

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

**Einfluss verschiedener Puffer auf die Frontalchromatographie von
Lysozym am Kationenaustauscher in Gegenwart von HCP**

Bachelorarbeit

im Studiengang
B.Sc. Biotechnologie

vorgelegt von

Inga Berit Leske



Hamburg, 28. Februar 2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Birger Anspach

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä

Zusammenfassung

In der vorliegenden Bachelorarbeit wurde der Einfluss verschiedener Puffer auf die Frontalchromatographie von Lysozym am Kationenaustauscher in Gegenwart von *host cell proteins* (HCP) aus *E. coli* untersucht. Das Lysozym simuliert dabei das Zielprotein, welches aus einem Probengemisch mit den HCP aufgereinigt werden soll. In der biopharmazeutischen Industrie würde es bei dem Zielprotein beispielsweise um ein rekombinantes Protein handeln, das in *E. coli* synthetisiert wird und in das Cytoplasma des Bakteriums sekretiert würde. Beim *downstream processing* müsste dieses Protein dann unter anderem von den host spezifischen Proteinen getrennt werden. Dabei musste zuerst das Problem der Präzipitation bei der Zugabe von Lysozym zu den HCP in den Griff bekommen werden. Dazu wurde das Puffersalz, die Molarität und der pH-Wert des Probenpuffers variiert, jedoch kam es weiterhin zu Präzipitation. Deswegen wurde der Puffer, in welchem der Ultraschallaufschluss der *E. coli* Zellen durchgeführt wurde, angepasst. Bei den HCP, bei denen im Aufschlusspuffer Spermin als DNA-aggregierendes Mittel eingesetzt wurde, kam es bei der Zugabe von niedrigen Konzentrationen von Lysozym nicht zu Präzipitation. Deswegen wurde dieses Probengemisch im Anschluss an einem Kationenaustauscher mit der Frontalchromatographiemethode aufgereinigt. Die Aufreinigung kann dabei als erfolgreich beschrieben werden, da recht reines Lysozym eluiert werden konnte. Allerdings kam es zu Produktverlusten unter der Durchbruchskurve der Frontalchromatographie.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	2
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
2. Theoretische Grundlagen	8
2.1 Ionenaustauschchromatographie.....	8
2.2 Frontalchromatographie.....	9
2.2.1 Dynamische Bindungskapazität	10
2.3 Stationäre Phase	10
2.4 Puffer.....	10
2.5 Proteine	11
2.5.1 Löslichkeit von Proteinen	11
2.5.2 Lysozym.....	12
2.5.3 <i>host cell proteins</i>	13
3. Materialien und Methoden.....	14
3.1 Materialien	14
3.1.1 Geräte.....	14
3.1.2 Software.....	15
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	15
3.1.4 Chemikalien.....	15
3.1.5 Proteine	16
3.1.6 Stationäre Phase.....	16
3.1.7 Puffer und Lösungen	16
3.2 Puffervorbereitung	17
3.3 Probenvorbereitung	18
3.3.1 Lysozym.....	18
3.3.2 <i>host cell proteins</i>	19
3.4 Experimentelles Equipment	21

3.5 Experimentelle Methoden	22
3.5.1 Pufferoptimierung/Untersuchung der Präzipitation.....	22
3.5.2 Chromatographie.....	23
3.6 Analytische Methoden	24
3.6.1 Biuret-Assay	24
3.6.2 UV Spektroskopie.....	25
3.6.3 SDS-PAGE	26
4. Ergebnisse	28
4.1 Präzipitation.....	28
4.1.1 Veränderung des Puffersalzes.....	28
4.1.2 Veränderung der Molarität	29
4.1.3 Veränderung des pH-Wertes	32
4.1.4 Veränderung des Aufschlusspuffers.....	34
4.2 Einfluss der Pufferoptimierung auf die Frontalchromatographie.....	36
4.3 Aufreinigung des Lysozyms durch die Frontalchromatographie	39
5. Diskussion.....	41
5.1 Pufferoptimierung	41
5.2 Enzymatischer Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	41
5.3 Gezielte Präzipitation der DNA	43
5.4 Einfluss der Pufferoptimierung auf die Frontalchromatographie.....	44
5.5 Aufreinigung des Lysozyms durch die Frontalchromatographie	45
5.6 Schlussfolgerungen	45
Literaturverzeichnis	47
Abbildungsverzeichnis	50
Tabellenverzeichnis	52
Erklärung	54

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
AU	<i>absorption units</i>
Bis-Tris	bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane
BSA	Bovines Serumalbumin
CV	<i>column volume</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HCl	Salzsäure
HCP	<i>host cell proteins</i>
Da	Dalton
KCl	Kaliumchlorid
Lys	Lysozym
M	Molarität in mol/l
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
V	Volumen
VE	vollentsalzt

1. Einleitung

Seit dem Aufkommen der Insulintherapie in den 1920er Jahren spielen Peptide und Proteine eine bemerkenswerte Rolle in der medizinischen Praxis und damit in der Pharmaindustrie. Peptide sind im Gegensatz zu anderen kleinen Molekülen sehr spezifisch in ihrer Aktivität und rufen außerdem im Vergleich nur sehr wenige Nebenwirkungen hervor, was sie zu idealen Kandidaten für die Arzneimittelentwicklung macht (Preet, 2018). Zu den möglichen Krankheitsbildern, die mit dieser Art von Therapeutika behandelt werden können, zählen Stoffwechsel-, Herz-Kreislauf-, Autoimmun- und Krebserkrankungen. Im Jahr 2011 waren bereits etwa 160 Proteinarzneimittel auf dem Weltmarkt verfügbar, die einen Umsatz von über 30 Billionen USD generierten. Hunderte mehr wurden in klinischen Studien getestet und weitere befanden sich in der vorklinischen Entwicklung. Die neuen rekombinanten Technologien ermöglichen dabei die Entwicklung vieler potentieller Kandidaten zu akzeptablen Kosten (Ratnaparkhi, Chaudhari, & Pandya, 2011).

Deswegen werden heutzutage biopharmazeutische Produkte wie Proteine und Peptide nahezu ausschließlich mittels rekombinanter DNA Technologie erzeugt. Diese biotechnologisch erzeugten Pharmazeutika erfordern für gewöhnlich eine außergewöhnlich hohe Reinheit, wodurch der sogenannte *downstream process* zur kritischsten, da zeit- und kostenintensivsten, Komponente des gesamten Herstellungsprozesses wird (Freitag, 2014). Die Chromatographie ist dabei eine der am meisten genutzten Techniken zur Aufreinigung von Biopharmazeutika in der biotechnologischen Industrie (Dismer, Petzold, & Hubbuch, 2008). Das liegt unter anderem daran, dass damit komplexe Mixturen, wie sie bei der industriellen Produktion der Proteine anfallen, recht einfach mit leicht erhältlichen fertigen stationären Phasen aufgereinigt werden können (Carta & Jungbauer, 2010).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das aufzureinigende Zielprotein durch das Protein Lysozym simuliert. Obwohl es sich beim Zielprotein somit nicht um ein rekombinantes Produkt, welches in einem Wirtsorganismus produziert wird, handelt, sollten die industriellen Prozesse möglichst wirklichkeitsnah nachgebildet werden. Einer der am häufigsten verwendeten Bakterienstämme in der industriellen Produktion von biopharmazeutischen Proteinen ist *E. coli* BL21. Die Proteinexpression in *E. coli* erfolgt entweder in das Periplasma zwischen Zellmembran und Zellwand, in das

Cytoplasma als lösliches Protein oder aggregiert in sogenannten *inclusion bodies* (Carta & Jungbauer, 2010). In allen drei Fällen müssen die Proteine des Bakteriums (*host cell proteins*) vom Zielprotein abgetrennt werden. Deswegen wurden für diese Arbeit *host cell proteins* aus *E. coli* BL21 durch Zellaufschluss gewonnen und mit dem Zielprotein zu einem Proteingemisch vereinigt, welches dann wiederum mittels Frontal-Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden sollte.

Bei vorherigen Arbeiten, in denen unter anderem der Einfluss von *host cell proteins* auf die Frontalchromatographie von Lysozym an Kationenaustauschern untersucht wurde, kam es allerdings unerwarteterweise zur Präzipitation des Lysozyms in Gegenwart der HCP (Brenner, 2019; Otte, 2018). Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit, die Möglichkeit diese Präzipitation durch Optimierung des Probenpuffers zu verhindern, untersucht werden. Der Puffer wurde dafür sowohl im Hinblick auf das Puffersalz an sich als auch auf die Molarität und den pH-Wert verändert. Außerdem sollte der Einfluss dieser veränderten Bedingungen auf die Frontalchromatographie des Lysozyms in Gegenwart der *host cell proteine* untersucht werden.

2. Theoretische Grundlagen

Chromatographie wird definiert als ein Prozess, bei dem eine sogenannte stationäre Phase eingesetzt wird, um eine Mischung aus Bestandteilen, die mittels eines Fluids (der mobilen Phase) durch das Festbett der stationären Phase transportiert wird, aufzutrennen (Carta & Jungbauer, 2010). Diese Methode, die einzelnen Bestandteile einer Probe in einer Säule aufzutrennen, wurde bereits Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts von Mikhail Tswett erfunden und benannt. Tswett nutzte die Technik ursprünglich, um farbige Pflanzenpigmente voneinander zu trennen (Sakodynskii, 1972). Seine Entdeckung wurde allerdings erst etwa 30 Jahre später von deutschen Wissenschaftlern als Flüssigchromatographie (*liquid chromatography*, LC) wiederentdeckt. Im Jahr 1943 ordnete der Schwede Arne Tiselius Chromatographie in die drei Modi Frontal, Elution und Verdrängung ein. In den darauffolgenden Jahren wurden weitere Methoden entwickelt, wie zum Beispiel die Ionenaustauschchromatographie (*ion exchange chromatography*, IEC), die Gaschromatographie (*gas chromatography*, GC), Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) (Lundanes, Reubsæet, & Greibrokk, 2014).

2.1 Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie werden Verbindungen mit geladenen funktionellen Gruppen (beispielsweise Aminosäuren, Peptide und Proteine) adsorbiert. Die Adsorption basiert dabei auf Ladungsinteraktionen zwischen den geladenen Analyten und dazu gegenteilig geladenen Gruppen auf der Oberfläche der stationären Phase (vgl. Abb. 1). Bei der Bindung der Moleküle an die Matrix handelt es sich um eine elektrostatische und reversible Bindung.

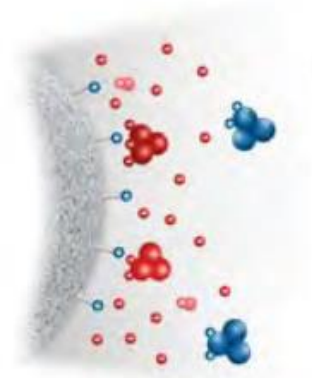


Abbildung 1: Trennungsprinzip der IEC. Hier dargestellt ein Anionenaustauscher mit positiv (blau) geladenen funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der stationären Phase, der negativ (rot) geladene Proteine aus der mobilen Phase adsorbiert, während positiv geladene Proteine nicht zurückgehalten werden (GE Healthcare, 2016).

Wenn negativ geladene Verbindungen gebunden werden sollen, verwendet man einen Anionenaustauscher und bei positiv geladenen Analyten Kationenaustauscher. Sowohl bei Anionen- als auch bei Kationenaustauschern unterscheidet man zwischen schwachen und starken Ionenaustauschern. Als schwache Austauscher bezeichnet man dabei jene, die über funktionelle Gruppen auf der stationären Phase verfügen, deren Ladung durch den pH-Wert der mobilen Phase beeinflusst werden kann. Die Ladung der stationären Phase ist somit nur in einem definierten pH-Wertbereich stabil. Bei einem starken Ionenaustauscher wiederum behalten die funktionellen Gruppen ihre Ladung über den gesamten pH-Bereich (Lundanes et al., 2014).

In Bezug auf das *downstream processing*, also die Aufreinigung von biopharmazeutischen Produkten wie Proteinen, gelten Ionenaustauscher als robust und für die gröbere Trennungen von größeren Proteinmengen als gut geeignet. Die erfolgreiche IEC-Trennung wird dabei von vielen Faktoren beeinflusst. Dazu zählen neben dem Typ des Ionenaustauschers seine Bindungskapazität und die Beschaffenheit seiner Matrix. Zu den weiteren wichtigen Größen zählen der pH-Wert sowie die Art der Pufferionen und ihre Ionenstärke in der mobilen Phase (Gey, 2015).

2.2 Frontalchromatographie

Bei der Frontalchromatographie wird ein Probengemisch, gelöst in einer geeigneten mobilen Phase, kontinuierlich auf die Säule aufgetragen. Dabei herrschen Bedingungen, bei denen die Komponenten des Probengemisches stark adsorbiert werden. Die Bindungsplätze auf der stationären Phase der Säule werden dabei meist im Laufe des Probenauftrags vollständig gesättigt, so dass Probe durchbricht. Die dabei entstehende sogenannte Durchbruchskurve weist häufig eine sigmoidale Form auf, wie sie in Abbildung 2 aufgezeigt ist.

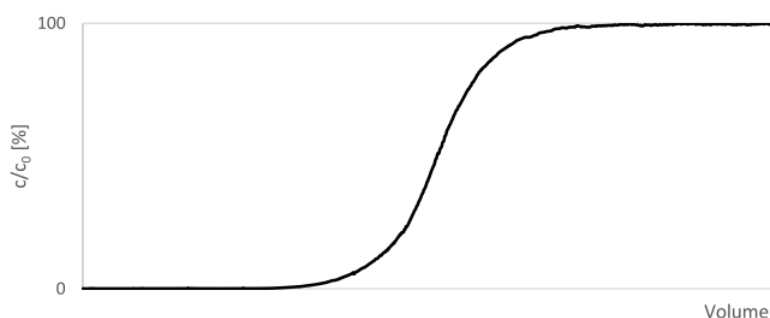


Abbildung 2: Beispiel einer Frontalchromatographie mit einer typischen sigmoidalen Durchbruchskurve. Aufgetragen ist das Volumen des Probenauftrags gegen das normierte Verhältnis c/c_0 in % (Otte, 2018).

Häufig wird diese Methode auch verwendet, um Unreinheiten aus dem Herstellungsprozess vom gewünschten Zielprodukt, beispielsweise ein rekombinantes Protein, abzutrennen. Dabei können entweder die Unreinheiten stark von der stationären Phase adsorbiert werden, während das Zielprodukt nicht zurückgehalten wird oder andersherum. Im Falle des stark adsorbierten Zielprodukts brechen die Unreinheiten sofort durch, während das Zielprodukt idealerweise erst durch die Elution von der Säule gewaschen wird (Carta & Jungbauer, 2010).

2.2.1 Dynamische Bindungskapazität

Die dynamische Bindungskapazität wird für die Frontalchromatographie definiert als die Proteinmenge, die an die Säule gebunden wird, bevor die Konzentration des Eluats eine festgelegte Konzentration der aufgegebenen Proteinkonzentration erreicht. Ein typischer Wert entspricht 10% von c_0 und die DBC wird meist zur Normalisierung durch das Säulenvolumen geteilt (Carta & Jungbauer, 2010).

Die DBC kann mittels folgender Formel berechnet werden:

$$DBC = \frac{c_0 \cdot V_{Durchbruch}}{V_{Säule}} \quad (2.1)$$

mit DBC als dynamischer Bindungskapazität (mg/ml), c_0 als Konzentration der Proteine in Lösung (mg/ml), $V_{Durchbruch}$ als Volumen zum Zeitpunkt des Durchbruchs (ml) und $V_{Säule}$ als Säulenvolumen (ml).

2.3 Stationäre Phase

Die CM Sepharose Fast Flow ist ein Kationenaustauscher, der auf Sepharose CL-6B, einer 6%-igen hochvernetzten Agarosematrix, basiert. Auf der Matrix befinden sich die Carboxymethyl (CM)-Liganden, die charakteristischen funktionellen Gruppen, die den Ionenaustauscher zu einem schwachen Kationenaustauscher machen. Die Säule hat ein Volumen von 1 ml und ist in einem pH-Arbeitsbereich von 4 bis 13 stabil. Die angegebene dynamische Bindungskapazität von Ribonuclease A beträgt 50 mg/ml Medium bei $c/c_0 = 0,5$ (GE Healthcare, 2018).

2.4 Puffer

Pufferlösungen sind Lösungen, die einen definierten pH-Wert haben und diesen über eine längere Zeit weitestgehend konstant halten können, sogar nach der Zugabe von begrenzten Mengen an Säuren oder Basen. Puffer bestehen aus einer schwachen

Säure (HA) und ihrer konjugierten Base (A⁻). Dabei gilt, wenn beide im Verhältnis 1:1 vorliegen, $\text{pH} = \text{pK}_s$ (Mortimer & Müller, 2010). Für die durchgeführten Experimente wurden vier verschiedene Puffer ausgewählt, welche sich alle in Bezug auf ihre Ladung, ihre molare Masse und ihre pK_s -Wert(e) unterscheiden.

2.4.1 Natriumdihydrogenphosphat

Natriumdihydrogenphosphat verfügt über drei verschiedene pK_s -Werte, wobei der mittlere bei $\text{pK}_{s,2} = 7,20$ liegt. Der pH-Bereich, in dem der Puffer rund um diesen pK_s -Wert eingesetzt werden kann, ist mit pH 5,8 - 8,0 recht groß. Die molare Masse des Dihydrates beträgt 156,01 g/mol (ITW Reagents, 2020).

2.4.2 Natriumacetat

Natriumacetat ist das Natriumsalz der Essigsäure. Das Trihydrat hat eine molare Masse von 136,08 g/mol, einen pK_s -Wert von 4,76 und ein relatives niedriges pH-Optimum zwischen 3,7 - 5,6 (ITW Reagents, 2020).

2.4.3 Bis-Tris

Bis-Tris hat eine molare Masse von 209,24 g/mol und der IUPAC Name lautet Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane. Es hat einen pK_s -Wert von 6,4 und damit einen optimalen Pufferbereich zwischen pH 5,8 - 7,2 (ITW Reagents, 2020).

2.4.5 Imidazol

Imidazol wird häufig als Puffersubstanz für enzymatische Reaktionen oder zur DNA-Denaturierung eingesetzt. Sein pK_s -Wert liegt bei 6,95 und der optimale pH-Einsatzbereich zwischen 6,2 - 7,8 (ITW Reagents, 2020).

2.5 Proteine

2.5.1 Löslichkeit von Proteinen

Im Allgemeinen ist die Löslichkeit von Proteinen am niedrigsten an deren isoelektrischen Punkt (pI), an dem die Oberflächenladung des Proteins null beträgt, da sich alle negativen und positiv geladenen Seitenketten aufwiegen. Außerdem spielt die Molarität der umgebenden Lösung eine Rolle für die Löslichkeit eines Proteins (Carta & Jungbauer, 2010). Die Löslichkeit von Proteinen steigt in der Regel bei sehr niedrigen Ionenstärken mit zunehmender Salzkonzentration an. Dieser Effekt, der als

„Einsalzeffekt“ bekannt ist, lässt sich dadurch erklären, dass mit erhöhter Salzkonzentration die Ladungen in den Proteinen zunehmend abgeschirmt werden, was zu einem Anstieg der Löslichkeit führt (Gey, 2015).

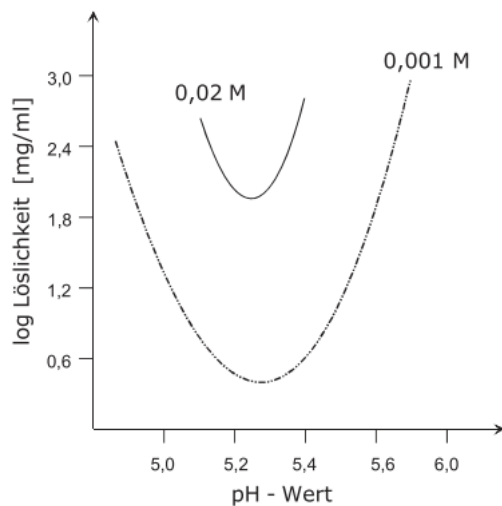


Abbildung 3: Löslichkeit von Lactoglobulin in Abhängigkeit von NaCl-Konzentration und pH-Wert. Die Löslichkeit steigt im niedrigmolaren Bereich mit der Erhöhung der Molarität an. Außerdem erhöht sich die Löslichkeit je weiter der pH-Wert des Puffers vom pI-Wert des Proteins entfernt ist. (Gey, 2015)

2.5.2 Lysozym

Lysozym aus Hühnereiweiß hat ein Molekulargewicht von etwa 14,3 kDa und besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 129 assoziierten Aminosäureresten, die an vier Stellen mit Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Struktur ist in Abbildung 4 dargestellt (Phillips, 1967).

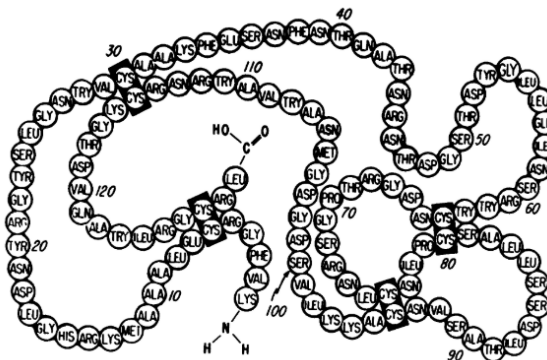


Abbildung 4: Aminosäuresequenz von Lysozym aus Hühnereiweiß. An die Polypeptidkette sind 129 Aminosäurereste assoziiert. Zwischen den Cysteinresten bestehen insgesamt vier Disulfidbrücken (Phillips, 1967).

Lysozym wird häufig für den Aufschluss von Bakterien, insbesondere von Gram-negativen Bakterien wie *E. coli*, verwendet, da es die β -1,4-glykosidische Verbindung in der Zellwand hydrolysieren kann (Gey, 2015). Das verwendete Lysozym hat einen pI-Wert von 11,35 und ist aktiv im pH-Bereich von 6,0 bis 9,0. Dabei ist es bei niedrigeren pH-Werten über einen größeren Bereich von Ionenstärke aktiv (Sigma-

Aldrich, 2020). Durch seinen pI-Wert im hohen alkalischen Bereich ist Lysozym bei pH-Werten im neutralen und sauren Bereich positiv geladen. Von den assoziierten Aminosäureresten tragen einige eine positive (Lysin und Arginin) und andere eine negative Ladung, welche insgesamt für eine positive Oberflächenladung bei pH 7,0 sorgen (Dismer & Hubbuch, 2007).

2.5.3 *host cell proteins*

Jeder Wirtsorganismus besitzt spezifische *host cell* Proteine (HCP). Die Funktionen dieser Proteine variieren dabei vom Zellwachstum über Transportfunktionen bis hin zur Regulation diverser Prozesse. Bei der biotechnologischen Produktion von biopharmazeutischen Proteinen in Wirtsorganismen, wie beispielsweise *E. coli*, handelt es sich bei den HCP um unerwünschte Kontaminanten, die durch Aufreinigungsschritte wie die Chromatographie abgetrennt werden müssen. Durch die hohe Variabilität der wirtseigenen Proteine verfügen sie nicht über einen einheitlichen pI-Wert. Allerdings ist bekannt, dass die Mehrheit aller Proteine ihren isoelektrischen Punkt eher im sauren pH-Bereich haben. Dies scheint auch für viele Mikroorganismen, wie *E. coli*, zu gelten (Carta & Jungbauer, 2010).

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Chromatographieanlage	ÄKTApurifier	GE Healthcare
Feinwaage	BP 221S	Sartorius
	Entris	
Kippschüttler	Rocking Platform	VWR
Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph
	Big Squid S000 white	IKA
Multiscan	Multiscan Ascent	Thermo Fischer
Pumpe	P-500	Pharmacia
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Rosettengefäß	150 ml	Sonopuls
SDS-PAGE Zubehör	PowerPac Basic	BioRad
	Mini PROTEAN® Tetra System	
	Mini PROTEAN® Tetra Cell	
	Mini PROTEAN® Spacer Plates	
	0,75 mm	
	Mini PROTEAN® Short Plates	
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson
UV/VIS Spektrophotometer	Libra S22	Biochrom
Vakuumpumpe	LABOPORT	KNF
Vortex	Reax top	Heidolph
Wärmeschrank	-	Binder
Zentrifuge	5430 R (Rotor F-35-6-30)	Eppendorf
	Minispin	
	Sorvall Lynx 6000	Thermo Scientific
	(Rotor T29-8x50)	

3.1.2 Software

Tabelle 2: Verwendete Software

Software	Hersteller
Ascent	Thermo Fischer
Resolution Life Science	biochrom
UNICORN™ 5.31	GE Healthcare

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Abdeckfolie Easyseal transparent (79 x 135 mm)	Greiner Bio-One
Dialysemembran Spectra/Por® membrane MWCO 6-8	Spectrum®
Sterilfilter Celluloseacetat (0,45 µm)	Sartorius
Microtiterplatte 96 well PS F-bottom clear	Greiner Bio-One
UV-Küvette halbmikro (1,5 ml)	Brand

3.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Bis-Tris	Carl Roth
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Labochem international
Ethanol	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Merck
Imidazol	Carl Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Natriumacetat Trihydrat	Carl Roth

Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O)	Carl Roth
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth
Roti®-Blue 5x-Konzentrat	Carl Roth
Roti®-Mark STANDARD	Carl Roth
Roti®-Quant Universal	Carl Roth
SDS	Carl Roth
Spermin	Carl Roth
TEMED	BioRad
TRIS	Carl Roth

3.1.5 Proteine

Tabelle 5: Verwendete Proteine

Proteine	Herkunft
BSA	Sigma-Aldrich
HCP	E. coli BL21
Lysozym	Sigma-Aldrich

3.1.6 Stationäre Phase

Tabelle 6: Verwendete stationäre Phase

Bezeichnung	Hersteller
HiTrap™ CM FF 1ml	GE Healthcare

3.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen

Verwendung	Name	Zusammensetzung
Zellaufschluss	PBS pH 7,4	137 mM NaCl
		2,7 mM KCl
		10 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O
		2 mM KH ₂ PO ₄

SDS-PAGE	2x Probenpuffer nicht-reduzierend	125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 20% (v/v) Glycerin (98%) 4% (w/v) SDS 0,02% (w/v) Bromphenolblau
	2x Probenpuffer reduzierend	90% (v/v) 2 x Probenpuffer 10% (v/v) 1 M DTT
	Laufpuffer (1x)	25 mM Tris 192 mM Glycin 3,5 mM SDS
Coomassiefärbung	Färbelösung	20% (v/v) 5x Konzentrat Roti [®] -Blue 20% (v/v) Ethanol (vergällt) 60% (v/v) VE-H ₂ O
	Entfärbelösung	25% (v/v) Ethanol (vergällt) 75% (v/v) VE-H ₂ O

3.2 Puffervorbereitung

Für die Chromatographie werden verschiedene Puffer benötigt, zum einen der Equilibrierungspuffer, oder auch Adsorptionpuffer, und zum anderen der Elutionspuffer. Der Adsorptionpuffer wird dabei zum Equilibrieren der stationären Phase und zum Probenauftrag eingesetzt, während der Elutionspuffer zur Elution der an die stationäre Phase gebundenen Proteine dient. Beide Puffer verfügen über die gleiche Konzentration an Puffersalzen. Zusätzlich wurde dem Elutionspuffer 1 M NaCl hinzugefügt. Außerdem wurden für die Pufferoptimierung bzw. Untersuchung der Präzipitation in Salz, Molarität und pH-Wert verschiedene Puffer als Probenpuffer für die HCP nach der Umpufferung und für die Zugabe des Lysozyms verwendet. Zur Herstellung wurden die jeweils eingewogenen Salze in VE-Wasser gelöst und die pH-Werte sämtlicher Puffer wurden mit Natronlauge oder Salzsäure (bzw. Essigsäure beim Acetatpuffer) eingestellt. Vor der Verwendung in der Chromatographieanlage wurden die Puffer mittels einer Vakuumpumpe und einem Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und entgast.

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer in den Versuchsteilen

Verwendung	Puffer	Zusammensetzung
Pufferoptimierung	Phosphat (pH 7,0)	50 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O
		100 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O
		150 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O
		200 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O
		500 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O
	Phosphat, EDTA (pH 7,0)	50 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O
		6 mM EDTA
		100 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O
		6 mM EDTA
		100 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O
Bis-Tris (pH 6,0)	100 mM Bis-Tris	
	150 mM Bis-Tris	
	200 mM Bis-Tris	
Acetat (pH 5,0)	100 mM Natriumacetat Trihydrid	
	150 mM Natriumacetat Trihydrid	
	200 mM Natriumacetat Trihydrid	
Chromatographie	Imidazol (pH 7,0)	200 mM Imidazol
	Equilibrierungspuffer (pH 7,0)	100 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O
Chromatographie	Elutionspuffer (pH 7,0)	100 mM NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O
		1 M NaCl

3.3 Probenvorbereitung

3.3.1 Lysozym

Es wurden jeweils Lysozymstammlösungen mit einem Volumen von 2 ml und einer Proteinkonzentration von 4 mg/ml hergestellt, indem die benötigte Menge Protein eingewogen und dann in VE-Wasser gelöst wurde. Die Lagerung dieser Lösungen erfolgte bei 4 °C. Diese Lösungen wurden für die Versuchsteile, die sich mit der Präzipitation befassen, verwendet. Für die Frontalchromatographie wurde zunächst eine Lösung mit einer Konzentration von 3 mg/ml angesetzt, indem das eingewogene

Protein in 10 ml des Adsorptionspuffers gelöst wurde. Im späteren Gesamtvolumen von 100 ml Probenlösung betrug die Konzentration dann 0,3 mg/ml.

3.3.2 *host cell proteins*

Die HCPs wurden aus *E.coli* BL21 Zellen gewonnen, welche speziell für die HCP-Gewinnung im Labor für Bioprozessautomatisierung, HAW Hamburg gelagert wurden.

3.3.2.1 Aufschluss

Die *E. coli* BL21 Zellen wurden mittels Ultraschalles aufgeschlossen. Dafür wurde eine münzförmige Sonotrode im Ultraschallgerät Sonifier 250 des Herstellers Branson verwendet. Die Zellen wurden für acht Minuten mit konstanter Amplitude und einem Tastverhältnis von 100% beschallt. Für die Behandlung wurden die pelletierten Zellen in 15% w/v PBS bzw. PBS mit Zusatz von Spermin, Lysozym oder EDTA (s. Tabelle 8) resuspendiert und in ein 150 ml Rosettengefäß überführt. Die Suspension im Rosettengefäß wurde vor der Behandlung auf etwa 15 °C runtergekühlt und auch während der Beschallung in einem Plastikbecherglas gefüllt mit Eis platziert.

Tabelle 9: Angabe der Zusätze und der jeweiligen Konzentrationen im PBS-Puffer

Zusatz	Konzentration
Lysozym	6 mg/ml
EDTA	3 mM
Spermin	7,5 g/l

3.3.2.2 Zentrifugation

Die Zellsuspension wurde nach dem Aufschluss in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 7.197 rcf für 30 Minuten (4 °C) zentrifugiert. Beim Abnehmen des Überstandes fiel auf, dass das Pellet nicht fest war. Deswegen wurde nicht der gesamte Überstand abgenommen, sondern nur der möglichst klare wurde in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Zellsuspension in den Reaktionsgefäßen wurde dann jeweils nochmal bei 13.500 rpm für 5 Minuten (RT) zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden teilweise bei - 20 °C, teilweise bei 4 °C aufbewahrt.

Alternativ erfolgte die Zentrifugation bei 50.000 rcf für 15 min bei 4 °C in speziellen Zentrifugenröhrchen. Auch nach dieser Zentrifugation wurde der Überstand entnommen und zur Aufbewahrung in Falcon-Röhrchen überführt. Die Lagerung der Überstände erfolgte bei 4 °C. Bei dieser Zentrifugation bildete sich jeweils ein festes Pellet, so dass keine weitere Zentrifugation des Überstandes notwendig war.

3.3.2.3 Dialyse

Die Dialyse ist ein Verfahren zur Umpufferung von beispielsweise Proteinlösungen. Dabei werden semipermeable Membranen verwendet, welche von anorganischen Salzen sowie anderen niedermolekularen Verbindungen passiert werden können. Von Proteinen, je nach Ausschlussgröße (*cut-off volume*), jedoch nicht (Hemschemeier & Maelicke, 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren zum Wechsel des Aufschlusspuffers zum jeweilig verwendeten Puffer für die Pufferoptimierung und die Chromatographie verwendet. Dafür wurde eine Dialysemembran aus Zellulose mit einem MWCO von 6 - 8 kDa verwendet.

Der Dialyseschlauch wurde vor Verwendung für etwa 30 min in destilliertem Wasser eingeweicht. Dann wurde die Probe eingefüllt und der Schlauch an beiden Enden zugeknotet und in einigen Fällen zusätzlich mit speziellen Klammern gesichert. Der gefüllte Schlauch wurde in ein Becherglas, das mit dem mindestens 100-fachen Volumen an Puffer im Verhältnis zum Probenvolumen gefüllt war, gegeben. Die Dialyse erfolgte auf einem Magnetrührer bei 4 °C und wurde über Nacht fortgeführt. Dabei wurde der Dialysepuffer drei Mal gewechselt (nach jeweils etwa 2 - 3 Stunden). Nach dem letzten Wechsel am nächsten Tag wurde noch zwei weitere Stunden gewartet, bevor die Probe aus dem Schlauch entnommen wurde. Ein Teil der Proben wurde dann oft abgenommen und bei - 20 °C bzw. 4 °C gelagert, während der Rest für die Untersuchung der Präzipitation bei Zugabe von Lysozym verwendet wurde. Bei der Probenlösung für die Frontalchromatographie wurde der größte Teil des Volumens direkt in die gewünschte Konzentration von 0,7 mg/ml auf 100 ml mit Adsorptionspuffer hochverdünnt.

3.4 Experimentelles Equipment

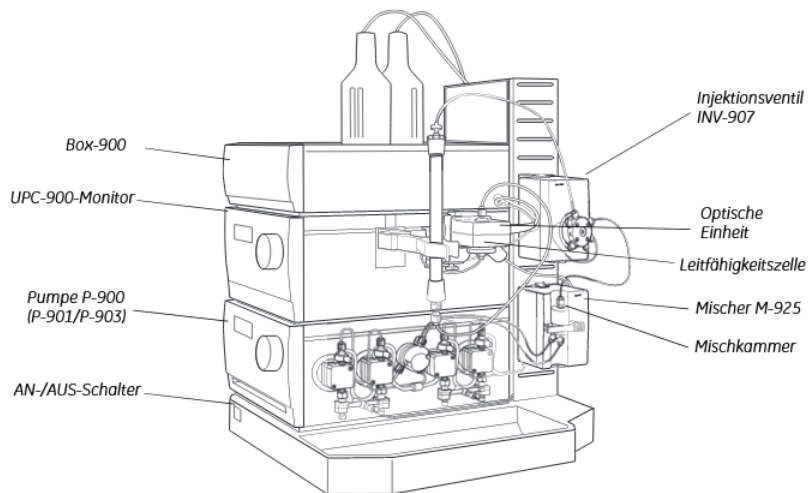


Abbildung 5: Schematischer Geräteaufbau der ÄKTApurifier von GE Healthcare (GE Healthcare, 2006).

In Abbildung 5 ist der schematische Geräteaufbau der verwendeten Chromatographieanlage ÄKTApurifier von GE Healthcare dargestellt. Die Anlage verfügt über eine integrierte Pumpe (P-900) und einen kombinierten Hochleistungs-Online-Monitor für die Messung der UV-Absorption, der Leitfähigkeit und des pH-Wertes (UPC-900). Die ÄKTApurifier ist zusätzlich mit der externen Pumpe P-500 von Pharmacia verbunden. Das System ist an einen Computer angeschlossen, von dem man es über das Programm UNICORN™ steuern kann. Die externe Pumpe kann mittels des Programms nur auf 0 (*stop*) und 1 (*run*) gesetzt werden. Deswegen wurde an der Pumpe selbst ein Volumenstrom von 60 ml/h eingestellt. Die P-500 dient zum Probenauftrag großer Volumina, wie sie während der Frontalchromatographie benötigt werden. Die Probenlösung gelangt dabei von der Pumpe über das Injektionsventil INV 907 der ÄKTApurifier auf die Säule. Das Injektionsventil INV 907 verfügt über drei mögliche Positionen, welche über die Software angesteuert werden. Diese Positionen sind in Abbildung 6 gezeigt.

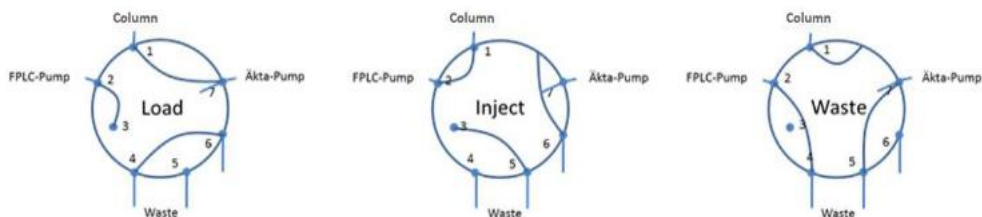


Abbildung 6: Mögliche Positionen des Injektionsventils INV 907 bei Anschluss einer externen Pumpe an die ÄKTApurifier. Durch die Auswahl der Stellungen *Load*, *Inject* und *Waste* wird der korrekte Fluss durch die Anlage bzw. über sie Säule reguliert (GE Healthcare, 2006).

In der *Load*-Position wird der Volumenstrom durch die ÄKTA-Pumpe reguliert. Dies ist beispielsweise der Fall während der Equilibrierung oder der Elution der gebundenen Proteine von der Säule. Mit dem Wechsel auf *Inject* kann durch die externe Pumpe ein Probenauftrag auf die Säule erfolgen. In der dritten Position (*Waste*) werden alle Flüssigkeiten direkt in einen Abfallbehälter gepumpt, ohne über die Säule zu fließen.

3.5 Experimentelle Methoden

3.5.1 Pufferoptimierung/Untersuchung der Präzipitation

Um das Präzipitationsverhalten der HCP in Gegenwart von Lysozym zu untersuchen, wurden verschiedene Schritte zur Optimierung des Probenpuffers angewandt. Die verwendeten Salze und gewählten Molaritäten und pH-Werte der Puffer können Tabelle 8 entnommen werden. Um eine mögliche Präzipitation der Proteine in diesen Puffern beobachten zu können, wurden die HCP und das Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen und Anteilen an der Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Lösung zusammengegeben (s. Tab 10). Die HCP waren dabei jeweils in einem der Probenpuffer gelöst, während das Lysozym in VE-Wasser gelöst wurde. Der Ansatz erfolgte mit einem Gesamtvolumen von 500 ml, etwaige Verdünnungen der Stammproteinlösungen wurden mit VE-Wasser vorgenommen. Die Lagerung der Mischproteinlösungen erfolgte alternativ bei -20 °C, bei 4 °C oder bei Raumtemperatur.

Tabelle 10: Proteinkonzentration und Anteil an der Gesamtproteinkonzentration der Lösung von Lysozym und HCP zur Untersuchung der Präzipitation der Proteine. Die Gesamtproteinkonzentration betrug jeweils 1 mg/ml bzw. 1,15 mg/ml.

Lysozym		HCP	
Konzentration [mg/ml]	Anteil an Gesamtproteinkonzentration [%]	Konzentration [mg/ml]	Anteil an Gesamtproteinkonzentration [%]
1	85	0,15	15
0,7	70	0,3	30
0,5	50	0,5	50
0,3	30	0,7	70

3.5.2 Chromatographie

Für die Analyse des Proteinverhaltens während der Chromatographie wurden die hier aufgeführten Methoden verwendet (s. Tab. 11). Sie wurden mittels des Programms UNICORN™ modifiziert und anschließend an die ÄKTA-Anlage übermittelt. Beide Methoden wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min ausgeführt. Der Leergradient diente dabei nur der Reinigung der Säule, um Beeinflussungen durch vorherige Läufe zu vermeiden. Vor dem Ablauf der Methoden wurden die internen Pumpen der ÄKTApurifier mit Adsorptions- bzw. Desorptionspuffer gespült. Ebenso wurde die externe Pumpe P-500, die für den kontinuierlichen Probenauftrag verwendet wurde, mit Equilibrierungspuffer gespült und anschließend mit Probenlösung bis zum Injektionsventil gefüllt. Die Methoden wurden danach in dieser Reihenfolge durchgeführt: Leergradient - Leergradient - Frontalchromatographie - Leergradient.

Tabelle 11: Ablauf und Beschreibung der verwendeten Methoden bei der Chromatographie

Methode	Schritt	Länge	Beschreibung
Leergradient	Gradient	20 CV	Linear ansteigender Salzgradient bis 100% Elutionspuffer erreicht sind
	Verlängerung	3 CV	Zusätzlicher Waschschrift mit 100% Elutionspuffer
	Spülen	5 CV	Spülen der Säule mit Equilibrierungspuffer
Frontalchromatographie	Equilibrierung	10 CV	Equilibrieren der Säule mit Equilibrierungspuffer
	Probenauftrag	90 CV	Kontinuierlicher Probenauftrag auf die Säule
	Waschschrift	5 CV	Waschschrift mit Equilibrierungspuffer zur Entfernung ungebundener und schwach gebundener Proteine

Gradient	20 CV	Linear ansteigender Salzgradient bis 100% Elutionspuffer erreicht sind
Verlängerung	5 CV	Zusätzlicher Waschschrift mit 100% Elutionspuffer

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 Biuret-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der HCP wurde der Roti®-Quant universal Assay eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen colorimetrischen Nachweis zur Detektion und Quantifizierung von löslichen Proteinen, der ähnlich dem BCA-Protein-Assay funktioniert. Dieses Assay basiert auf der sogenannten Biuret-Reaktion in Kombination mit einer hochspezifischen Enhancer-Reaktion. Durch die Biuret-Reaktion werden die zweiwertigen Cu^{++} Ionen des Reagenz 2 im alkalischen Reaktionsmedium des Tests zu einwertigen Cu^+ reduziert. Die Intensität dieser Reaktion verhält sich proportional zu der Anzahl der beteiligten Peptidbindungen. Die schwache Farbe der Biuretkomplexe wird durch die Chelatierung der Cu^+ Ionen mit PCA verstärkt. Der entstehende Farbkomplex hat eine grünlich-blaue Färbung. Die Farbentwicklung dieser kupferspezifischen Enhancer-Reaktion ist ebenfalls direkt proportional zu der Konzentration des anwesenden Proteins in der Lösung. Es entstehen purpurfarbene Kupferkomplexe, welche eine starke Lichtabsorption mit einem Maximum bei 503 nm entwickeln, durch das breite Maximum kann aber eine hochsensitive und verlustfreie Messung auch bei 492 nm erfolgen. Es handelt sich bei der Messung um keine Endpunkt-Messung, die Farbe entwickelt sich bei Raumtemperatur aber nur langsam weiter (Carl Roth, 2018).

Für die BSA-Standardreihe wurde eine Stammlösung mit $c = 2 \text{ mg/ml}$ angesetzt. Aus dieser wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt.

Tabelle 12: Verdünnungsreihe des BSA-Standards

	Konzentration BSA [$\mu\text{g/ml}$]	Vol. VE-H ₂ O [μl]	Vol. und Herkunft BSA [μl]
A	2000	0	400 aus Stammlösung
B	1500	125	375 aus Stammlösung
C	1000	325	325 aus Stammlösung
D	750	325	325 aus Lösung B
E	500	325	325 aus Lösung C
F	250	325	325 aus Lösung E
G	125	325	325 aus Lösung F
H	50	450	300 aus Lösung G
I	25	400	100 aus Lösung G
K	5	400	100 aus Lösung I
blank	0	400	0

Von jeder Probe wurde eine Verdünnungsreihe mit fünf bis sieben Verdünnungen angesetzt, um sicherzugehen im Bereich der Kalibrierkurve zu liegen. Die Verdünnungen wurden wie die Standardreihe mit VE-Wasser hergestellt. Sämtliche Standards und Verdünnungen wurden als Triplets gemessen. Die Messung erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten und es wurden jeweils 50 μl Standard bzw. Probe und 100 μl Arbeitslösung verwendet. Die Arbeitslösung wurde laut Anleitung aus 15 Teilen Reagenz 1 und einem Teil Reagenz 2 angesetzt. Nach der Inkubation für 15 min bei 60 °C erfolgte das Schütteln für 1 min bei 420 rpm und die Messung der optischen Dichte bei 492 nm.

3.6.2 UV Spektroskopie

Während der Frontalchromatographie wird durch die UV-Messzelle der ÄKTApurifier die Absorption der Proteinlösung durchgängig gemessen. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 280 nm und die optische Weglänge der Zelle beträgt 5 mm. Zusätzlich wurde mittels eines UV/VIS-Spektrometers die Proteinkonzentration einzelner Fraktionen, die während der Frontalchromatographie gesammelt wurden, gemessen. Dazu wurde zuerst eine Kalibriergerade mit einer Standardproteinlösung

mit den gleichen Konzentrationen (0,7 mg/ml HCP; 0,3 mg/ml Lysozym) wie die der aufgetragene Probenlösung aufgenommen (s. Abb. 7). Im Anschluss wurde die Extinktion ($A_{280 \text{ nm}}$) der ausgewählten Fraktionen gemessen und ihre Konzentration mittels der Kalibriergeraden berechnet. Die Messung sämtlicher Standards und Proben erfolgte in 1,5 ml UV-Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm.

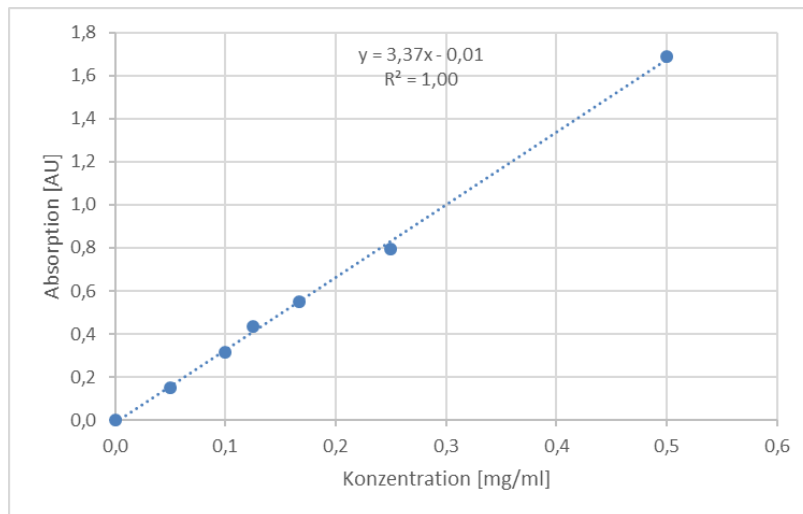


Abbildung 7: Kalibriergerade der Proteinstandardlösung mit 0,7 mg/ml HCP und 0,3 mg/ml Lysozym. Von einer Stammlösung wurden sechs Verdünnungen angesetzt und jeweils in 1,5 ml UV-Küvetten die Absorption bei 280 nm gemessen. Als blank wurde 100 mM Phosphatpuffer verwendet.

3.6.3 SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dazu werden die Proteinproben mit SDS versetzt, was zur Ausbildung von negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis führt. Diese Komplexe wandern dann im elektrischen Feld zum Pluspol und dabei sorgt der Molekularsiebeffekt der porösen Polyacrylamidmatrix für eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht (Rehm & Letzel, 2016). Am häufigsten wird das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet, so auch in dieser Arbeit. Die SDS-PAGE wurde jeweils mit einem 12%-igen Trenngel und einem 5%-igen Sammelgel durchgeführt. Die Zusammensetzung der einzelnen Gele kann Tabelle 13 entnommen werden. Zur Probenvorbereitung wurden sämtliche Proben mit 10 µl 2x Probenpuffer, teilweise mit Zusatz des Reduktionsmittels DTT, versetzt und mit VE-Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Je nach zuvor bestimmter Proteinkonzentration der Proben wurden maximal 10 µl Proteinlösung verwendet, um eine Proteinmenge pro erwarteter Bande zwischen

0,3 und 2 µg zu erreichen. Im Anschluss erfolgte das Erhitzen auf 95 °C für fünf Minuten und das Auftragen von je 10 µl Probe pro Tasche. Freibleibende Taschen wurden mit 10 µl Probenpuffer gefüllt. Als molekularer Größenmarker wurde der Roti®-Mark STANDARD verwendet, von dem je 5 µl aufgetragen wurden. Der Lauf der Gele erfolgte in 1x Laufpuffer bei 200 V für etwa 50 min.

Tabelle 13: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE

Komponente	Konzentration	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
Acryl/Bisacrylamid	30%	8 ml	3,4 ml
Tris-HCl-Puffer pH 8,8	3 M	2,5 ml	-
Tris-HCl-Puffer pH 6,8	1 M	-	2,5 ml
SDS	10%	0,2 ml	0,2 ml
VE-Wasser	100%	6,8 ml	11,4 ml
TEMED	100%	10 µl	20 µl
APS	10%	130 µl	130 µl

Im Anschluss wurden sämtliche Gele mit der Coomassie-Färbung gefärbt, um die aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen. Die untere Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei etwa 0,2 bis 0,4 µg Protein pro Bande (Rehm & Letzel, 2016). Dabei erfolgte die Färbung jeweils über Nacht bei RT auf einem Kippschüttler mit der Coomassie-Färbelösung. Die Entfärbung erfolgte dann am nächsten Tag für zweimal 30 min in der Entfärbelösung. Die Zusammensetzung der Färb- und Entfärbelösung kann Tabelle 7 entnommen werden.

4. Ergebnisse

4.1 Präzipitation

Um die in vorherigen Arbeiten aufgetretene Präzipitation der Proteine bei der Zugabe von Lysozym zu den HCP verhindern zu können, wurde der Probenpuffer im Hinblick auf das Puffersalz, die Molarität und den pH-Wert verändert.

4.1.1 Veränderung des Puffersalzes

Da in den vorherigen Arbeiten ausschließlich Phosphatpuffer zur Untersuchung der Präzipitation von Lysozym in Gegenwart von HCP verwendet wurden, wurde untersucht ob ein Wechsel des Puffersalzes zu einer Veränderung in Hinblick auf die Präzipitation führt. Deswegen wurden neben Natriumphosphat Natriumacetat, Bis-Tris und Imidazol als Puffersalze verwendet. Da der Acetat- und der Bis-Tris-Puffer aber über einen anderen Pufferbereich verfügen, unterscheiden sich diese Puffer zusätzlich noch im pH-Wert vom Phosphatpuffer und diese Auswirkungen werden gesondert in Punkt 4.1.3 betrachtet.

Bei der Zugabe des Lysozyms zu den HCP im 200 mM Imidazolpuffer (pH-Wert 7,0) konnte bei allen Lysozym- bzw. HCP-Konzentrationen Präzipitation beobachtet werden (s. Tab 14). Bei der der Probe mit 0,3 mg/ml Lysozym und 0,7 mg/ml HCP war eine geringere, aber immer noch deutliche Präzipitation erkennbar.

Tabelle 14: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in 200 mM Imidazolpuffer (pH 7,0). Die Gesamtproteinkonzentration der Lösungen beträgt 1 mg/ml bzw. 1,15 mg/ml. Die Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Molarität	Lys 1 mg/ml	Lys 0,7 mg/ml	Lys 0,5 mg/ml	Lys 0,3 mg/ml
200 mM	++	++	++	+

++ : deutliche Präzipitation, + : kaum/geringere Präzipitation, - : keine Präzipitation

Die Präzipitation in den Proteinlösungen, die sich lediglich im Puffersalz und nicht in der Molarität oder im pH-Wert von den hier betrachteten unterscheiden, also die in 200 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,0) ist in Tabelle 15 angegeben. Auch dort war bei allen Konzentrationen Präzipitation erkennbar, wiederum eine etwas geringere bei der niedrigsten Lysozymkonzentration.

Über die Zusammensetzung des Präzipitats und des Überstandes in den jeweiligen Proben gibt die SDS-PAGE Aufschluss. In Abbildung 8 ist deutlich zu erkennen, dass

in den Präzipitaten eine deutliche Bande auf der Höhe von Lysozym zu finden ist. Außerdem sind deutlich weitere Banden zu erkennen, welche denen der reinen HCP-Probe, die als Kontrolle aufgetragen ist, entsprechen. Auch in den Läufen der Überstände sind Banden zu erkennen, welche denen der HCP entsprechen, diese sind allerdings deutlich schwächer. Auch auf der Höhe des Lysozyms sind ganz schwache Banden erkennbar. Diese sollten nicht mit den Banden verwechselt werden, die minimal unter der Höhe des Lysozyms (14 kDa) zu sehen sind, denn diese sind auch in der reinen HCP-Probe vorhanden. Es handelt sich dabei also vermutlich um eines der Host-Cell-Proteine, was etwas kleiner als 14 kDa zu sein scheint und auch nur bei der Behandlung der Proteinproben mit reduzierenden Probenpuffer auftritt (vgl. Abb. 9). Außerdem ist zu beachten, dass in dem betrachteten SDS-PAGE Gel Präzipitat und Überstand der Proteinlösung in 500 mM und nicht 200 mM Phosphatpuffer aufgetragen wurde. Das Präzipitat der 200 mM Phosphatproben ist allerdings in Abbildung 9 dargestellt und ähnelt dem der 500 mM Proben sehr.

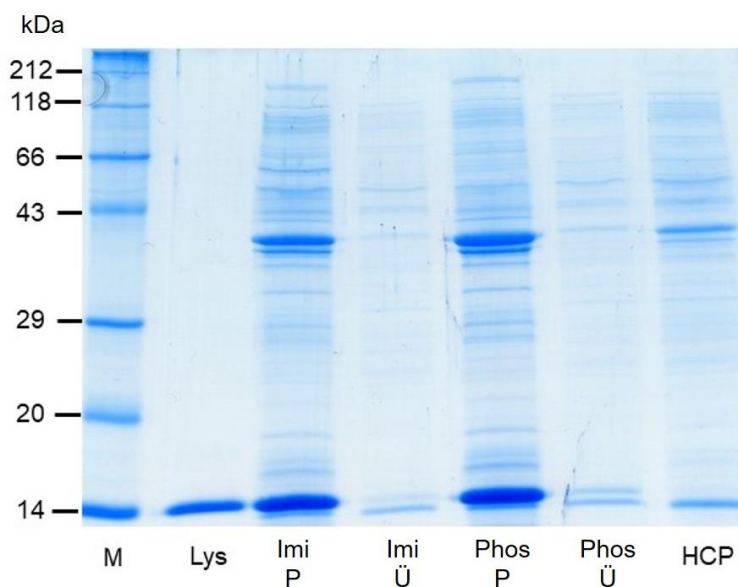


Abbildung 8: Coomassie gefärbte SDS-PAGE des Präzipitats und des Überstandes nach Zugabe von Lysozym zu den HCP in Imidazol- bzw. Phosphatpuffer. Der 200 mM Imidazolpuffer und der 500 mM Phosphatpuffer haben jeweils einen pH-Wert von 7,0. Die Proteinkonzentration der Proben setzt sich stets aus 0,3 mg/ml Lysozym und 0,7 mg/ml HCP zusammen. Sowohl vom Präzipitat (P) als auch vom Überstand (Ü) wurden jeweils 2 µl pro Tasche aufgegeben. Die Proben wurden mit je 10 µl reduzierenden 2x Probenpuffer versetzt. M - Roti®-Mark STANDARD

4.1.2 Veränderung der Molarität

Ausgehend von den höchsten Molaritäten, die in den bisherigen Arbeiten verwendet wurden, wurde die Molarität der jeweiligen Puffer schrittweise weiter erhöht. Am Beispiel des Phosphatpuffers ist zu erkennen, dass auch eine Erhöhung bis auf eine Konzentration von 500 mM keine bemerkenswerten Auswirkungen auf das Präzipitationsverhalten des Lysozyms in Gegenwart der HCP hat (s. Tab. 15). Einzig auffällig ist, dass erneut bei der niedrigsten Lysozymkonzentration eine geringere Präzipitation erkennbar ist. Es muss beachtet werden, dass die Dialyse in den 500 mM Phosphatpuffer nicht vollständig bzw. genau so lange wie bei den anderen Umpufferungen durchgeführt werden konnte, da es zur Ausbildung von kristallinen Strukturen während der Durchführung kam. Eine Probe dieses kristallinen Präzipitats wurde über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und löste sich dabei wieder. Vermutlich handelte es sich bei diesen Strukturen um Salzkristalle des Natriumphosphates, die sich bei einer längeren Lagerung bei 4 °C, wie es während der Dialyse der Fall ist, ausbilden.

Zu den Proteinen in 50 mM und 100 mM Phosphatpuffer wurde nach der Präzipitation EDTA in 6 mM Konzentration (durch 1:2 Verdünnung 3 mM in den Lösungen) hinzugegeben. Die Präzipitation löste sich kurzzeitig, bildete sich dann allerdings erneut.

Tabelle 15: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in Phosphatpuffer (pH 7,0) in verschiedenen Molaritäten. Die Gesamtproteinkonzentration der Lösungen beträgt 1 mg/ml bzw. 1,15 mg/ml. Die Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Molarität	Lys 1 mg/ml	Lys 0,7 mg/ml	Lys 0,5 mg/ml	Lys 0,3 mg/ml
50 mM	++	++	++	+
100 mM	++	++	++	+
150 mM	++	++	++	+
200 mM	++	++	++	+
500 mM	++	++	++	+

++ : deutliche Präzipitation, + : kaum/geringere Präzipitation, - : keine Präzipitation

Einige der Präzipitate der Proteinlösungen aus Tabelle 15 wurden zur genaueren Untersuchung der Proteinzusammensetzung auf eine SDS-PAGE aufgetragen (s. Abb. 9). Aufgetragen wurden die Lösungen mit 0,3 mg/ml und 0,5 mg/ml Lysozym in den Molaritäten 100 mM, 150 mM und 200 mM. In allen Spuren ist deutlich eine

Bande auf Höhe des Proteins Lysozym zu erkennen. Die restlichen zu erkennenden Banden bei den Präzipitaten stimmen mit denen der reinen HCP-Probe überein, auch wenn diese im Verhältnis etwas schwach gefärbt ist. In Abbildung 10 ist das ebenfalls Coomassie gefärbte SDS-PAGE Gel der Präzipitate der gleichen Proteinlösungen nur in Acetatpuffer dargestellt. Die Präzipitationsneigung dieser Proben kann Tabelle 17 entnommen werden. Auf dem Gel können die gleichen Banden detektiert werden wie auf dem Gel mit den Phosphatpufferproben, die Zusammensetzung der präzipitierten Proteine scheint sich also stark zu ähneln.

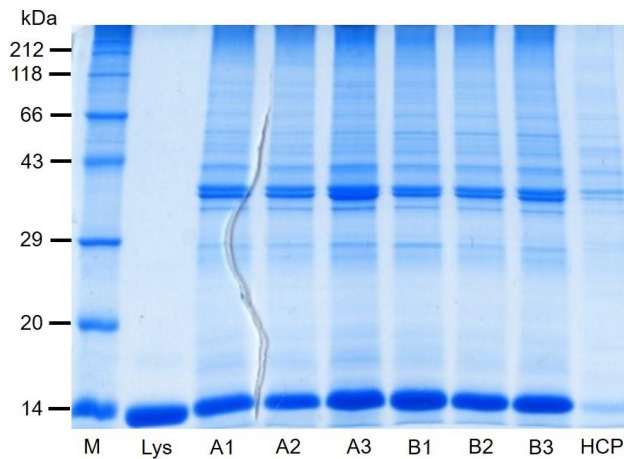


Abbildung 10: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Präzipitate nach der Zugabe von Lysozym zu den HCP in Phosphatpuffer. Die Molarität des Phosphatpuffers ist dabei jeweils ansteigend von Ziffer 1-3: 1 - 100 mM, 2 - 150 mM, 3 - 200 mM. Die Proben beschriftet mit A setzten sich aus 0,3 mg/ml Lysozym und 0,7 mg/ml HCP zusammen, die Proben beschriftet mit B aus 0,5 mg/ml Lysozym und 0,5 mg/ml HCP. Es wurde jeweils 2 µl des Präzipitats pro Tasche aufgetragen. Die Proben wurden mit je 10 µl nicht-reduzierenden 2x Probenpuffer versetzt. M - Roti®-Mark STANDARD

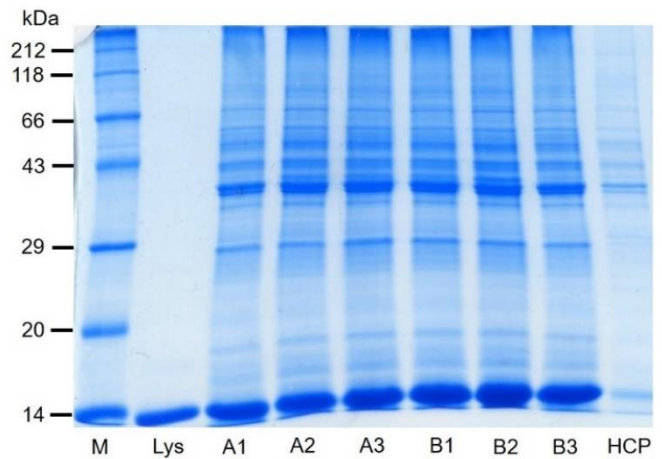


Abbildung 9: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Präzipitate nach der Zugabe von Lysozym zu den HCP in Acetatpuffer. Die Molarität des Acetatpuffers ist dabei jeweils ansteigend von Ziffer 1-3: 1 - 100 mM, 2 - 150 mM, 3 - 200 mM. Die Proben beschriftet mit A setzten sich aus 0,3 mg/ml Lysozym und 0,7 mg/ml HCP zusammen, die Proben beschriftet mit B aus 0,5 mg/ml Lysozym und 0,5 mg/ml HCP. Es wurde jeweils 2 µl des Präzipitats pro Tasche aufgetragen. Die Proben wurden mit je 10 µl nicht-reduzierenden 2x Probenpuffer versetzt. M - Roti®-Mark STANDARD

4.1.3 Veränderung des pH-Wertes

Die Puffersalze Natriumphosphat, Natriumacetat und Bis-Tris haben jeweils einen anderen optimalen Pufferbereich. Deswegen wurde jeder der Puffer auf einen anderen pH-Wert eingestellt und der Einfluss dieses pH-Wertes auf die Präzipitationsneigung von HCP und Lysozym untersucht. In Tabelle 16 und 17 ist jeweils zu erkennen, dass es sowohl bei einem pH-Wert von 5 als auch bei einem pH-Wert von 6 zu deutlicher Präzipitation kommt, auch über sämtliche der Molaritäten (100 mM, 150 mM und 200 mM) hinweg. Beim Acetatpuffer fiel bereits während der Dialyse eine starke Trübung der Probe, welche zu dem Zeitpunkt nur HCP enthielt, auf und nach der Entnahme der Probe aus dem Dialyseschlauch und Lagerung bei 4 °C auch schon eine leichte Präzipitation. Somit überrascht die Verstärkung der Präzipitation nach der Zugabe des Lysozyms nicht. Die Präzipitation in den Proteinlösungen mit dem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7 wird in Tabelle 15 aufgezeigt und auch bereits unter Punkt 4.1.2 besprochen.

Tabelle 16: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in Acetatpuffer (pH 5,0) in verschiedenen Molaritäten. Die Gesamtproteinkonzentration der Lösungen beträgt 1 mg/ml bzw. 1,15 mg/ml. Die Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Molarität	Lys 1 mg/ml	Lys 0,7 mg/ml	Lys 0,5 mg/ml	Lys 0,3 mg/ml
100 mM	++	++	++	++
150 mM	++	++	++	++
200 mM	++	++	++	++

++ : deutliche Präzipitation, + : kaum/geringere Präzipitation, - : keine Präzipitation

Tabelle 17: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in Bis-Tris Puffer (pH 6,0) in verschiedenen Molaritäten. Die Gesamtproteinkonzentration der Lösungen beträgt 1 mg/ml bzw. 1,15 mg/ml. Die Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Molarität	Lys 1 mg/ml	Lys 0,7 mg/ml	Lys 0,5 mg/ml	Lys 0,3 mg/ml
100 mM	++	++	++	++
150 mM	++	++	++	++
200 mM	++	++	++	++

++ : deutliche Präzipitation, + : kaum/geringere Präzipitation, - : keine Präzipitation

Auch die Präzipitate und die Überstände aus den Proben mit verschiedenen pH-Werten wurden zur genaueren Klärung der Proteinzusammensetzung auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Auf dem Coomassie gefärbten Gel (s. Abb. 11) sind in allen Präzipitaten deutliche Banden auf Höhe des Lysozyms und die typischen Banden der

HCP zu erkennen. Die HCP Banden treten beim Acetat- und beim Bis-Tris Puffer etwas stärker hervor als beim Phosphatpuffer. In den Spuren mit den Überständen sind beim Phosphat- und beim Bis-Tris Puffer schwache Banden zu sehen, welche denen der reinen HCP Spur entsprechen. Beim Phosphatpuffer scheint eventuell auch eine schwache Bande auf Höhe des Lysozyms zu sein, doch dies ist schwierig zu beurteilen, da sich minimal darunter die schon in Punkt 4.1.1 erwähnte Bande der HCP befindet. Diese lässt sich auch beim Bis-Tris-Puffer erkennen. Im Überstand der Probe im Acetatpuffer sind quasi gar keine Banden zu erkennen, bis auf eine vermutlich sehr schwache Bande auf Höhe des Lysozyms oder knapp darunter. Das lässt sich aufgrund der minimalen Färbung der Bande nicht zweifelsfrei sagen. Aufgrund der bereits beschriebenen Präzipitation der HCP im Acetatpuffer auch ohne Lysozym und die starke Präzipitation nach der Zugabe von Lysozym ist es plausibel, dass im Überstand so gut wie keine Proteine nachgewiesen werden können. Insbesondere da von Präzipitat und Überstand jeweils das gleiche Volumen eingesetzt und mit reduzierenden Probenpuffer behandelt wurde.

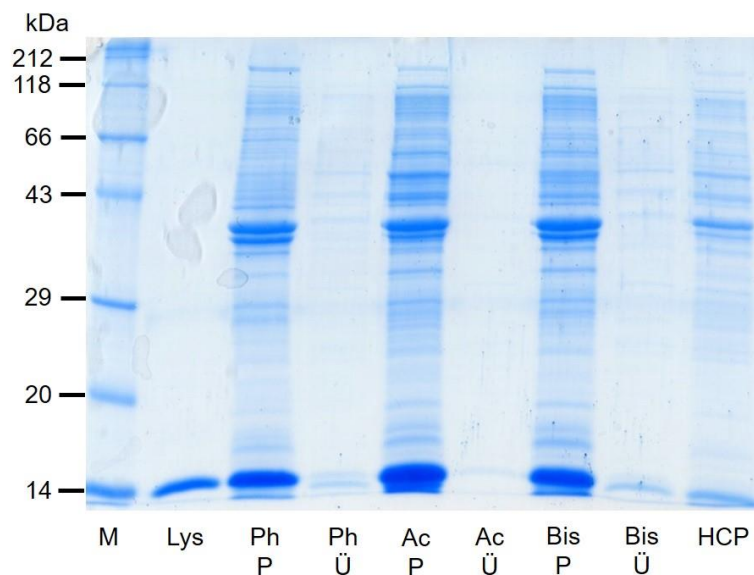


Abbildung 11: Coomassie gefärbte SDS-PAGE des Präzipitats und des Überstandes nach Zugabe von Lysozym zu den HCP in Phosphat-, Acetat- bzw. Bis-Tris-Puffer. Die Molarität der drei Puffer beträgt jeweils 200 mM und die Proteinkonzentration setzt sich stets aus 0,3 mg/ml Lysozym und 0,7 mg/ml HCP zusammen. Die pH-Werte der Puffer unterscheiden sich: Phosphat pH 7,0; Acetat pH 5,0; Bis-Tris pH 6,0. Sowohl vom Präzipitat (P) als auch vom Überstand (Ü) wurden jeweils 2 µl pro Tasche aufgegeben. Die Proben wurden mit je 10 µl reduzierenden 2x Probenpuffer versetzt. M - Roti®-Mark STANDARD

4.1.4 Veränderung des Aufschlusspuffers

Zusätzlich zu der durchgeführten Pufferoptimierung des Probenpuffers wurde auch der Puffer, in welchem der Ultraschall-Aufschluss der *E. coli* Zellen stattfand, angepasst. In Tabelle 18 sind die Beobachtungen zum Präzipitationsverhalten dargestellt. Bei der Zugabe des eigentlichen Zielproteins Lysozym bereits vor Beginn des Aufschlusses konnte nach dem Aufschließen der Zellen, auch durch die Wirkung des Enzyms Lysozym selbst, und der Dialyse in 100 mM Phosphatpuffer eine deutliche Präzipitation erkannt werden. Ähnlich verhielt es sich bei dem Puffer, dem 3 mM EDTA zur Komplexierung möglicher Calciumionen in der Lösung zugesetzt wurde. Bei diesem wurden die HCP in einen 100 mM Phosphatpuffer mit 3 mM EDTA dialysiert, doch nach der Zugabe von Lysozym konnte bei allen Konzentrationen Präzipitation beobachtet werden. Bei 0,3 mg/ml Lysozym allerdings etwas geringere im Vergleich. Nach dem Aufschluss und insbesondere während der Dialyse wurde in den Proteinlösungen, die durch den Aufschluss mit Zusatz von 7,5 g/l Spermin entstanden sind, die Bildung von weißen, leicht schmierigen Aggregaten beobachtet. Auf diese wird in Punkt 5.3 noch näher eingegangen. Bei der Zugabe von Lysozym zu diesen HCP Lösungen kam es bei einer Lysozymkonzentration von 0,3 mg/ml zu keiner Präzipitation. Bei den restlichen Konzentrationen präzipitierten die Proteine allerdings.

Tabelle 18: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) bzw. 100 mM Phosphatpuffer, 3 mM EDTA (pH 7,0). Die HCP wurden mit Ultraschall in unterschiedlichen Aufschlusspuffern aus den *E. coli* Zellen gewonnen. Bei dem Aufschlusspuffer mit Lysozym wurde Lysozym in einer passenden Konzentration eingesetzt, so dass der Anteil an der erwarteten Gesamtproteinkonzentration 30% betrug. Die Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Aufschlusspuffer	Lys 1 mg/ml	Lys 0,7 mg/ml	Lys 0,5 mg/ml	Lys 0,3 mg/ml bzw. 30% Anteil
PBS, 6 mg/ml Lysozym	n.a.	n.a.	n.a.	++
PBS, 7,5 g/l Spermin	++	++	++	-
PBS, 3 mM EDTA	++	++	++	+

++ : deutliche Präzipitation, + : kaum/geringere Präzipitation, - : keine Präzipitation

Die HCP, die mittels Aufschlusses mit Zusatz von Spermin aus den *E. coli* Zellen gewonnen wurden, wurden noch in anderen Konzentrationen mit Lysozym zusammengegeben (s. Tab. 19).

Tabelle 19: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0). Die HCP wurden durch Ultraschallaufschluss in einem Aufschlusspuffer mit Zusatz von 7,5 g/l aus den *E. coli* Zellen gewonnen. Die Zugabe von Lysozym erfolgte im jeweils gleichen Verhältnis des Anteils von Lysozym und HCP an der Gesamtproteinkonzentration (30% Lysozym, 70% HCP). Die Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Aufschlusspuffer	Lys 0,3 mg/ml HCP 0,7 mg/ml	Lys 0,45 mg/ml HCP 1,05 mg/ml	Lys 1,5 mg/ml HCP 3,5 mg/ml
PBS, 7,5 g/l Spermin	-	+	++

++ : deutliche Präzipitation, + : kaum/geringere Präzipitation, - : keine Präzipitation

Das Präzipitat und der Überstand der HCP-Lösung, die mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen wurde, wurde zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung auf eine SDS-PAGE aufgetragen (s. Abb. 12) Ebenfalls aufgetragen wurde das Pellet der Zentrifugation der HCP-Lösung, die mit Zusatz von Spermin aufgeschlossen wurde. In der Spur des Präzipitats ist eine deutliche Bande auf Höhe von Lysozym zu erkennen sowie Banden, die denen der reinen HCP-Probe entsprechen. Auch im Überstand sind sowohl Lysozym als auch HCP Banden zu sehen, allerdings deutlich schwächer. In der Spur des Pellets vom Aufschluss mit Spermin sind sehr deutlich Banden zu erkennen, die mit denen der reinen HCP-Probe überein stimmen. Die Bande etwa auf der Höhe von 14 kDa ist vermutlich von einem Protein der HCP, das knapp unter 14 kDa läuft und auf das schon unter Punkt 4.1.1 eingegangen wurde.

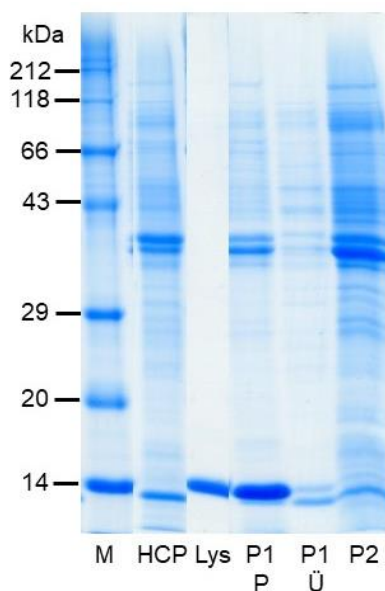


Abbildung 12: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Proben vom Aufschluss der *E. coli* Zellen mit Zusatz von Lysozym bzw. Spermin. P1: HCP aus Aufschluss mit PBS, 6 mg/ml Lysozym und Ultraschall in 100 mM Phosphatpuffer dialysiert. P wurde aus dem Präzipitat der Probe entnommen, Ü aus dem Überstand. P2: HCP aus dem Aufschluss mit PBS, 7,5 g/l Spermin und Ultraschall in 100 mM Phosphatpuffer dialysiert. Probe stammt aus dem Pellet, welches bei der Zentrifugation der Probe bei 13.400 rpm für 5 min entstanden ist und in 50 µl VE-H₂O resuspendiert wurde. Die Proben wurden mit je 10 µl reduzierenden 2x Probenpuffer versetzt. M - Roti®-Mark STANDARD

4.2 Einfluss der Pufferoptimierung auf die Frontalchromatographie

In Abbildung 13 ist die normalisierte Durchbruchskurve der Frontalchromatographie von 0,3 mg/ml Lysozym und 0,7 mg/ml HCP in 100 mM Phosphatpuffer dargestellt. Auffällig ist hierbei, dass diese Kurve keine sigmoidale Form besitzt. Die vermutlich ungebundenen Proteine brechen bereits nach etwa einem CV stark durch. Der Verlauf der Kurve steigt bis zu einem Verhältnis von $c/c_0 = 0,8$ steil an und steigt dann in geringerem Maße bis die Konzentration im Eluat der aufgegebenen Proteinkonzentration c_0 entspricht.

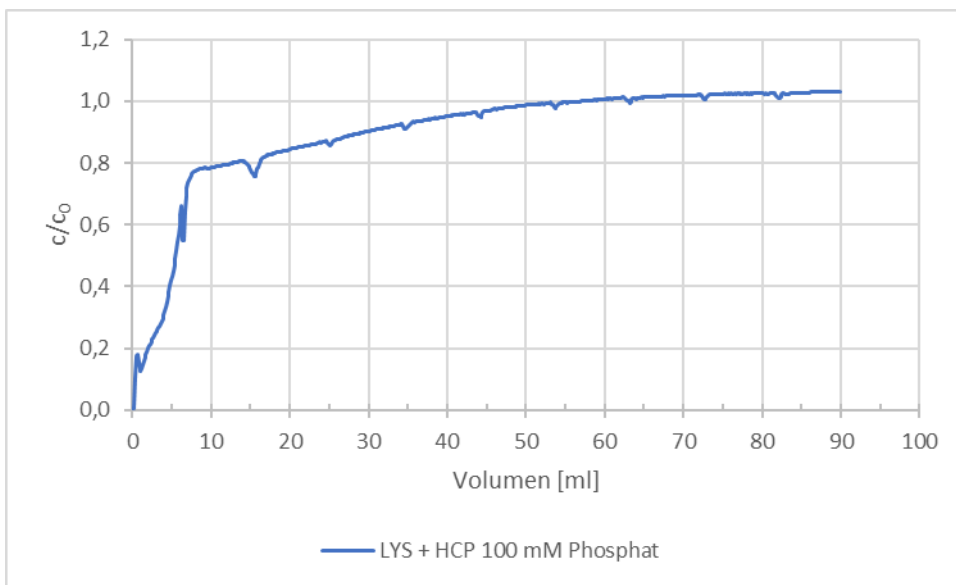


Abbildung 13: Frontalchromatographie von Lysozym (0,3 mg/ml) und HCP (0,7 mg/ml) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0). Der Auftrag der 90 ml Probenlösung erfolgte kontinuierlich mit einer Flussrate von 1 ml/min mittels der externen Pumpe P-500. Nach dem Probenauftrag wurde für 5 CV mit Equilibrierungspuffer gespült, bevor die Gradientenelution mit 1 M NaCl begann (nicht abgebildet). Während des Probenauftrages wurden durchgängig Fraktionen mit einem Volumen von 5 ml gesammelt. Die während der Chromatographie gemessene Absorption bei 280 nm wurde mittels einer Kalibriergeraden in die Proteinkonzentration (mg/ml) umgerechnet und dann durch die Ausgangskonzentration $c_0 = 1$ mg/ml geteilt, um die Durchbruchskurve zu normalisieren und die DBC und SBC berechnen zu können.

Nach Formel 2.1 wurde die dynamische Bindungskapazität der Säule bei einem Verhältnis von $c/c_0 = 0,1$ berechnet. Die berechnete $DBC_{10\%}$ beträgt 0,4 mg/ml.

In den gesammelten Fraktionen über den Verlauf der Durchbruchskurve mit einem Volumen von je 5 ml war ab Fraktion 15 deutliche Präzipitation zu erkennen. Die gemessene Proteinkonzentration in den ausgewählten Fraktionen ist in Tabelle 21 dargestellt. Dabei steigt die Konzentration wie erwartet von der ersten bis zur letzten Fraktion des Probenauftrages (F1-F18) an. F19 ist die Fraktion, die während des Waschschrattes mit Equilibrierungspuffer, gesammelt wurde.

In diesem Schritt sollen ungebundene und schwach gebundene Proteine von der Säule eluiert werden, deswegen ist hier eine niedrigere Proteinkonzentration zu erwarten.

Tabelle 20: Proteinkonzentration der während der Frontalchromatographie gesammelten Proben. Die jeweilige Konzentration wurde aus der gemessenen Absorption bei 280 nm im UV/VIS-Spektrophotometer mittels der Kalibriergeraden berechnet (vgl. Punkt 3.6.2).

Fraktion	Konzentration [mg/ml]
F1	0,22
F2	0,87
F4	1,09
F7	1,23
F15	1,41
F16	1,38
F18	1,52
F19	0,42

Zur Untersuchung der Zusammensetzung der Proteine, die durch die Säule durchbrechen, wurden ausgewählte Fraktionen auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Dabei ist zu erkennen, dass ab Fraktion 4 aufsteigend in allen Spuren eine Bande auf Höhe von Lysozym (14 kDa) zu finden ist. Die Stärke dieser Lysozymbanden nimmt mit aufsteigenden Fraktionen zu. Insgesamt sind in den Spuren aller Fraktionen Banden zu erkennen, welche mit denen der reinen HCP Probe übereinstimmen. Von Fraktion 17 wurde das Präzipitat und der Überstand einzeln aufgetragen. Bei den übrigen Fraktionen, in denen eine Präzipitation erkennbar war, wurde die Probe vor dem Auftragen auf einem Vortexer durchmischt. Bei der Spur des Überstandes von Fraktion 17 fällt auf, dass eine starke Lysozymbande zu erkennen ist, während die Banden der HCP eher schwach ausgeprägt sind. Dafür sind die Banden der HCP in der Spur des Pellets wiederum sehr stark ausgeprägt. Außerdem ist auffällig, dass in Fraktion 19 eine stärkere Ausprägung der Lysozymbande als der HCP-Banden zu erkennen ist, obwohl es sich hierbei um die Fraktion des Waschschrattes mit Equilibrierungspuffer handelt.

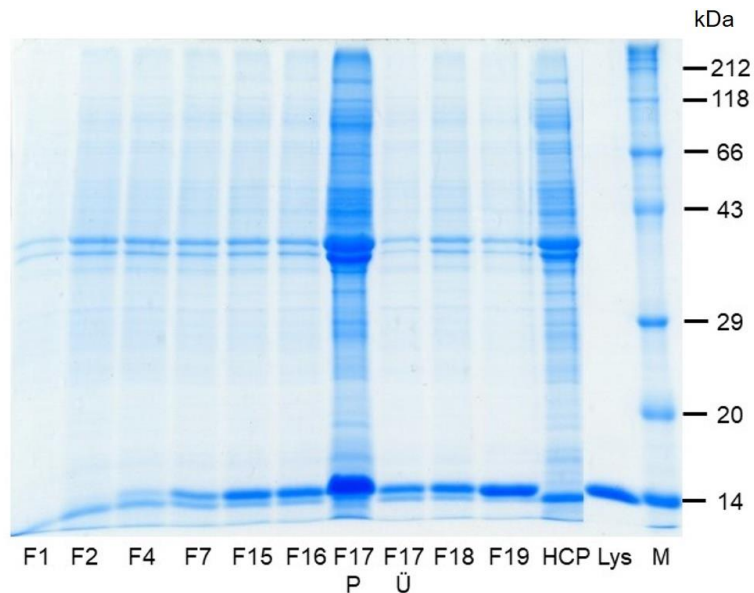


Abbildung 14: Coomassie gefärbte SDS-PAGE verschiedener Fraktionen, die während der Frontalchromatographie von 0,3 mg/ml Lysozym und 0,7 mg/ml HCP in 100 mM Phosphatpuffer aufgefangen wurden. Die Fraktionen hatten jeweils ein Volumen von 5 ml und wurden durchgängig gesammelt. Die aufgetragenen Fraktionen wurden ab folgenden Volumina genommen: F1 - 0 ml, F2 - 5 ml, F4 - 15 ml, F7 - 30 ml, F15 - 70 ml, F16 - 75 ml, F17 - 80 ml, F18 - 85 ml, F19 - 90 ml. Die Fraktion F19 wurde nach dem Ende des Probenauftrages während des Spülens für 5 CV mit Equilibrierungspuffer genommen. Das aufgetragene Volumen pro Proben tasche variiert je nach gemessener Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen. Von F17 wurde aus dem sich gebildeten Präzipitat (P) und aus dem Überstand (Ü) das gleiche Volumen aufgetragen. Die Proben wurden mit je 10 µl reduzierenden 2x Probenpuffer versetzt. M - Roti®-Mark STANDARD

4.3 Aufreinigung des Lysozyms durch die Frontalchromatographie

Die Elution nach der Frontalchromatographie durch eine Gradientenelution über 20 CV mit 100 mM Phosphatpuffer mit 1 M NaCl ist in Abbildung 15 dargestellt. Es ist ein einzelner deutlicher Elutionspeak erkennbar, der nach etwa 2 CV beginnt und ungefähr 5 CV andauert.

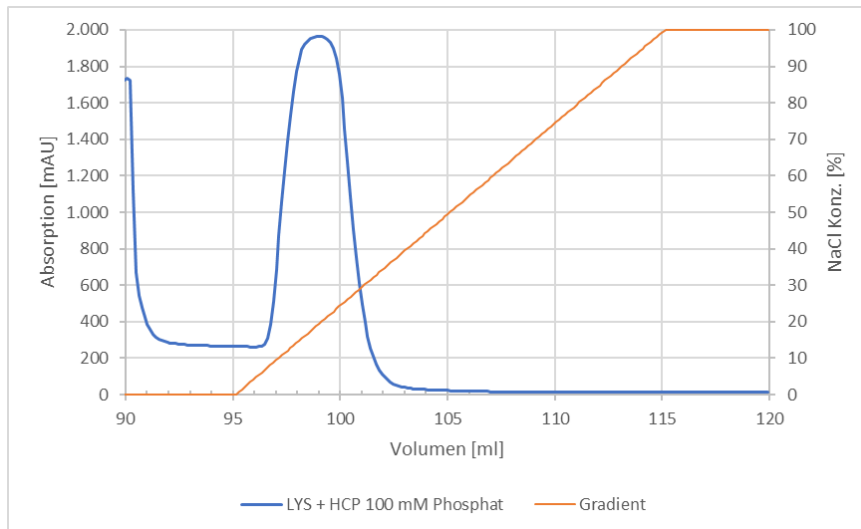


Abbildung 15: Elution nach der Frontalchromatographie von Lysozym (0,3 mg/ml) und HCP (0,7 mg/ml) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0). Die Elution erfolgte mittels eines 20 CV Gradienten mit einer Salzkonzentration von 1 M NaCl. Nach dem Gradienten wurde für weitere 5 CV mit Elutionspuffer nachgespült. Von V = 95 ml an wurden Fraktionen mit je einem Volumen von 1 ml mit Hilfe eines Fraktionssammlers gesammelt. Die unter dem Elutionspeak liegenden Fraktionen wurden im Anschluss zur Proteinkonzentrationsmessung und Untersuchung durch eine SDS-PAGE verwendet. Die Absorption der Proteinlösung während der Chromatographie wurde bei 280 nm gemessen. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Von den gesammelten Fraktionen mit je 1 ml Volumen wurden vier unter dem Peak liegende ausgewählt für eine Bestimmung der Proteinkonzentration (s. Tab. 22) und den Auftrag auf eine SDS-Page zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung unter dem Peak. In Abbildung 16 ist die Coomassie gefärbte SDS-PAGE abgebildet. Von den einzelnen Elutionsfraktionen wurde dabei eine ansteigende Menge an Protein von links nach rechts aufgetragen, um auch möglicherweise in niedriger Konzentration vorhandene HCP nachweisen zu können. In allen Fraktionen ist eine deutliche Lysozymbande zu erkennen. Zusätzlich ist in den Fraktionen E3, E4 und E5 jeweils mindestens eine Bande zu sehen, die mit den Banden der reinen HCP-Probe übereinstimmt. In Fraktion E7 ist so eine Bande nicht erkennbar. Hier war die Proteinkonzentration allerdings auch am geringsten, so dass im Verhältnis am wenigsten Proteinmenge aufgetragen werden konnte.

Tabelle 21: Proteinkonzentration der während der Elution nach der Frontalchromatographie gesammelten Proben. Die jeweilige Konzentration wurde aus der gemessenen Absorption bei 280 nm im UV/VIS-Spektrophotometer mittels der Kalibriergeraden berechnet (vgl. Punkt 3.6.2).

Fraktion	Konzentration [mg/ml]
E3	0,57
E4	1,60
E5	1,96
E7	0,33

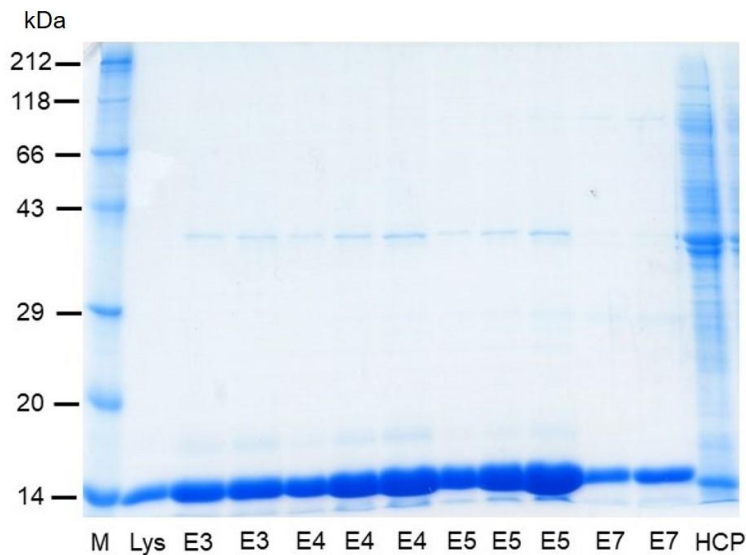


Abbildung 16: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der unter dem Elutionspeak liegenden Fraktionen 3-7, die während der Elution nach der Frontalchromatographie von 0,3 mg/ml Lysozym und 0,7 mg/ml HCP in 100 mM Phosphatpuffer aufgefangen wurden. Der Elutionspuffer enthielt zusätzlich 1 M NaCl. Die aufgefangenen Fraktionen hatten jeweils ein Volumen von 1 ml und wurden ab $V = 95$ ml der Frontalchromatographie gesammelt (vgl. Abb. 13). Die aufgetragenen Fraktionen wurden bei folgenden Volumina aufgefangen: E3 - 97 ml, E4 - 98 ml, E5 - 99 ml, E7 - 101 ml. Das je Proben tasche aufgetragene Volumen der Fraktionen variiert, dabei wurde das Volumen jeweils von der ersten bis zur letzten Tasche einer Fraktion erhöht, um verschiedene Proteinmengen auftragen zu können. Die Proben wurden mit je 10 μ l reduzierenden 2x Probenpuffer versetzt. M - Roti®-Mark STANDARD

5. Diskussion

5.1 Pufferoptimierung

Die durchgeführten Veränderungen des Probenpuffers, in dem die HCP nach der Dialyse gelöst waren, haben nicht den erwünschten Erfolg in Bezug auf die Verhinderung der Präzipitation bei der Zugabe des Lysozyms gebracht. Weder durch die Verwendung eines anderen Puffersalzes bzw. Pufferions (s. Punkt 4.1.1) noch durch die schrittweise Erhöhung der Molarität der eingesetzten Puffer (s. Punkt 4.1.2) oder den Wechsel des pH-Wertes (s. Punkt 4.1.3) konnten signifikante Veränderungen bei der Präzipitationsneigung ausgemacht werden. Die Zugabe von EDTA zur Komplexbildung von möglicherweise vorhandenen Calciumionen konnte zwar die Präzipitation kurzzeitig auflösen, aber dieser Effekt hielt nicht lange an. Es wurden also vermutlich Ionen gebunden, aber auch ohne diese Ionen besteht die Präzipitationsneigung weiterhin. Auch die Untersuchung der jeweiligen Präzipitate auf ihre genauere Proteinzusammensetzung hin zeigte für sämtliche Proben eine Mischung aus Lysozym und HCP, die aggregiert und präzipitiert waren. Zwar konnten in den dazugehörigen Überständen in den meisten Fällen auch noch zumindest HCP, oft auch Lysozym, nachgewiesen werden, aber immer in wesentlich geringerem Maße. Bei den Proteinlösungen in 200 mM Acetatpuffer fällt auf, dass im Überstand kein Protein auf der SDS-PAGE nachgewiesen werden kann. Betrachtet man aber die starke Präzipitation der HCP schon vor der Zugabe des Lysozyms und die deutlich stärkere Detektion der Banden im Präzipitat, scheint dies plausibel. Der Natriumacetatpuffer wurde auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt, der isoelektrische Punkt der meisten HCP liegt laut Literatur im schwach sauren Bereich (Carta & Jungbauer, 2010) und somit ist eine besonders starke Präzipitationsneigung nicht überraschend, denn Proteine tragen, wenn ihr pI-Wert dem pH-Wert der umgebenden Lösung entspricht, keine Oberflächenladung und sind somit sehr unlöslich.

5.2 Enzymatischer Zellaufschluss von *E. coli*

Bei der Zugabe von Lysozym bereits zum Aufschlusspuffer der *E. coli* Zellen sollte im Hinblick auf die Ziele dieser Arbeit hauptsächlich untersucht werden, ob eine Präzipitation der HCP in Gegenwart des Lysozyms verhindert werden kann, wenn dieses bereits sehr früh im Ablauf hinzugegeben wird. Da Lysozym, wie bereits beschrieben, über die Eigenschaft verfügt die β -1,4-glykosidischen Verbindungen in

der Zellwand hydrolysieren zu können (Gey, 2015), wurde durch diese frühe Zugabe des Lysozyms natürlich der Aufschluss der Gram-negativen *E. coli* Zellen forciert. Die Hoffnung aber war, dass das Lysozym trotz seiner Mitwirkung am Zellaufschluss weiter in Lösung bleibt und somit in der gleichen Konzentration, wie es eingesetzt wurde, auch noch in der Proteinlösung gemeinsam mit den HCP vorhanden ist, aber nicht zu einer Präzipitation dieser Proteine führt. Diese Hoffnung erfüllte sich allerdings nicht, es kam zu deutlicher Präzipitation in der Proteinlösung (vgl. Tab. 18).

Neben dem hauptsächlichen Aspekt der Lysozymzugabe zum Aufschlusspuffer kann anhand dieser Ergebnisse auch ein Rückschluss auf Situationen gezogen werden, in denen die vorrangige bzw. einzige Aufgabe des Lysozyms der enzymatische Zellaufschluss von Gram-negativen Zellen ist. In diesen Fällen, in denen beispielsweise ein ins Cytoplasma sekretiertes rekombinantes Protein das Zielprodukt ist, würde eine Präzipitation durch das Vorhandensein des Lysozyms einen Zielproduktverlust bedeuten, der unter Umständen gar nicht realisiert wird. Das Präzipitat könnte während der Zentrifugation zur Abtrennung der Zelltrümmer nach dem erfolgreichen Zellaufschluss verworfen werden. Leider wurde bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Zellaufschluss mit Zugabe von Lysozym keine Untersuchung des Pellets aus der Zentrifugation direkt nach dem Aufschluss durchgeführt, so dass dieser mögliche Zielproduktverlust nicht direkt nachgewiesen werden kann. Es wurde allerdings das Präzipitat, was sich in dem eigentlichen Überstand der Zentrifugation zur Abtrennung der Zelltrümmer ausgebildet hat, auf einer SDS-PAGE untersucht (vgl. Abb. 12). Dabei war im Präzipitat sowohl der deutliche Nachweis von Lysozym als auch von HCP möglich. Dies lässt darauf schließen, dass auch bei der vorangegangenen Zentrifugation schon HCP im Pellet durch Präzipitation vorhanden waren. Das mögliche rekombinante Zielprotein wäre also vermutlich ebenfalls präzipitiert, da es sich zusammen mit den restlichen Proteinen des Wirtsorganismus in Lösung befindet. Im dazugehörigen Überstand zum Präzipitat konnten zwar auch noch HCP nachgewiesen werden, allerdings in geringerem Maße. Hier kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich auch das gedachte Zielprotein noch in diesem Überstand wiedergefunden hätte. Mit recht großer Wahrscheinlichkeit aber wäre es schon in den vorherigen Schritten zu einem Verlust des Zielproteins gekommen. Diese Aussage bezieht sich dabei nur auf ein mögliches Zielprotein, welches in das Cytoplasma der Bakterienzelle sekretiert wird, über Produkte, die

beispielsweise in *inclusion bodies* akkumulieren, kann anhand der Ergebnisse keine Aussage getroffen werden.

5.3 Gezielte Präzipitation der DNA

Neben den *host cell* Proteinen gibt es noch weitere unerwünschte Kontaminanten bei der Herstellung eines biopharmazeutischen Proteins in einem Wirtsorganismus, so beispielsweise die genomische DNA (Carta & Jungbauer, 2010). Mit eben dieser DNA des Wirtsorganismus, hier *E. coli*, könnte es zu einer Bildung unlöslicher Komplexe mit den in Lösung vorhandenen Proteinen kommen, die dann präzipitieren. Da die DNA nicht durch eine einfache Zentrifugation nach dem Zellaufschluss abgetrennt werden kann, muss eine andere Möglichkeit gefunden werden. *Choe* und *Middelberg* beschreiben in ihrer Arbeit aus dem Jahre 2010 die selektive Präzipitation von DNA durch Spermin während der chemischen Extraktion eines unlöslichen cytoplasmatischen Proteins. Dabei scheint die Konzentration des eingesetzten Spermins eine eher untergeordnete Rolle für die Präzipitation der DNA zu spielen, während hauptsächlich das richtige Verhältnis von Spermin zu DNA (in mg/mg) für eine erfolgreiche Durchführung wichtig ist. In der hier vorliegenden Arbeit wurde deswegen mit einer der mittleren beschriebenen Konzentrationen an Spermin (7,5 g/l) gearbeitet, in der Hoffnung, dass damit ein passendes Verhältnis von Spermin zu DNA geschaffen wird. Das Spermin wurde direkt zum PBS-Puffer für den Zellaufschluss mittels Ultraschalls hinzugefügt, es bestand folglich keine Möglichkeit die vorhandene Menge an DNA im Voraus zu bestimmen.

Wie in Punkt 4.1.4 beschrieben, wurde sowohl im Pellet der Zentrifugation nach dem Zellaufschluss als auch während der Dialyse eine Bildung von weißen Aggregaten beobachtet. In der Arbeit von *Choe* und *Middelberg* wird die Präzipitation der DNA als Bildung von weißen, fadenförmigen Aggregaten geschildert, welche durch Zentrifugation abgetrennt werden können. Demnach scheint die gezielte Präzipitation der DNA erfolgreich gewesen zu sein. Nach der Dialyse wurden die Proben deshalb nochmals zentrifugiert, um die restlichen mutmaßlichen DNA-Aggregate von der HCP-Lösung abzutrennen. Bei der Zugabe von 0,3 mg/ml Lysozym kam es im Anschluss nicht zu einer Präzipitation, bei höheren Konzentrationen jedoch schon (vgl. Tab. 18). Um zu untersuchen, ob dies an der niedrigen Konzentration oder am Verhältnis von Lysozym zu HCP (30% zu 70%) lag, wurde Lysozym noch einmal in höheren Konzentrationen aber im gleichen Verhältnis zu den HCP gegeben (vgl. Tab. 19).

Dabei kam es wiederum bei den höheren Konzentrationen zu Präzipitation. Woran dies liegt, kann nur spekuliert werden. Durch die Zugabe höherer Konzentrationen an Spermin zu den Proben konnte keine Resolubisierung der Proteine erreicht werden. Auch durch eine weitere Zugabe an Spermin zu der HCP-Lösung noch ohne Lysozym konnte keine weitere Präzipitation von möglicherweise noch vorhandener genomischer DNA erreicht werden, so dass angenommen werden kann/muss, dass die Präzipitation bei höheren Lysozym- bzw. Proteinkonzentrationen allgemein nicht auf Aggregatbildung mit DNA zurückgeführt werden kann.

Choe und *Middelberg* gehen in ihrer Arbeit auch auf die Kopräzipitation von Protein bei der Präzipitation von DNA ein und geben eine hohe Spezifität des Spermins für DNA sowie eine vollständige Wiederherstellung der Proteine an. Dies wurde für die HCP in der vorliegenden Arbeit überprüft, indem das Pellet nach der Abzentrifugation der weißen Aggregate auf eine SDS-PAGE aufgetragen wurde (vgl. Abb. 11). HCP konnten dadurch in dem Pellet deutlich nachgewiesen werden, was der angegebenen vollständigen Wiederfindung der Proteine in der löslichen Phase widerspricht. Da es sich bei den HCP in dieser Arbeit aber um unerwünschte Verunreinigungen des simulierten Zielproteins Lysozym handelt, die in der anschließenden Chromatographie abgetrennt werden sollen, und es nach der Zugabe von Lysozym zu keiner weiteren Präzipitation und damit einem möglichen Zielproteinverlust kam, spielt dies für die vorliegende Arbeit eine eher untergeordnete Rolle.

5.4 Einfluss der Pufferoptimierung auf die Frontalchromatographie

Da nur in den Proteinlösungen mit 0,7 mg/ml HCP, die mittels Ultraschallaufschluss in PBS mit Zusatz von Spermin aus den *E. coli* Zellen gewonnen wurden, und 0,3 mg/ml Lysozym in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) keine Präzipitation auftrat, wurde eine Probe in dieser Zusammensetzung mit einem Gesamtvolumen von 100 ml für die Frontalchromatographie am Kationenaustauscher verwendet. Der Durchbruch der ungebundenen Proteine erfolgt bereits nach weniger als 1 CV. Durch die Analyse der Proteinzusammensetzung unter der Durchbruchskurve mit der SDS-PAGE ist bekannt, dass es sich hierbei um HCP handelt. Nach etwa 10 ml erreicht die Durchbruchskurve eine Art Plateau, ab diesem Volumen bricht auch das Lysozym durch. Der Anstieg der Kurve ist beim reinen Durchbruch der HCP sehr steil, was sich dadurch erklären lässt, dass die meisten der HCP bei einem pH-Wert von 7 negativ geladen sind durch ihren pI im schwach sauren pH-Bereich (Carta & Jungbauer, 2010)

und deswegen nicht an den Kationenaustauscher gebunden werden. Die berechnete dynamische Bindungskapazität bei einem Verhältnis von $c/c_0 = 10\%$ ist folglich sehr niedrig. Der Versuch die dynamische Bindungskapazität erst ab einem Volumen von 10 ml zu berechnen, also die Durchbruchskurve für die Absorption zu diesem Zeitpunkt zu normieren, scheiterte daran, dass kein wirkliches Plateau erreicht wird, da die HCP bis zum Ende des Probenauftrags kontinuierlich weiter durchbrechen.

Die auftretende Präzipitation in den Fraktionen, in denen HCP und Lysozym vorhanden ist, lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die Proteine in den Fraktionen in einem anderen Verhältnis zueinander vorliegen als in der aufgegebenen Probe.

5.5 Aufreinigung des Lysozyms durch die Frontalchromatographie

Die Aufreinigung des Lysozyms als simuliertes Zielprotein von den HCP als Prozesskontaminanten kann als *design for capture* Schritt in der industriellen Anwendung gesehen werden (Carta & Jungbauer, 2010). Dabei brechen die unerwünschten Beiprodukte bereits nach etwa 1 CV durch, während die DBC des Zielproteins möglichst groß ist. Dies konnte durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Frontalchromatographie nicht ganz erreicht werden, da das Lysozym bereits nach etwa 10 ml Probenauftrag mit durchbricht. Bei der anschließenden Elution der gebundenen Proteine konnte allerdings eine recht hohe Reinheit an Lysozym nachgewiesen werden. Die eingesetzte Proteinkonzentration von Lysozym hat einen Anteil von 30% an der Gesamtproteinkonzentration, was im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit den industriellen Bedingungen einen realistischen Wert darstellt. Dadurch dass auch ein Teil der HCP über eine positiv geladene Oberfläche bei $\text{pH} = 7$ verfügt, bindet nicht nur das Zielprotein Lysozym an die stationäre Phase, so dass anzunehmen ist, dass die Bindungsplätze schnell gesättigt sind. Durch die im Verhältnis zum Lysozym hohe Konzentration an HCP besteht eine große Konkurrenz um die freien Bindungsplätze der stationären Phase.

5.6 Schlussfolgerungen

In Hinblick auf die Präzipitation der HCP in Gegenwart von Lysozym konnte nur eine Möglichkeit gefunden werden, bei der keine Präzipitation auftritt. Die HCP, die mittels Ultraschallaufschluss in PBS mit Zusatz von Spermin aus den *E. coli* Zellen gewonnen wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit nur in einen Equilibrierungspuffer,

100 mM Phosphatpuffer mit pH = 7, dialysiert. Die Molarität dieses Puffers ist recht hoch für die Durchführung einer Ionenaustauschchromatographie, deswegen könnte in fortführenden Arbeiten die Dialyse in Puffer mit niedrigeren Molaritäten und deren Auswirkung auf die Präzipitationsneigung untersucht werden. Und im Anschluss daran dann auch der Einfluss der niedrigeren Molarität auf die Frontalchromatographie im Allgemeinen und die Durchbruchskurve, die dynamische Bindungskapazität und die Aufreinigung des Lysozyms als Zielprodukt im Speziellen.

In Bezug auf die DNA-Präzipitation durch Spermin sollte die Regenerierung der Proteine in den Lösungen noch genauer untersucht werden, da in dieser Arbeit festgestellt wurde, dass es zu einem Verlust an HCP in dem verworfenen DNA-Pellet kam. Außerdem könnte die DNA-Konzentration in den Lösungen vor und nach der Behandlung bzw. in Vergleichsgruppen ohne Behandlung verglichen werden, um genauer eingrenzen zu können, welchen Einfluss das Spermin auf die Verhinderung der Präzipitation hat. Da in den gesammelten Fraktionen unter der Durchbruchskurve der Frontalchromatographie wie beschrieben erneut Präzipitation auftrat, könnte auch noch genauer untersucht werden, ob dies wirklich wie vermutet auf die veränderten Konzentrationsverhältnisse zurückzuführen ist oder ob es dafür noch andere Gründe gibt.

Außerdem könnte der enzymatische Enzymaufschluss mit Lysozym tiefgreifender untersucht werden, insbesondere da es sich dabei um eine beliebte und anerkannte Methode zum Aufschluss Gram-negativer Bakterien handelt. Wenn es dabei tatsächlich regelmäßig zu unbemerkten Proteinverlusten durch Präzipitation kommt, wäre dies ein wichtiger Aspekt, der untersucht werden sollte, da er große Auswirkungen sowohl auf Forschung in kleineren Rahmen als eventuell auch auf die industrielle Produktion von Biopharmazeutika.

Literaturverzeichnis

- Brenner, V. (2019). *Einfluss der Ionenstärke auf das Adsorptionsverhalten von Lysozym unter dem Einfluss von HCPs am Kationenaustauscher*. Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg, Hamburg.
- Carl Roth. (2018). Gebrauchsanweisung Roti-Quant universal. Retrieved February 7, 2020, from <https://www.carlroth.com/medias/BA-0120-DE.pdf?context=bWFzdGVyfGluc3RydWN0aW9uc3wyNzQ0OTF8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGluc3RydWN0aW9ucy9oNTAvaDU0Lzg5NDUyMzU5ODQ0MTQucGRmfDgyMWI0YWQzNTUwZGU3MDI3YTA5NmQwYmRjOGE1MWYzMWI4NTJjZWl0NjVjZGNiNDUyZmRhMzYwMzQzYTk4OWU>
- Carta, G., & Jungbauer, A. (2010). *Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Choe, W. S., & Middelberg, A. P. J. (2001). Selective precipitation of DNA by spermine during the chemical extraction of insoluble cytoplasmic protein. *Biotechnology Progress*, 17(6), 1107–1113. <https://doi.org/10.1021/bp010110p>
- Dismer, F., & Hubbuch, J. (2007). A novel approach to characterize the binding orientation of lysozyme on ion-exchange resins. *Journal of Chromatography A*, 1149(2), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.074>
- Dismer, F., Petzold, M., & Hubbuch, J. (2008). Effects of ionic strength and mobile phase pH on the binding orientation of lysozyme on different ion-exchange adsorbents. *Journal of Chromatography A*, 1194(1), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.085>
- Freitag, R. (2014). Chromatographic Techniques in the Downstream Processing of Proteins in Biotechnology. Pörtner R. (Eds) *Animal Cell Biotechnology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 1104, 419–458. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-62703-733-4_25
- GE Healthcare. (2006). ÄKTApurifier Benutzerhandbuch. Retrieved February 26, 2020, from <https://docplayer.org/64386552-Ge-healthcare-aektapurifier-benutzerhandbuch.html>
- GE Healthcare. (2016). *Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods*.

- Retrieved February 23, 2020, from
<https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=13101>
- GE Healthcare. (2018). HiTrap CM FF. Retrieved February 27, 2020, from
<https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11443>
- Gey, M. H. (2015). *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik* (3. Auflage). Heidelberg: Springer Spektrum.
- Hemschemeier, S. K., & Maelicke, A. (2016). Die Dialyse von Proteinen. Retrieved January 30, 2020, from Wiley Information Services GmbH website:
http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/proteinfaellung.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteinanalytik/methoden_protein/fallung_dialyse.vscml.html
- ITW Reagents. (2020). Biologische Puffer - Übersicht. Retrieved February 27, 2020, from http://www.itwreagents.com/rest-of-world/de/gb-bb_puffer-de
- Lundanes, E., Reubsaet, L., & Greibrokk, T. (2014). *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Mortimer, C. E., & Müller, U. (2010). *Chemie* (10. Auflag). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Otte, J. (2018). *Impact of buffer salts on protein-protein-adsorber interactions by using E. coli host proteins in ion exchange chromatography*. Hamburg University of Applied Sciences, Hamburg.
- Phillips, D. C. (1967). THE HEN EGG-WHITE LYSOZYME MOLECULE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(3), 483–495.
- Preet, P. (2018). Peptides: a New Therapeutic Approach. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 10(2), 29–34.
<https://doi.org/10.22159/ijcpr.2018v10i2.25887>
- Ratnaparkhi, M. P., Chaudhari, S. P., & Pandya, V. a. (2011). Peptides and proteins in pharmaceuticals. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*,

3(2), 1–9.

Rehm, H., & Letzel, T. (2016). *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics* (7. Auflage). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48851-5>

Sakodynskii, K. (1972). The life and scientific works of Michael Tswett. *Journal of Chromatography A*, 73(2), 303–360. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)91213-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)91213-0)

Sigma-Aldrich. (2020). Product information: Lysozym. Retrieved February 6, 2020, from <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/7/l7651dat.pdf>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Trennungsprinzip der IEC.....	8
Abbildung 2: Beispiel einer Frontalchromatographie mit einer typischen sigmoidalen Durchbruchskurve.....	9
Abbildung 3: Löslichkeit von Lactoglobulin in Abhängigkeit von NaCl-Konzentration und pH-Wert.	12
Abbildung 4: Aminosäuresequenz von Lysozym aus Hühnereiweiß.....	12
Abbildung 5: Schematischer Geräteaufbau der ÄKTApurifier von GE Healthcare (GE Healthcare, 2006).	21
Abbildung 6: Mögliche Positionen des Injektionsventils INV 907 bei Anschluss einer externen Pumpe an die ÄKTApurifier..	21
Abbildung 7: Kalibriergerade der Proteinstandardlösung mit 0,7 mg/ml HCP und 0,3 mg/ml Lysozym.	26
Abbildung 8: Coomassie gefärbte SDS-PAGE des Präzipitats und des Überstandes nach Zugabe von Lysozym zu den HCP in Imidazol- bzw. Phosphatpuffer.	29
Abbildung 10: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Präzipitate nach der Zugabe von Lysozym zu den HCP in Acetatpuffer.	31
Abbildung 11: Coomassie gefärbte SDS-PAGE des Präzipitats und des Überstandes nach Zugabe von Lysozym zu den HCP in Phosphat-, Acetat- bzw. Bis-Tris-Puffer.	33
Abbildung 12: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der Proben vom Aufschluss der <i>E. coli</i> Zellen mit Zusatz von Lysozym bzw. Spermin.....	35
Abbildung 13: Frontalchromatographie von Lysozym (0,3 mg/ml) und HCP (0,7 mg/ml) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)..	36
Abbildung 14: Coomassie gefärbte SDS-PAGE verschiedener Fraktionen, die während der Frontalchromatographie von 0,3 mg/ml Lysozym und 0,7 mg/ml HCP in 100 mM Phosphatpuffer aufgefangen wurden.....	38
Abbildung 15: Elution nach der Frontalchromatographie von Lysozym (0,3 mg/ml) und HCP (0,7 mg/ml) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)..	39

Abbildung 16: Coomassie gefärbte SDS-PAGE der unter dem Elutionspeak liegenden Fraktionen 3-7, die während der Elution nach der Frontalchromatographie von 0,3 mg/ml Lysozym und 0,7 mg/ml HCP in 100 mM Phosphatpuffer aufgefangen wurden. 40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	14
Tabelle 2: Verwendete Software	15
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien	15
Tabelle 5: Verwendete Proteine	16
Tabelle 6: Verwendete stationäre Phase	16
Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen	16
Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer in den Versuchsteilen.....	18
Tabelle 9: Angabe der Zusätze und der jeweiligen Konzentrationen im PBS-Puffer .	19
Tabelle 10: Proteinkonzentration und Anteil an der Gesamtproteinkonzentration der Lösung von Lysozym und HCP zur Untersuchung der Präzipitation der Proteine.....	22
Tabelle 11: Ablauf und Beschreibung der verwendeten Methoden bei der Chromatographie	23
Tabelle 12: Verdünnungsreihe des BSA-Standards	25
Tabelle 13: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE	27
Tabelle 14: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in 200 mM Imidazolpuffer (pH 7,0).	28
Tabelle 15: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in Phosphatpuffer (pH 7,0) in verschiedenen Molaritäten..	30
Tabelle 16: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in Acetatpuffer (pH 5,0) in verschiedenen Molaritäten.....	32
Tabelle 17: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in Bis-Tris Puffer (pH 6,0) in verschiedenen Molaritäten...	32
Tabelle 18: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) bzw. 100 mM Phosphatpuffer, 3 mM EDTA (pH 7,0).....	34

Tabelle 19: Präzipitationsverhalten bei Zugabe von Lysozym in unterschiedlichen Konzentrationen zu HCP in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0).....	35
Tabelle 21: Proteinkonzentration der während der Frontalchromatographie gesammelten Proben.....	37
Tabelle 22: Proteinkonzentration der während der Elution nach der Frontalchromatographie gesammelten Proben.....	40

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Hamburg, den 28.02.2020

Inga Berit Leske