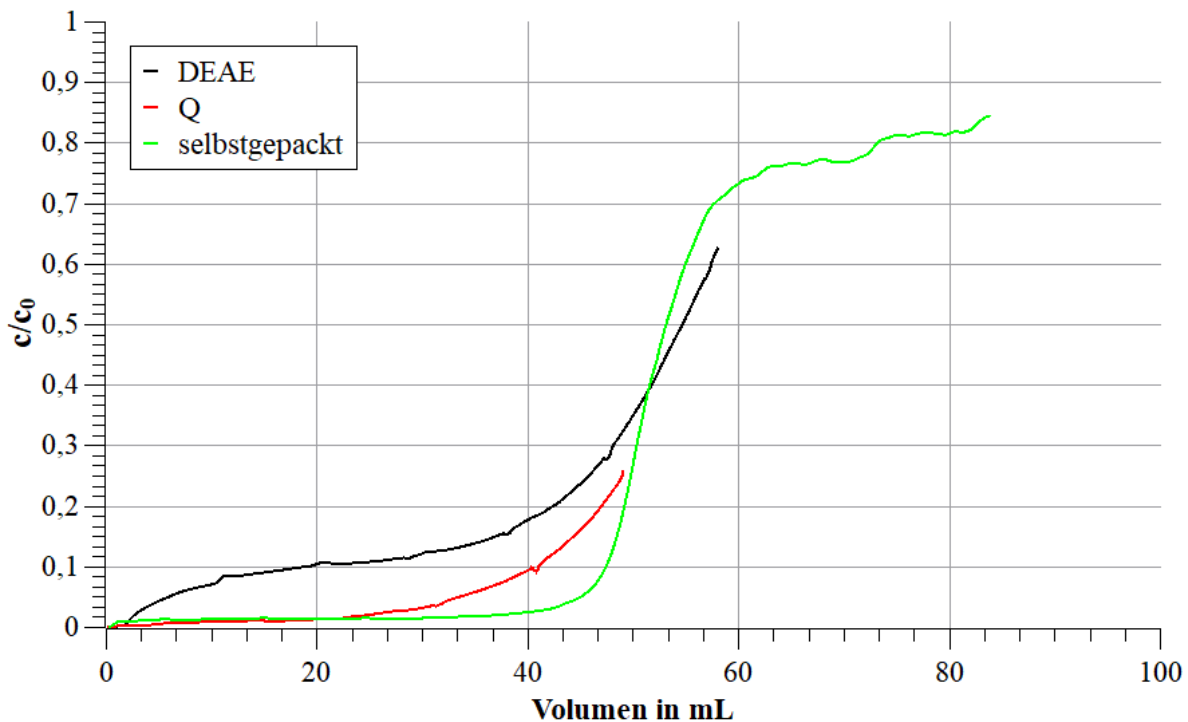


Abbildung 23: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-, einer Q- und einer selbstgepackten Säule. Hierbei wird 1mg/mL BSA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 6,5 unter Verwendung eines 20mM Phosphat-Puffers aufgetragen. Bei der DEAE-Säule ergibt sich eine dynamische Kapazität 16,4mg bei der Q-Säule 37,70mg und bei der selbstgepackten Säule 47,0mg.

Bei den Versuchen mit verschiedenen Säulen zeigen sich Unterschiede. Diese zeigen sich sowohl zwischen den beiden verschiedenen funktionellen Gruppen, als auch zwischen den unterschiedlichen Packungsmaterialien. Unter Verwendung des Phosphatpuffers bei pH 6,5 zeigt die DEAE-Säule die geringste dynamische Kapazität. Die Q-Säule zeigt eine höhere dynamische Kapazität. Die Q-Säule besitzt eine andere funktionelle Gruppe, aber dieselbe Matrix. Am besten schneidet die selbstgepackte Säule ab. Diese verfügt über eine leicht geringere Partikelgröße. So ist für das Material der DEAE und der Q-Säule eine Größenverteilung von 45µm bis 165µm angegeben mit einem Durchschnitt von 90µm. Für das EMD-Fractogel (M-Typ) ist eine Größenverteilung von 90µm bis 40µm angegeben. Es ist zwar kein Durchschnitt angegeben, doch bei dieser Größenverteilung muss der Durchschnitt unter 90µm liegen. Die Partikel sind also im Durchschnitt etwas kleiner. Für das Material der Q und der DEAE Säule ist in der Größenausschlusschromatographie ein Auftrennungsbereich von 10kDa bis 1000kDa angegeben. Für das EMD-Fractogel ist in der Größenausschlusschromatographie ein Auftrennungsbereich von 5kDa bis 1000kDa

angegeben. Die Porengröße befindet sich also im selben Größenbereich. Kleinere Partikel sorgen für einen besseren Massentransport. Ein Grund für die verbesserte dynamische Kapazität könnte, der von Merck beworbene, Effekt der längeren Spacer sein. Dadurch sollen mehr funktionelle Gruppen dasselbe Protein erreichen und für eine verbesserte Adsorption sorgen.

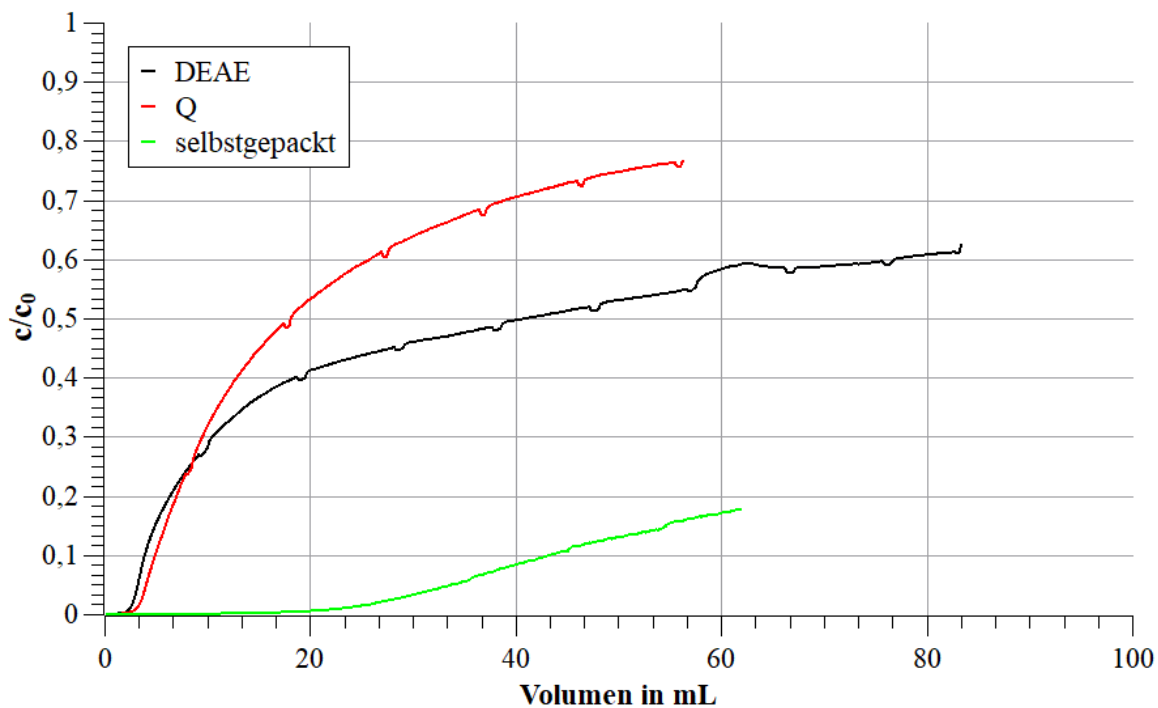


Abbildung 24: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-, einer Q- und einer selbstgepackten Säule. Hierbei wird 1mg/mL BSA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 6,5 unter Verwendung eines 20mM HEPES-Puffers aufgetragen. Bei der DEAE-Säule ergibt sich eine dynamische Kapazität 3,8mg bei der Q-Säule 4,9mg und bei der selbstgepackten Säule 42,3mg.

Bei der Verwendung von HEPES bei pH 6,5 zeigen die Q-Säule und die DEAE-Säule eine ähnliche dynamische Kapazität, wobei die der Q-Säule ein wenig höher liegt. Die selbstgepackte Säule zeigt auch hier wieder die höchste dynamische Kapazität. Auch ist hier erkennbar, dass auch unter Verwendung der Q-Säule und der selbstgepackten Säule, das Puffersystem immer noch dieselben Effekte ausübt. So sind auch bei diesen Säulen bei BSA die Durchbruchkurven unter der Verwendung von HEPES weniger steil als unter der Verwendung von Phosphat. Ebenso sind die dynamischen Kapazitäten, unter der Verwendung von Phosphat als Puffer, höher.

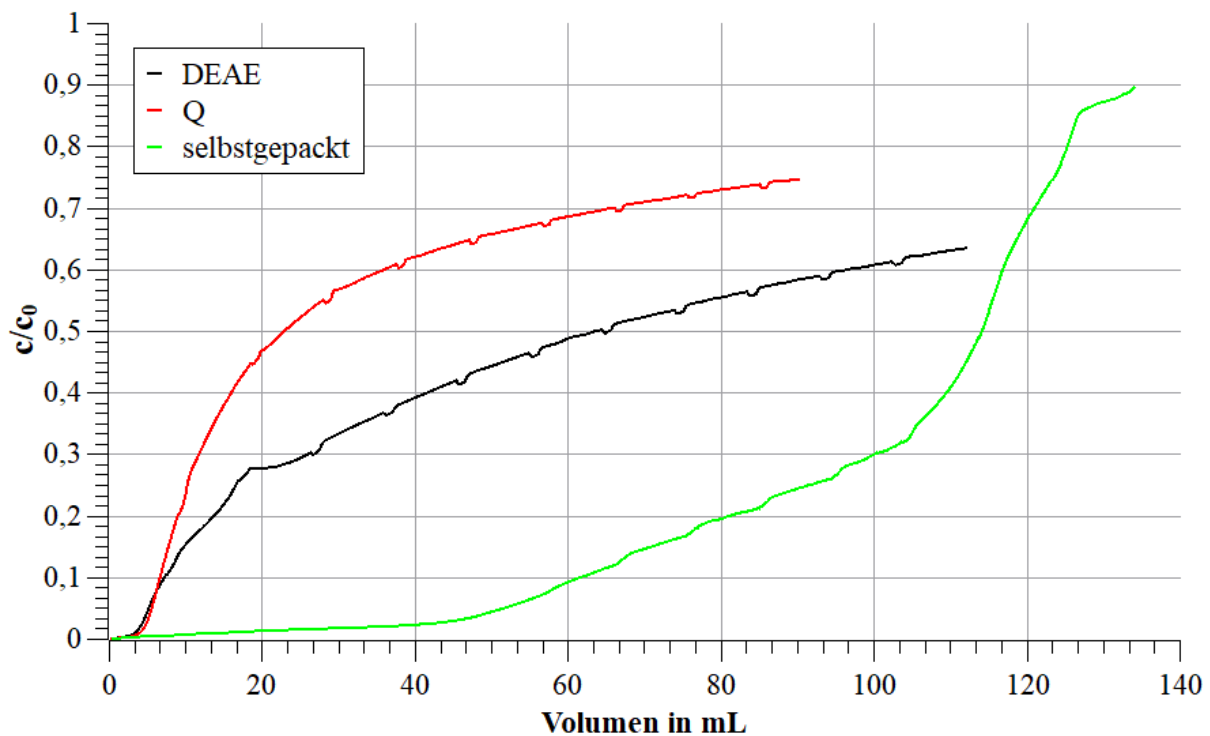


Abbildung 25: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-, einer Q- und einer selbstgepackten Säule. Hierbei wird 1mg/mL BSA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM HEPES-Puffers aufgetragen. Bei der DEAE-Säule ergibt sich eine dynamische Kapazität 7,2mg bei der Q-Säule 7,2mg und bei der selbstgepackten Säule 58,0mg.

Bei der Verwendung des HEPES-Puffers bei pH 7,5 ist ein ähnlicher Verlauf erkennbar. Die Q-Säule und die DEAE-Säule haben fast die gleiche dynamische Kapazität, während die selbstgepackte Säule die höchste dynamische Kapazität aufweist. Ebenso verhält es sich bei pH 8 unter der Verwendung des HEPES-Puffers. Zudem fällt auf, dass bei höheren aufgegebenen Probenvolumina die Q-Säule wesentlich höhere c/c_0 -Werte liefert als die DEAE-Säule.

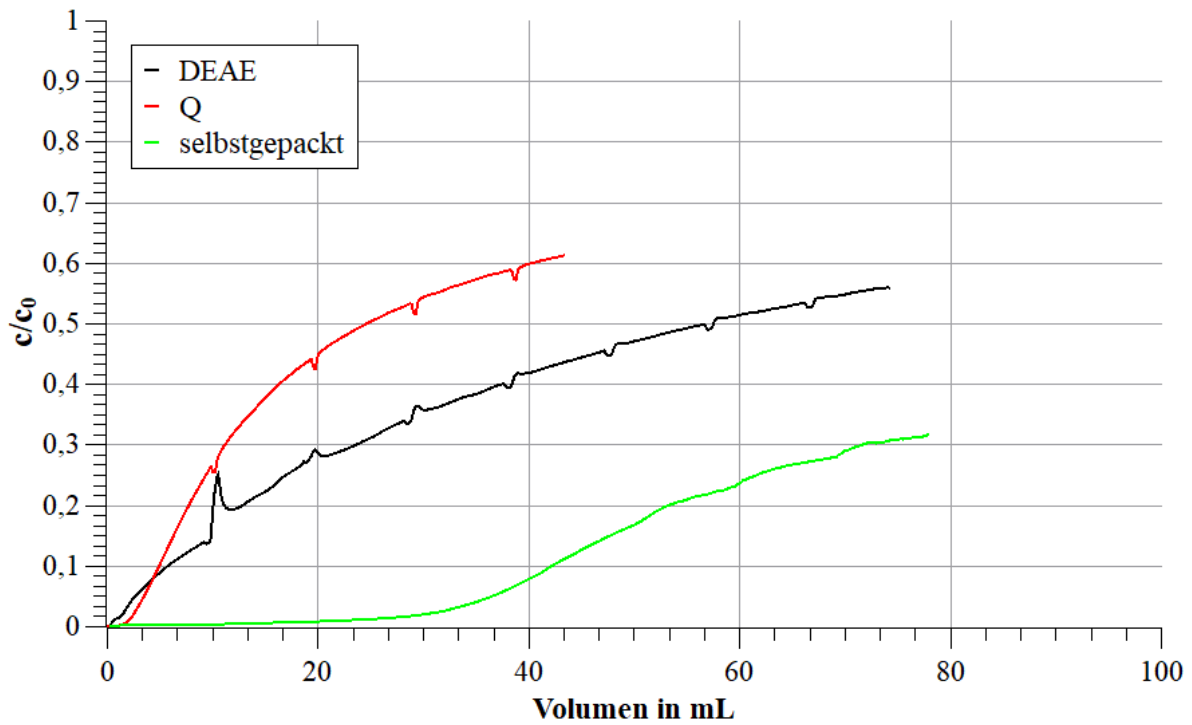


Abbildung 26: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-, einer Q- und einer selbstgepackten Säule. Hierbei wird 1mg/mL BSA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 8 unter Verwendung eines 20mM HEPES-Puffers aufgetragen. Bei der DEAE-Säule ergibt sich eine dynamische Kapazität 5,5mg bei der Q-Säule 4,9mg und bei der selbstgepackten Säule 40,4mg.

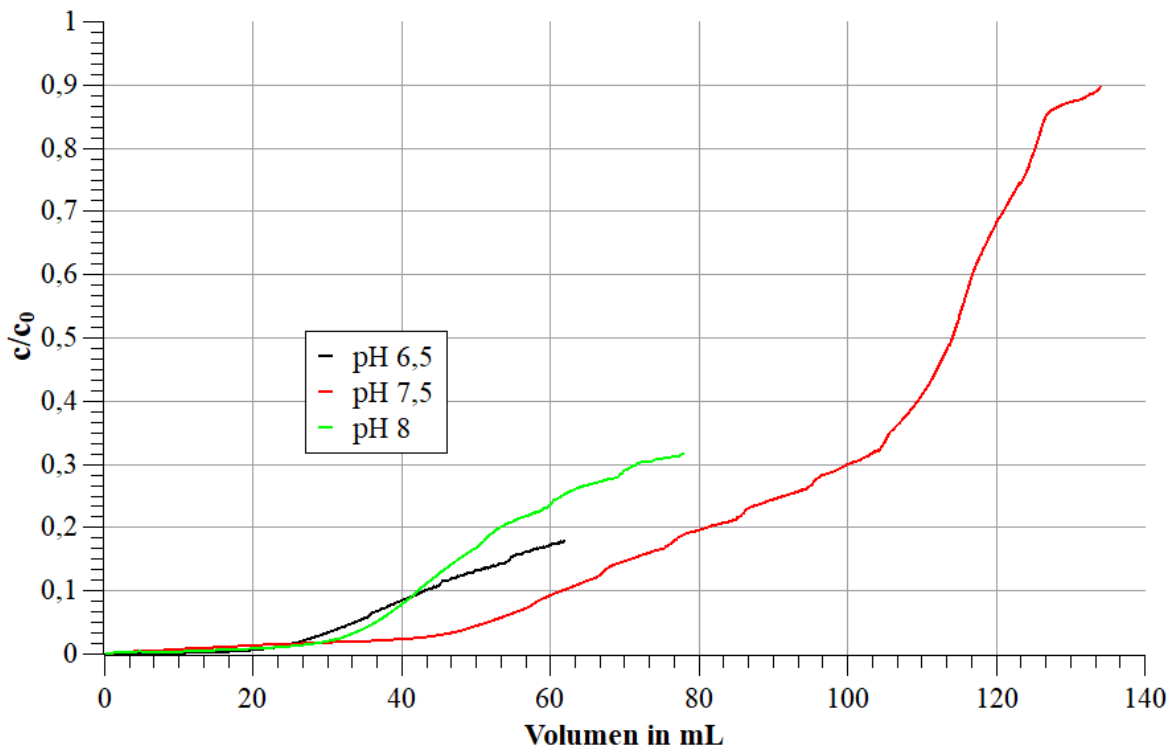


Abbildung 27 : Vergleich der Durchbruchkurven einer selbstgepackten DEAE-Säule
Hierbei wird 1mg/mL BSA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 6,5, pH
7,5 und pH 8 unter Verwendung eines 20mM HEPES-Puffers aufgetragen. Bei der pH
6,5 ergibt sich eine dynamische Kapazität 42,3mg bei der pH 7,5 58,0mg und bei pH 8
40,4mg.

Betrachtet man in Abbildung 27 die Durchbruchkurven der selbstgepackten Säule bei der Verwendung von HEPES unter unterschiedlich starken pH-Werten, ist auch hier ein Unterschied zu erkennen. Bei pH 7,5 wird eine bessere dynamische Kapazität erreicht als bei pH 6,5. Dies kann dadurch begründet sein, dass der HEPES-Puffer bei pH 7,5 in einem stärkeren Maße einfach negativ geladen vorliegt und weniger stark als Zwitterion, als bei pH 6,5. Möglicherweise kann dadurch ein stärkerer Einsalzeffekt hervorgerufen werden. Dieser sorgt dann für eine geringere Dimerisierung, was den Massentransport verbessert. Dieser Argumentation folgend müsste bei pH 8 aber eine gleiche oder noch höhere dynamische Kapazität zu beobachten sein. Dies ist allerdings nicht der Fall. Das kann dadurch begründet sein, dass pH 8 schon dem pK_s -Wert der DEAE-Gruppe näher kommt und diese ihre Ladung zunehmend verliert. Dadurch verliert sie dann auch zunehmend ihre Eigenschaft als Anionenaustauscher.

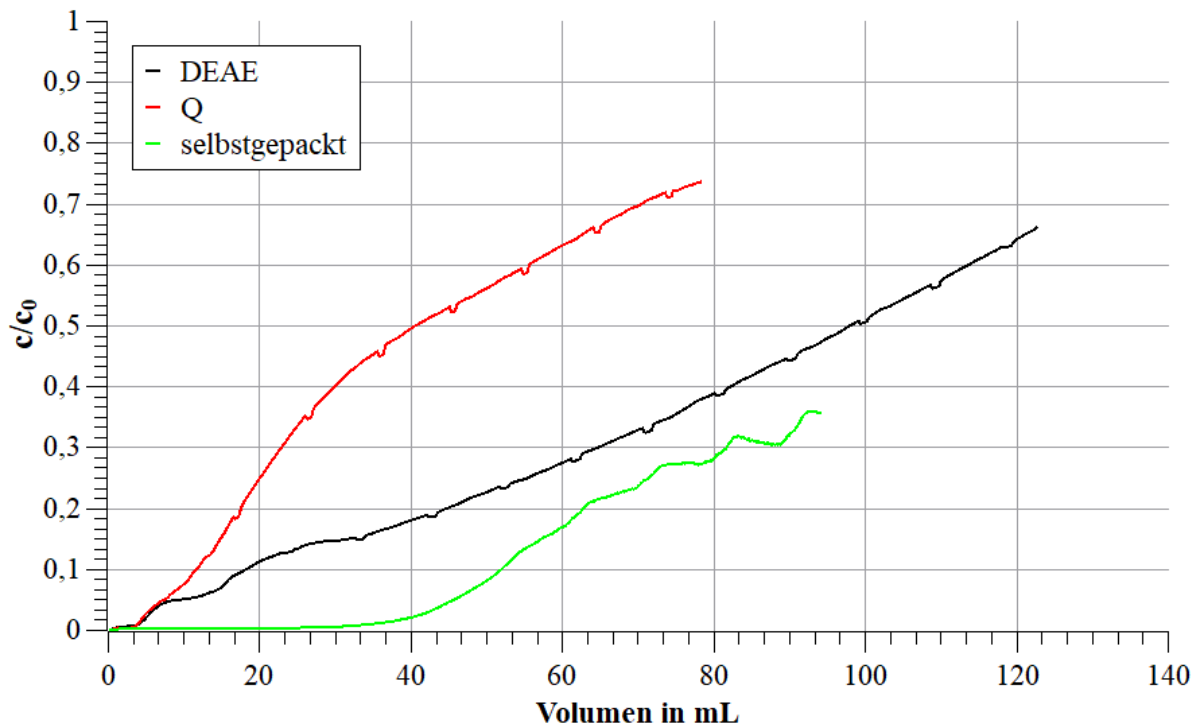


Abbildung 28: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-, einer Q- und einer selbstgepackten Säule. Hierbei wird 1mg/mL OVA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM BisTris-Puffers aufgetragen. Bei der DEAE-Säule ergibt sich eine dynamische Kapazität 17,6mg bei der Q-Säule 9,7mg und bei der selbstgepackten Säule 51,3mg.

Bei OVA unter der Verwendung von Imidazol lässt sich eine ähnliche Abfolge der dynamischen Kapazitäten beobachten. Die DEAE-Säule und die Q-Säule zeigen zuerst einen ähnlichen Verlauf. Mit zunehmendem Probenvolumen unterscheiden sie sich aber zunehmend, wobei bei der DEAE-Säule die Ausgangskonzentration deutlich langsamer ansteigt. Auch hier zeigt die selbstgepackte Säule die höchste dynamische Kapazität.

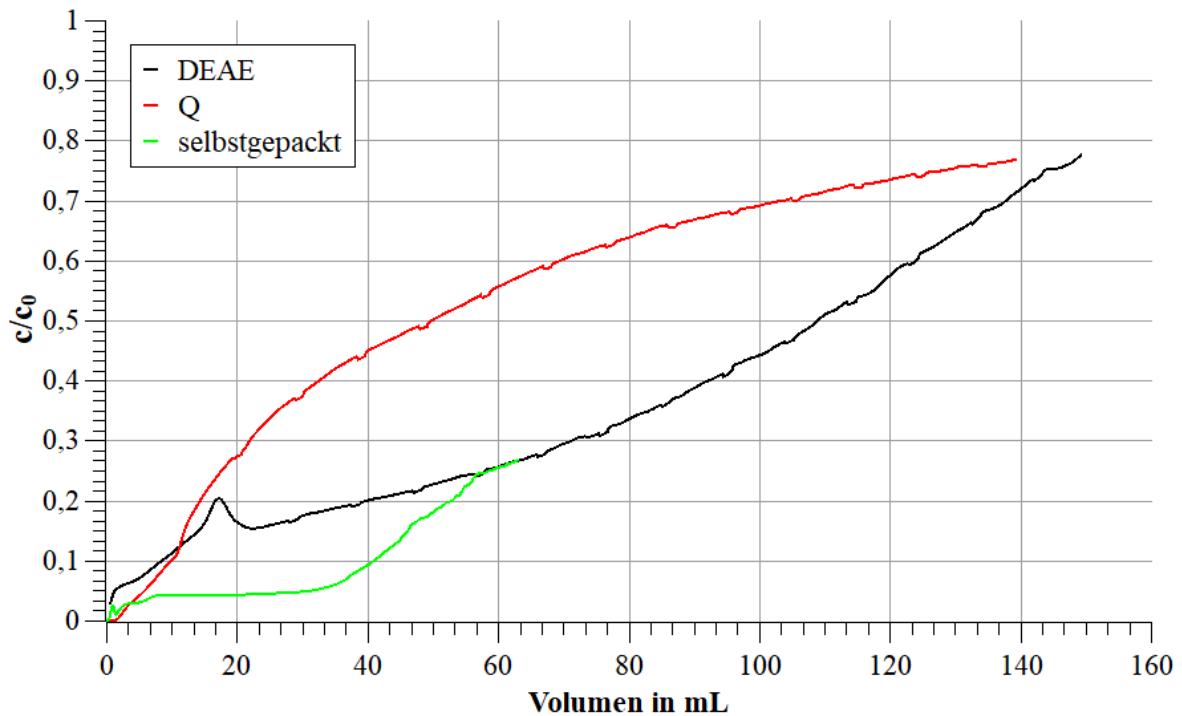


Abbildung 29: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-, einer Q- und einer selbstgepackten Säule. Hierbei wird 1mg/mL OVA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM Imidazol-Puffers aufgetragen. Bei der DEAE-Säule ergibt sich eine dynamische Kapazität 8,0mg bei der Q-Säule 9,6mg und bei der selbstgepackten Säule 38,2mg.

Bei dem Säulenvergleich für OVA unter der Verwendung von Imidazol zeigt sich eine ähnliche Abfolge der dynamischen Kapazitäten wie bei der Verwendung von BisTris. Bei höheren Probenvolumina nähert sich jedoch die Durchbruchkurve der selbstgepackten Säule in ihrem Verlauf dem Verlauf der DEAE-Säule. Dies könnte allerdings auch durch Verschmutzungen entstanden sein. So sind die Ergebnisse der Säulenvergleiche in der Reihenfolge hier aufgeführt, in welcher sie auch durchgeführt worden sind. Da aus der vorangegangenen Arbeit von Herrn Erdal bereits bekannt war, dass das Ovalbumin Verunreinigungen in sich trägt, welche die Säule verstopfen können, wurden die Säulen regelmäßig mit NaOH gereinigt. Diese Reinigung scheint sich auf die selbstgepackte Säule allerdings weniger auszuwirken. So zeigt der Säulenvergleich mit OVA unter der Verwendung des Phosphatpuffers keine wesentlichen Unterschiede mehr zwischen der selbstgepackten Säule und den anderen Säulen.

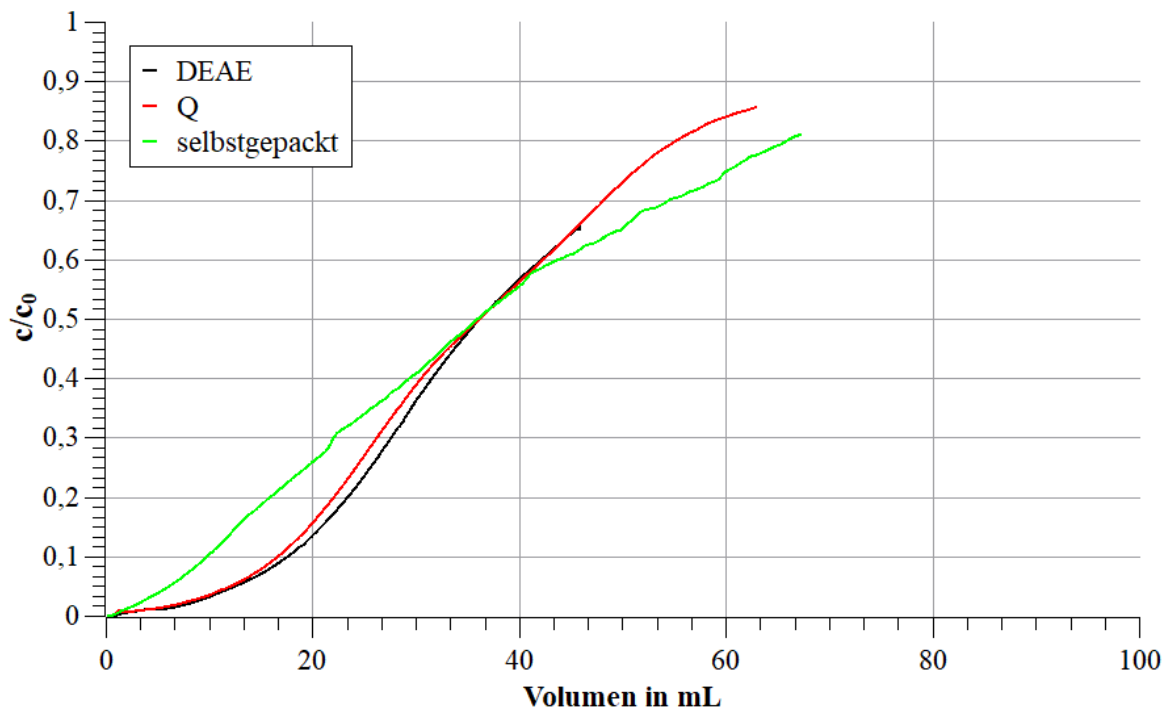


Abbildung 30: Vergleich der Durchbruchskurven einer DEAE-, einer Q- und einer selbstgepackten Säule. Hierbei wird 1mg/mL OVA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM Phosphat-Puffers aufgetragen. Bei der DEAE-Säule ergibt sich eine dynamische Kapazität 17,6mg bei der Q-Säule 16,2mg und bei der selbstgepackten Säule 8,4mg.

Aus diesem Grunde wurde bei den folgenden Versuchen mit HEPES noch eine weitere selbstgepackte Säule hergestellt und auch mit in den Vergleich aufgenommen. Hier zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden selbstgepackten Säulen:

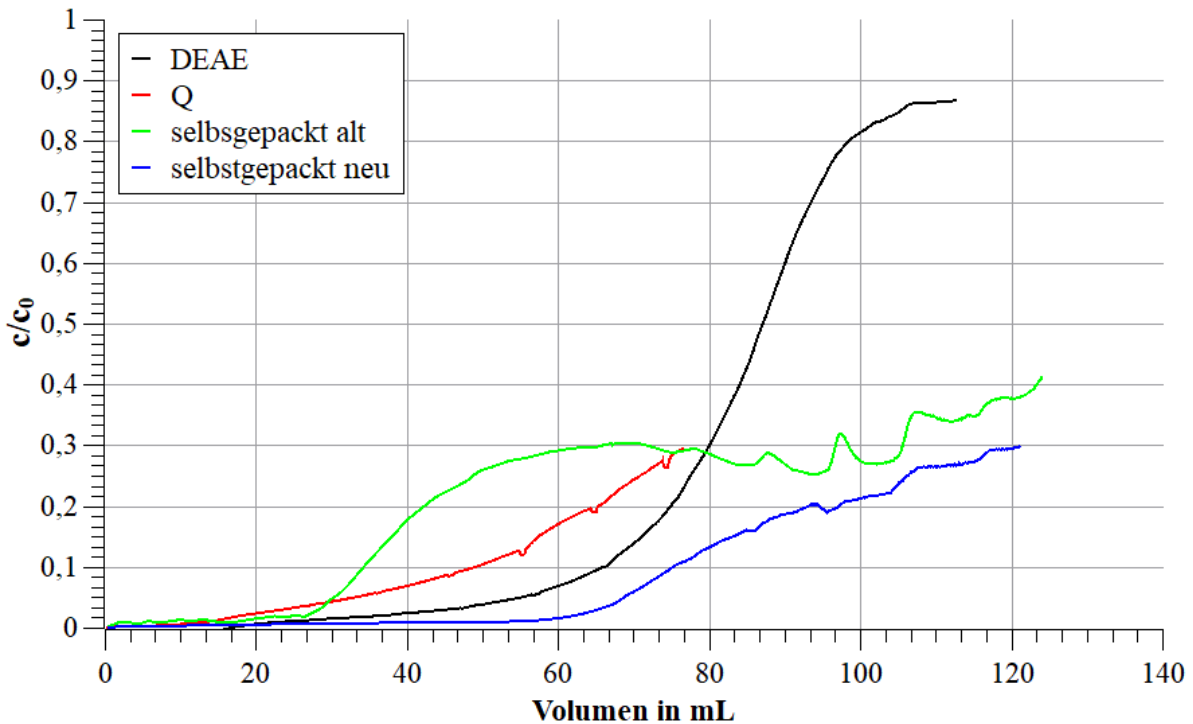


Abbildung 31: Vergleich der Durchbruchkurven einer DEAE-, einer Q- und einer selbstgepackten Säule. Hierbei wird 1mg/mL OVA mit einer Fließgeschwindigkeit von 1mL/min bei pH 7,5 unter Verwendung eines 20mM HEPES-Puffers aufgetragen. Bei der DEAE-Säule ergibt sich eine dynamische Kapazität 64,5mg bei der Q-Säule 45,2mg, bei der selbstgepackten alten Säule 33,5mg und bei der selbstgepackten neuen Säule 74,1mg.

Bei diesem Säulenvergleich ist zu erkennen, dass die neue selbstgepackte Säule eine deutlich höhere dynamische Kapazität besitzt als die bereits verwendete. Die Säule zeigt hier den schnellsten Anstieg mit der geringsten dynamischen Kapazität.

Aus den durchgeführten Säulenvergleichs-Versuchen lässt sich also ermitteln, dass die selbstgepackte Säule in fast allen Versuchen eine höhere dynamische Kapazität zeigt. Außerdem wurde gezeigt, dass die Durchbruchkurven, in denen das Fractogel eine geringere dynamische Kapazität zeigt, durch Verunreinigungen bedingt sind. Die Säule besitzt eine leicht geringere Partikelgröße als die DEAE- und die Q-Säule. Die Porengröße befindet sich ebenfalls in einem Bereich ähnlicher Größenordnung. Dennoch zeigt sich für die selbstgepackte Säule eine höhere dynamische Kapazität. Es ist also wahrscheinlich, dass die erhöhte dynamische Kapazität tatsächlich durch die verlängerten Spacer hervorgerufen wird. Die ist der wesentliche Unterschied zwischen den Säulenmaterialien. Allerdings scheint dieses Säulenmaterial auch anfälliger für Verschmutzungen zu sein. So nahm die dynamische Kapazität im Verlauf der

Versuche bei der selbstgepackten Säule stärker ab, als bei der DEAE und der Q-Säule, obwohl die Desorptions- und Reinigungsverfahren identisch waren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Material weniger stabil gegenüber einmolarer Natronlauge ist, welche zum Waschen verwendet wird. Der Hersteller gibt allerdings eine Stabilität zum Reinigen bis pH 14 an. Der Unterschied zwischen der DEAE-Säule und der Q-Säule zeigt sich insbesondere bei höheren aufgetragenen Volumina. Bei geringen Volumina haben diese beiden Säulen in vielen Versuchen einen ähnlichen Verlauf. Bei höherem aufgetragenem Volumen steigt die Ausgangskonzentration bei den meisten Versuchen bei der Q-Säule allerdings schneller als bei der DEAE-Säule. Der Hersteller gibt für die Q-Säule eine höhere statische Kapazität als für die DEAE-Säule an. Möglicherweise lässt sich die DEAE Säule dadurch, dass sie durch eine Base entladen werden kann, besser reinigen und erzielt so auch im Verlaufe mehrerer Versuche bessere Ergebnisse der Q-Säule gegenüber. So fällt auf, dass zu Beginn der Vergleichsversuche bei Phosphat bei pH 6,5 die Q-Säule noch eine höhere dynamische Kapazität besaß. Es kann hierfür allerdings auch Ursachen geben, die aus den Versuchen nicht hervorgehen.

5. DISKUSSION

Die Versuche haben deutlich gezeigt, dass das Puffersystem sich auf den Verlauf der Durchbruchkurven auswirkt. Hierbei konnten zwei Effekte gezeigt werden. Zum einen kann das Puffersystem einen Einsalzeffekt bewirken. Hierbei wurde gezeigt, dass Puffer über den Einsalzeffekt einer Dimerisierung entgegenwirken können. Hierbei wirken stärker geladene Puffer der Dimerisierung stärker entgegen. Hierdurch wird der Massentransport verbessert, was sich in steileren Durchbrüchen zeigt. Gleichzeitig wirken sich die Puffer auch auf die Adsorption aus. Sie könne hierbei das Protein oder die stationäre Phase, je nach Ladung, abschirmen und die Wechselwirkungen zwischen Protein und stationärer Phase abschwächen. Stärker geladene Puffer bewirken hier eine starke Abschwächung. Dieser Effekt reduziert die statische Kapazität und in der Folge auch die dynamische Kapazität. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Tendenz eines Proteins zur Dimerisierung ebenfalls großen Einfluss auf die dynamische Kapazität nehmen kann. So muss bei einem Protein, welches zu Dimerisierung neigt, ein Kompromiss gefunden werden, zwischen einem Puffer der einerseits die Dimerisierung genug abschwächt, damit der Massentransport nicht zu stark limitiert wird und andererseits die Adsorptionskinetik nicht zu sehr abschwächt, damit die statische Kapazität nicht zu stark abnimmt. Bei einem Protein, wie Ovotransferrin, welches weniger zur Dimerisierung neigt, ist es nicht nötig ein Kompromiss zu finden. Es kann ein weitgehend

ungeladener Puffer verwendet werden, der sich nicht negativ auf die Adsorptionskinetik auswirkt, da das Protein auch unter diesen Umständen nur in einem geringen Maße dimerisiert vorliegt. Weiterhin hat sich gezeigt, dass Proteine mit einer stärkeren Nettoladung, in diesem Fall BSA und OVA, bei stark geladenen Puffern eine höhere dynamische und statische Kapazität besitzen, da die stärkere Nettoladung für eine stärkere Adsorptionskinetik sorgt.

Bei den Säulenmaterialien hat sich gezeigt, dass mittels des EMD-Fractogels eine höhere dynamische Kapazität erreicht werden kann als mit der 6%igen quervernetzten Agarose. Dies ist, wie vom Hersteller beschrieben, auf die verlängerten Spacer zurückzuführen, da sich die Materialein in Partikelgröße und Porengröße sehr ähnlich sind. Bei der funktionellen Gruppe hat die DEAE-Gruppe bei den meisten Versuchen höhere dynamische Kapazitäten erreicht als die quarternäre Gruppe. Dies widerspricht den Herstellerangaben und könnte möglicherweise durch eine bessere Reinigbarkeit der DEAE-Säule bedingt sein. Dies ist aber nicht sicher.

Dass sich die Konduktivität auf den Massentransport auswirkt, war bereits vor dieser Arbeit bekannt. Dieser Effekt wurde aber dadurch begründet, dass eine erhöhte Konduktivität die gegenseitige Abstoßung der Proteine in den Poren unterbindet und dadurch den Massentransport verbessert. Diese Bachelorarbeit zeigt bei den hier verwendeten Proteinen, dass eine erhöhte Ionenstärke die Dimerisierung, also die Zusammenlagerung, unterbindet. Die Ergebnisse dieser Bachelorarbeit deuten vor allem darauf hin, dass sich der verbesserte Massentransport durch ein verringertes Dimer-Monomer-Verhältnis ergibt. So konnte diese Bachelorarbeit einige Mechanismen aufzeigen durch die das Puffersystem auf die Durchbruchkurven Einfluss nimmt. Die Bachelorarbeit zeigt also auf durch welche Faktoren sich ein präparativer Prozess durch das Puffersystem oder die Wahl der Säule verbessern lässt. Es wurde aber ebenfalls gezeigt, wie unterschiedlich verschiedene Proteine auf diese Faktoren reagieren. Für die Optimierung von Prozessen kann dies also nur als ein Hinweis dienen. Es müssen aber dann Simulationen oder eine Vielzahl von Versuchen durchgeführt werden, um die optimalen Bedingungen für einen präparativen Prozess zu finden.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane
BSA	Rinderserumalbumin
DEAE	Diethylaminoethyl
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
OVA	Ovalbumin
Ovotr.	Ovotransferrin
SEC	Größenausschlusschromatographie
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

7. LITERATURVERZEICHNIS

Literatur

1. Anspach, Birger. *Skript zu Vorlesung Protein Purification / Preparative Chromatography*. 2017.
2. *Protein Chromatography*. Wiley-VCH Seiten 161ff. Jungbauer, Giorgio Carta und Alois. 2010.
3. *Protein Chromatography*, Wiley-VCH Seite 36f. Jungbauer, Giorgio Carta und Alois. 2010.
4. *Comparison of protein A affinity sorbents*. *Journal of Chromatography, Volume 1093, Issue 1-2* Seiten 98-110. Rainer Hahn, Philipp Bauerhansl, Kazumichi Shimahara, Christopher Wizniewski,. 2005.
10. *Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry, Volume 15, Issue 8* Seiten 1237-1247. Bill X.Huang, Hee-YongKima, ChhabilDassb. 2004.
12. *Zetapotential Bestimmung mit Hilfe der Elektrophorese-Methode*.
13. Anspach, Birger. *Skript zur Vorlesung Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren*. 2018.
19. *Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation*. *Food Research International Volume 46, Issue 2* Seiten 480-487. Jianping Wu, Alexandra Acero-Lopez. 2012.
20. *Crystal Structure of Uncleaved Ovalbumin at 1-95 Å Resolution*. *Journal of molecular Biology Volume 221 Issue 3* Seiten 941-959. Penelope E. Stein-, Andrew G. W. Leslie, John T. Finch and Robin W. Carrell. 1991.
21. *Structure and properties of ovalbumin*. *Journal of Chromatography B, Volume 756, Issue 1-2, Seiten 189-198*. Penelope E.Stein, James A.Huntington. 2001.
22. *Single-Step Purification of Ovalbumin from Egg White Using Aqueous Biphasic System*. *Process Biochemistry, Volume 51, Issue 6, Seiten 781-791*. Matheus M. Pereira, Rafaela A. P. Cruz, Mafalda R. Almeida, Álvaro S. Lima, João A. P. Coutinho, and Mara G. Freire,. 2016.
23. *BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states*. *Journal of Biotechnology, Volume 79, Issue 3, Seiten 259-268*. Willem Norde, Carla E Giacomelli. 2000.
24. *Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation*. *Scientific Reports, Volume 5, Issue 1* Artikel 12210. Ine Rombouts, Bert Lagrain,* Katharina A. Scherf, Peter Koehler, and Jan A. Delcour. 2015.
25. *Influence of buffer salts on protein adsorption in ion exchange chromatography*. *Master-Projektarbeit, HAW HAMBURG*. Otte, Jana. 2017.
26. *Der Einfluss von Puffersalzen in der Frontalchromatographie an einem Anionenaustauscher*. *Bachelorarbeit, HAW Hamburg*. Babakhani, Niloufar Mashhori Ghale. 2017.
27. *Einfluss von Puffersalzen auf das Adsorptionsverhalten von Ovalbumin am Anionenaustauscher*. *Master-Projektarbeit, HAW HAMBURG*. Erdal, Salim. 2018.
28. *An Exclusion Mechanism in Ion*. *Biotechnology and Bioengineering, Volume 95, Issue 5, Seiten 775-787*. C. Harinarayan, J. Mueller, A. Ljunglo, R. Fahrner, J. Van Alstine, R. van Reis. 2006.

29. *Buffer effects on the zeta potential of ultrafiltration membranes. Journal of Membrane Science, Volume 172, Issue 1-2, Seiten 39-48.* L. Zydney, Douglas B. Burns Andrew. 2000.
30. *Salting-in characteristics of globular proteins. Biophysical Chemistry, Volume 156, Issue 1, Seiten 72-78.* Abraham M. Lenhoff, Ronald W. Maurer Stanley I. Sandler. 2011.
31. Sciences, GE Healthcare Life. HiTrap® DEAE Fast Flow. [Online] [Zitat vom: 14. 05 2019.] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ge17505501?lang=de®ion=DE>.

Internetquellen

5. Wikipedia, Diethylaminoethyl. [Online] [Zitat vom: 16. 05 2019.] <https://de.wikipedia.org/wiki/Diethylaminoethylcellulose#/media/File:Diethylaminoethylcellulose.png> Zugriff am 12.05.2019.
6. Wikipedia Quarternäre Ammoniumverbindungen. [Online] [Zitat vom: 12. 05 2019.] https://de.wikipedia.org/wiki/Quartäre_Ammoniumverbindungen.
7. Merck. Fractogel® EMD Chromatography Resin. [Online] 2016. [Zitat vom: 16. 05 2019.] http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Fractogel-EMD-DEAE-M,MDA_CHEM-116883.
8. GE Healthcare Lifesciences. Sepharose 6B. [Online] [Zitat vom: 28. 05 2019.] <https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/chromatography/resins/size-exclusion/sepharose-6b-p-06269#tech-spec-table>.
9. MERCK. Fractogel EMD BioSEC. [Online] [Zitat vom: 28. 05 2019.] http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Fractogel-EMD-BioSEC-S,MDA_CHEM-110317#documentation.
11. Sigma-Aldrich. ALBUMIN FROM BOVINE SERUM. [Online] [Zitat vom: 2019. 05 06.] https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a2058pis.pdf.
14. Sigma-Aldrich Co. BisTris Data Sheet. [Online] 2010. [Zitat vom: 28. 04 2019.] https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/bis-tris_specification_chart.pdf.
15. Co., Sigma-Aldrich. Imidazole Buffer Solution. [Online] [Zitat vom: 28. 04 2019.] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/68268?lang=de®ion=DE>.
16. Tanja Dingeldein, Axel Schunk, Alfred Maelicke. Pufferlösungen. [Online] [Zitat vom: 29. 04 2019.] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/chem_grundlagen/puffer.vlu/Page/vsc/de/ch/4/cm/saeuren/phosphatpuffer.vscml.html.
17. Wikipedia Natriumdihydrogenphosphat. [Online] [Zitat vom: 10. 05 2019.] <https://de.wikipedia.org/wiki/Natriumdihydrogenphosphat>.
18. Sigam-Aldrich Co. HEPES. [Online] [Zitat vom: 29. 04 2019.] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h3375?lang=de®ion=DE>.
31. Sciences, GE Healthcare Life. HiTrap® DEAE Fast Flow. [Online] [Zitat vom: 14. 05 2019.] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ge17505501?lang=de®ion=DE>.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Bachelorarbeit selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden und auch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Ort, Datum, Unterschrift