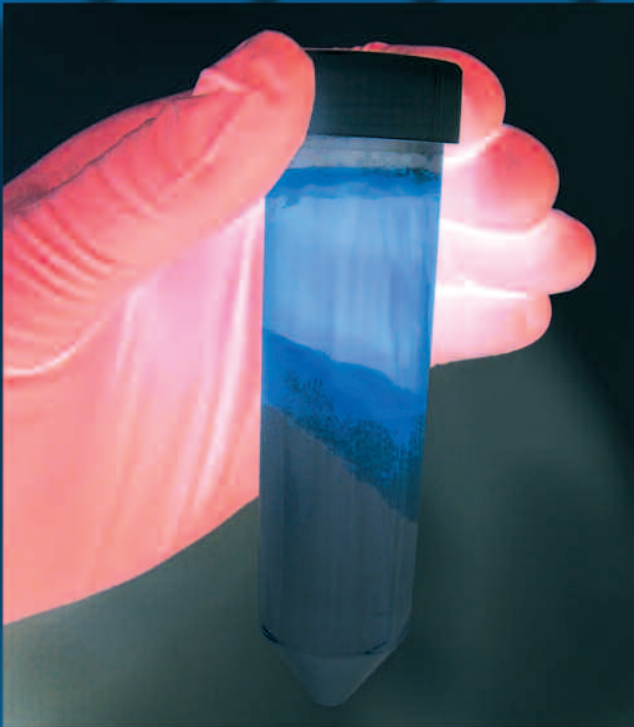


Entwicklung und Untersuchung eines Verfahrens zur integrierten Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion

Andreas Frerix



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Biotechnologie 2

Entwicklung und Untersuchung eines Verfahrens zur integrierten Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion

Andreas Frerix

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 29

ISSN 1433-5549

ISBN 3-89336-442-0

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet
über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

Herausgeber
und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Telefon: 02461 61-5368 · Telefax: 02461 61-6103
e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2006

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences Band/Volume 29

D 82 (Diss., Aachen, RWTH, 2006)

ISSN 1433-5549
ISBN-10: 3-89336-442-0
ISBN-13: 978-3-89336-442-8

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Vorwort

“Separations design is a continuing battle to eliminate unpromising regions of parameter space until one finally arrives at an acceptable process.”

(Lightfoot und Moscariello 2004)

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biotechnologie 2 im Forschungszentrum Jülich. Herrn Prof. Dr. C. Wandrey gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und für die Übernahme des Gutachtens.

Herrn Prof. Dr.-Ing. W. Hartmeier vom Lehrstuhl für Biotechnologie der RWTH Aachen und Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Büchs vom Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der RWTH Aachen danke ich ebenfalls für die Übernahme des Gutachtens bzw. für die Durchführung der Promotionsprüfung.

Seitens der Firma QIAGEN GmbH möchte ich ganz besonders Dr. Markus Müller von der Abteilung Contract Manufacturing & Process Development sowohl für die Finanzierung als auch für die hervorragende Unterstützung und Zusammenarbeit danken. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe bedanken, allen voran bei Lothar Breitkopf und Jörg Hucklenbroich, die mich bei den Versuchen tatkräftig unterstützt haben. Seitens von QIAGEN bin ich zudem Dr. Martin Weber sowie Dr. Markus Sprenger-Haussels und seinen Mitarbeiterinnen zu Dank verpflichtet. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. M.-R. Kula für die vielen Hilfestellungen zur Zweiphasenextraktion bedanken.

Einen herzlichen Dank möchte ich der Aufarbeitungsgruppe aussprechen. Dem Leiter Dr. J. Hubbuch danke ich für die Betreuung und Diskussionsbereitschaft und Dipl.-Ing. (FH) Esther Knieps-Grünhagen sowie Petra Geilenkirchen für die praktische Unterstützung im Labor. Dipl.-Ing. (FH) Michael Schönewald danke ich für die Durchführung der Verteilungsexperimente im Rahmen seines Praxissemesters und seiner Diplomarbeit. Ebenfalls möchte ich mich bei Dipl.-Ing. (FH) Björn Selbach für die Arbeit während seines Praxissemesters bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern, Schwägern, Nichten und Neffen für jegliche Unterstützung und natürlich ganz besonders Britta!

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Aufarbeitung in der Biotechnologie.....	1
1.2	Eigenschaften von Plasmid DNA.....	2
1.3	Plasmid DNA und deren Einsatzgebiete.....	5
1.4	Produktion von Plasmid DNA	9
1.4.1	Upstream Processing	9
1.4.2	Downstream Processing.....	10
1.4.3	Alkalische Lyse.....	11
1.4.4	Referenzverfahren zur Plasmidaufreinigung	13
1.4.5	Weitere Aufreinigungsverfahren	14
1.4.6	Regulatorische Anforderungen.....	16
1.5	Historie und Einsatzgebiete der wässrigen Zweiphasenextraktion.....	18
1.5.1	Kurze theoretische Beschreibung.....	20
1.5.2	Veröffentlichungen zur Plasmidaufreinigung mittels wässriger Zweiphasenextraktion.....	23
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	23
2	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	25
2.2	Nukleinsäuren und Biomasse	26
2.3	Ansatz von Phasensystemen	27
2.3.1	Ansätze ohne Biomasse.....	27
2.3.2	Ansätze mit Biomasse	27
2.3.3	Plasmidpräparation im Mikrogramm-Maßstab.....	28
2.4	Versuch zur Maßstabsvergrößerung	28
2.4.1	Durchführung des Referenzverfahrens.....	28

2.4.2	Durchführung der wässrigen Zweiphasenextraktion.....	28
2.5	Nukleinsäureanalytik	31
2.5.1	HPLC.....	31
2.5.2	Agarosegelelektrophorese.....	33
2.5.3	Sequenzierung	34
2.6	Phasendiagramm	34
2.7	Dynamische Lichtstreuung	35
2.8	Flammenphotometrie.....	35
2.9	Filtrationsexperimente	36
2.10	Diagramme	36
3	AUSGANGSSITUATION	37
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	40
4.1	Integration der alkalischen Lyse in die wässrige Zweiphasenextraktion	40
4.1.1	Einleitung.....	40
4.1.2	Ergebnisse	41
4.1.3	Diskussion	46
4.1.4	Schlußfolgerung	50
4.2	Strukturelle Einflüsse auf die Verteilung von Plasmid DNA.....	50
4.2.1	Einleitung.....	50
4.2.2	Verteilungsstudien	53
4.2.3	Untersuchungen zur Löslichkeit von Plasmiden	57
4.2.4	Coil-Globule Transition	62
4.2.5	Diskussion	66
4.3	Entsalzung durch Membranadsorption	70
4.3.1	Einleitung.....	70
4.3.2	Ergebnisse	71

4.3.3	Diskussion	79
4.4	Feinreinigung mittels wässriger Zweiphasenextraktion	84
4.4.1	Einleitung.....	84
4.4.2	Ergebnisse	85
4.4.3	Diskussion	91
4.5	Versuch zur Maßstabsvergrößerung	95
4.5.1	Einleitung.....	95
4.5.2	Ergebnisse	96
4.5.3	Diskussion	98
4.6	Plasmidpräparation im Mikrogramm-Maßstab.....	101
4.6.1	Einleitung.....	101
4.6.2	Ergebnisse	102
4.6.3	Diskussion	104
5	AUSBLICK.....	106
6	ZUSAMMENFASSUNG	108
7	SUMMARY	111
8	PUBLIKATIONEN	113
8.1	Poster.....	113
8.2	Vorträge.....	113
8.3	Manuskripte	114
8.4	Patentanmeldungen	114
9	REFERENZEN	115
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125
11	SYMBOLVERZEICHNIS	126
12	LEBENS LAUF	127

1 Einleitung

1.1 Aufarbeitung in der Biotechnologie

Die mikrobielle- und zellkulturtechnische Produktion biotechnologischer Wertstoffe kann grundsätzlich in zwei Bereiche unterteilt werden. Grob formuliert beginnt sie mit der Auswahl und der Kultivierung der Wertstoffproduzenten (Upstream Bereich) und setzt sich in der Abtrennung der Wertstoffe, deren Aufreinigung und Formulierung fort (Downstream Bereich). Betrachtet man die Kosten für die Kultivierung, so sind die Kosten für die Aufarbeitung etwa 2-mal (für niedermolekulare Verbindungen) bis 10-mal (für pharmazeutische Produkte) höher. Vor allem aus diesem Grund kommt der Prozeßentwicklung für die Aufarbeitung biotechnologischer Produkte eine besondere Aufgabe zu. Dabei ist häufig nicht alleine die eigentliche Aufreinigung das Problem, sondern der Erhalt der biologischen Aktivität des Produktes. Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Aufreinigungsverfahren ist die Kenntnis über die Oberflächeneigenschaften (Ladung, Größe, Hydrophobizität, etc.) des Produktmoleküls, die für spezifische Wechselwirkungen ausgenutzt werden kann. Eine Vielzahl biopharmazeutischer Aufarbeitungen im technischen Maßstab basieren auf chromatographischen Verfahren, die Wechselwirkungen zwischen Produktmoleküloberfläche und einer festen Matrix ausnutzen. Diese zeichnen sich einerseits durch ihre hohen Trennleistungen aus, der Einsatz chromatographischer Verfahren ist dafür jedoch mit relativ hohen Kosten verbunden. Letztere sind hierbei nicht nur auf die Beschaffung der stationären Phasen zurückzuführen, sondern vor allem auf die Bereitstellung und Entsorgung großer Volumina der mobilen Phase¹. Im zunehmenden Maße wird daher die Entwicklung alternativer Verfahren wie z.B. Präzipitation, Kristallisation oder Extraktion vorangetrieben (Przybycien *et al.* 2004), die je nach Anwendungsfall für eine erste Grobreinigung nach der Kultivierung interessant sind. Diese Dissertation ist somit ein Beispiel für die Entwicklung eines alternativen Verfahrens zur Plasmidaufreinigung, das nicht auf chromatographischen Methoden basiert.

¹ Weitere Limitierungen der Festbettchromatographie werden unter 4.3 diskutiert.

1.2 Eigenschaften von Plasmid DNA

Plasmide (pDNA) sind extrachromosomal vorkommende, meistens ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die hauptsächlich in prokaryotischen, selten auch in eukaryotischen Zellen vorkommen können (Abbildung 1.1). Sie vervielfältigen sich unabhängig vom bakteriellen Chromosom, so dass je nach Plasmidtyp und Bedingungen die Stückzahl pro Zelle von einem bis mehrere Hundert (high copy Plasmid) variieren kann.

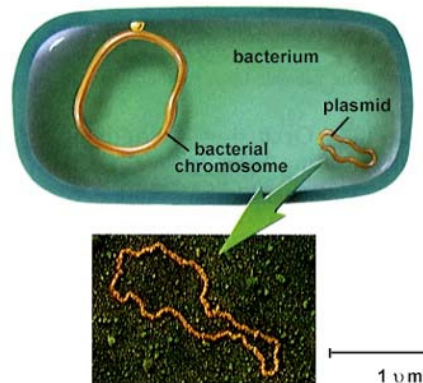


Abbildung 1.1: Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung der pDNA.

Eine wichtige Eigenschaft von pDNA ist die Möglichkeit zum Austausch zwischen Bakterienzellen, die Konjugation genannt wird. Dabei wird zwischen zum Austausch befähigten (= fertilen) Zellen ein so genannter schlauchförmiger Sex pilus ausgebildet, wodurch der Austausch der pDNA erfolgen kann. Über die pDNA können auf diesem Weg Gene ausgetauscht werden, die zusätzliche Merkmale zur Erhöhung der Anpassungsfähigkeit an Umweltbedingungen enthalten können. Hiermit sind Gene gemeint, deren Genprodukte (also Proteine) z. B. zur Inaktivierung von Antibiotika führen (Resistenzfaktoren) können, was ein Grund für die relativ schnelle Resistenzbildung von Bakterien ist. Aufgrund der Fähigkeit zur Übertragung von bestimmten Genen, die im Wirt auch chromosomal integriert werden können, wird pDNA schon lange in der Gentechnik angewendet. Die Tatsache, dass mittels pDNA relativ einfach Gene beliebiger Herkunft vermehrt werden können, wird in der Gentherapie bzw. in der DNA-Vakzinierung genutzt. Dort dienen Plasmide als Vektor zur Übertragung therapeutischer Gene in die zu behandelnden Zellen des Patienten.

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Plasmid ist vom Typ pCMV β (Abbildung 1.2). Das 7164 Basenpaare große Plasmid verfügt neben einem Ampicillinresistenzgen (amp^R) über ein lacZ -Gen, das zur Expressierung des Reporterproteins β -Galactosidase genutzt wird. Der Promoter (CMV-promoter) stammt aus dem humanpathogenen Cytomegalievirus und wird daher häufig als starker eukaryotischer Expressionsvektor in der Gentherapie eingesetzt, aber z. B. auch zur heterologen eukaryotischen Expression von Proteinen in der Zellkulturtechnik. Durch Insertion eines geeigneten Gens hinter dem Promoter wird der Vektor zum gentherapeutischen Plasmid.

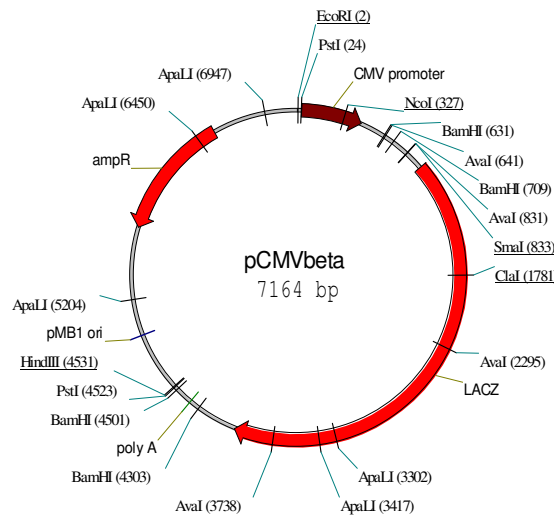


Abbildung 1.2: Vektorkarte von pCMV β (Quelle: CLONTECH Laboratories, Inc.)

Isoliert man pDNA aus einem Zellysat von *E.coli*, so stellt man unterschiedliche Konformationen der Plasmide fest (Abbildung 1.3). Sie unterscheiden sich in Topologie und Größe, wobei aus Bakterienzellen isolierte pDNA fast ausschließlich eine kovalent geschlossene, zirkuläre Struktur besitzen. Diese Form wird als supercoiled bezeichnet, da die DNA-Helix zusätzlich durch enzymatische Vorgänge der Topoisomerase um sich selbst verdrillt wird. Obwohl noch nicht eindeutig geklärt, gibt es Hinweise darauf, dass die scDNA die höchste Biokompatibilität zur Transfektion der eukaryotischen Zellen aufweist und daher die höchste Effektivität für den Gentransfer zeigt (Marquet *et al.* 1997). Durch

Nukleaseaktivität (Monteiro *et al.* 1999) oder auch starke mechanische Beanspruchung (Levy *et al.* 1999) kann es zum Einzelstrangbruch kommen, was eine Entwindung des Moleküls zur Folge hat und das Plasmid somit als offen zirkuläre Form vorliegt (ocDNA). Durch Bruch beider Stränge an der gleichen Stelle infolge von enzymatischen Verdaus durch Restriktionsendonukleasen wird die pDNA linearisiert. Weitere Formen ergeben sich durch Zusammenlagerung von pDNA, wodurch Dimere bzw. Oligomere entstehen können, die entsprechend die doppelte bzw. mehrfache Länge besitzen.

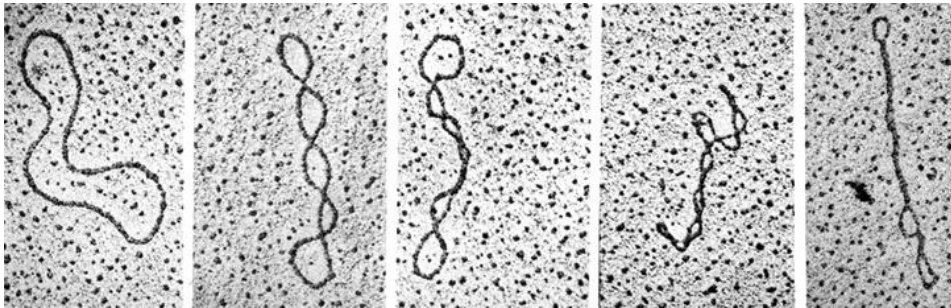


Abbildung 1.3: Plasmid Konformationen; ganz links: open circular (ocDNA), restliche Abbildungen zeigen supercoiled Plasmide (scDNA) mit unterschiedlichem Grad der Verdrillung (Voet und Voet 1990)

Für das Downstream Processing von pDNA spielen die Oberflächeneigenschaften die Hauptrolle. Hier ist die Größe zu nennen, die ein Vielfaches eines Proteindurchmessers beträgt (pDNA: $M_w > 10^6$ Da, 50 - 500 nm Durchmesser; BSA: 66000 Da, ca. 5 - 8 nm Durchmesser). Jeder Strang des pDNA Moleküls ist ein lineares Polymer von Desoxyribonukleotiden, die über Phosphodiesterbrücken miteinander verbunden sind. Diese Phosphatgruppen verleihen der DNA bei pH Werten > 4 eine starke negative Ladung (polyanionisch), so dass die Nettoladung des Moleküls der Zahl der Nukleotide entspricht. Die Doppelhelix entsteht dann durch die antiparallele, schraubenförmige Anordnung zweier Einzelstränge, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen und Stapelkräften stabilisiert wird.

Eine Konsequenz der Nukleotidanordnung zu einer Helixstruktur ist die Ausbildung von Vertiefungen in der Moleküloberfläche, innerhalb derer die Nukleotidbasen für Lösungsmittelmoleküle und Liganden erreichbar sind. Diese Zugänglichkeit für aromatische Elektronen und die verfügbaren Wasserstoffbrückenbindungen sind

entscheidende Eigenschaften für DNA-Liganden-Interaktion und können zusammen mit der polyanionischen Ladung für die Entwicklung und Nutzung von Aufreinigungsstrategien genutzt werden (Ferreira *et al.* 2000).

1.3 Plasmid DNA und deren Einsatzgebiete

Innerhalb der letzten beiden Jahrzehnte wurde die Aufreinigung von pDNA ein Routineverfahren, das sowohl im Labor als auch in industrieller Umgebung zunehmend Anwendung fand. Insbesondere führten der Einsatz und die Vermehrung von rekombinanter DNA in der Molekularbiologie zu einem zunehmenden Bedarf an Aufreinigungsverfahren im Labormaßstab (Kitsystem). pDNA spielte dabei eine besondere Rolle, da sie Vektor zur Übertragung von Genen zwischen Mikroorganismen dient und sie daher eine Schlüsselposition für die Gentechnik einnimmt. Für eine Vielzahl von molekularbiologischen Einsatzgebieten von pDNA sind unterschiedliche Reinheiten erforderlich, die sich in der großen Anzahl an bisher entwickelten Aufreinigungsverfahren widerspiegelt. Zu den klassischen Verfahren zählen Dichtegradientenzentrifugation und Phenol/Chloroform-Extraktion, die heute nur noch vereinzelt Anwendung finden. Zwar liefern beide Verfahren pDNA in sehr hoher Qualität und Reinheit, der Einsatz giftiger Lösungsmitteln, hohe Investitionskosten und hoher Zeitbedarf waren jedoch die Gründe dafür, dass diese Standardverfahren vielfach von kommerziellen Kit-Systemen verdrängt wurden. Diese Einweg-Systeme basieren meist auf chromatographischen Verfahren und liefern je nach Einsatzgebiet DNA im µg bis mg Maßstab.

Seit einigen Jahren wird neben der Verwendung von pDNA für molekularbiologische Verfahren der Einsatz für therapeutische Einsatzgebiete in zahlreichen klinischen Studien getestet. Diese Verfahren werden im folgendem kurz vorgestellt:

Gentherapie ist der Transfer von genetischem Material in Zielzellen, die defekte Gene enthalten, mit dem Ziel, entsprechende Gene zu korrigieren oder die Zelle abzutöten. Da durch dieses Verfahren Veränderungen auf tiefster molekularer Ebene vorgenommen werden können, ist ein breites Spektrum an Behandlungsmöglichkeiten vorstellbar, für die zumindest bis jetzt mit

konventionellen Methoden keine erfolgreiche Heilung ermöglicht werden kann. Vorstellbare Anwendungsgebiete sind Mukoviszidose als genetisch bedingte Krankheit sowie Krebs und AIDS als nicht-genetische Erkrankung. Bei der Behandlung unterscheidet man ex vivo und in vivo Verfahren. Bei der ex vivo oder zellbasierten Anwendung werden Zellen vom Patienten entfernt, expandiert, therapeutische Gene werden in die Zellen transferiert und schließlich Zellen mit korrigierten genetischem Material selektiert. Letztere werden wiederum vermehrt, bevor sie durch Transplantation oder Transfusion dem Patienten zugeführt werden. Als Vorteil ist eine hohe Effektivität des Gentransfers zu nennen, nachteilig sind die hohen Kosten für Durchführung der individuellen Behandlungen. Demgegenüber stehen kostengünstigere in vivo Verfahren, die allgemein und nicht nur patientenspezifisch durchgeführt werden können. Hierbei wird ein Träger für das genetische Material, ein Vektor, direkt im Körper des Patienten z. B. durch Injektion, Inhalation oder ballistische Verfahren verabreicht. Nachteil dieses Verfahrens ist die unspezifische Integration der Vektoren in Zellen und auch in das Genom des Patienten.

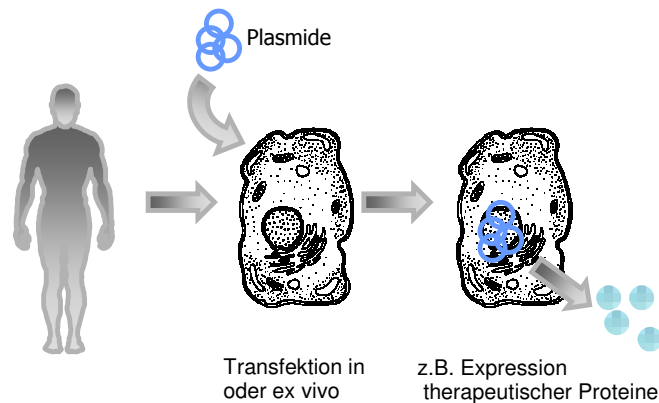


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Gentherapie

Einen ersten Durchbruch erzielte die Gentherapie in den Jahren 2000 und 2002, in denen eine erste erfolgreiche Behandlung von an SCID (severe combined immunodeficiencies, schwere angeborene Immunerkrankung) erkrankten Patienten erfolgte (Cavazzana-Calvo *et al.* 2000; Aiuti *et al.* 2002). Tragischerweise schlug die anfängliche Euphorie in eine Krise um, als bei zwei behandelten Kindern leukämieähnliche Anzeichen festgestellt wurden (Hacein-

Bey-Abina *et al.* 2003). Bei den behandelten Patienten wurde der genetische Defekt durch den Transfer eines therapeutischen Gens mit einem ‚nicht pathogenen‘ Retrovirus behandelt. Diese Vektoren wurden bei dem durchgeführten ex vivo Ansatz zur Infizierung von Knochenmarkzellen verwendet, die sich nach Rückführung in den Blutkreislauf der Patienten wieder in normale Immunzellen differenzieren sollten. Tatsächlich zeigte sich, dass in einigen Fällen therapeutische DNA in den chromosomalen Bereichen des Patienten auftraten, die für die Regulation der Zellteilung verantwortlich sind und dadurch Krebs verursachten. Das Bekanntwerden dieser Fälle führte zu einem drastischen Rückgang entsprechender klinischer Studien (Abbildung 1.5). Viele Biotechnologieunternehmen zogen sich folglich aus der gentherapeutischen Forschung zurück oder stiegen auf nicht virale Gentransfermethoden um, zu denen der Einsatz von pDNA zählt (Cavazzana-Calvo *et al.* 2004).

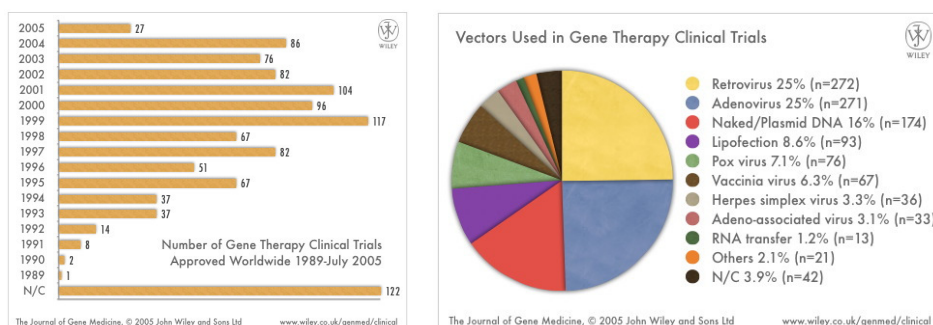


Abbildung 1.5: Überblick über gentherapeutische Verfahren in klinischen Phasen (links) und eingesetzte Vektoren in gentherapeutischen klinischen Studien (2005) (Quelle: Wiley)

Grundsätzlich existiert neben dem Verfahren, therapeutisch Gene mit viralen Vektoren zu übertragen, die Möglichkeit, therapeutische DNA direkt oder umschlossen von Liposomen anzuwenden. Als Vektor dient dann ein Plasmid, in das therapeutische Gene integriert und dann transferiert werden können. Im Vergleich zu viralen Vektoren weist der Transfer mit pDNA ein weitaus geringeres Sicherheitsrisiko auf, dafür ist die Transfektionseffizienz verhältnismäßig gering (Tabelle 1.1).

DNA Vakzinierung

Ein weiteres bedeutendes Einsatzgebiet von pDNA ist DNA Vakzinierung, was als „Impfen mit DNA“ verstanden werden kann. Gegenüber der klassischen Impfung, bei der das Immunsystem durch Verabreichung von Antigenen z. B. in Form von abgeschwächten Krankheitserregern angeregt wird, exprimieren Zellen bei der DNA-Vakzinierung die Antigene selbst. Die verabreichten Plasmide enthalten somit therapeutische Gene, die z. B. ein virales Hüllprotein codieren, das dann in der Zelle exprimiert wird. Die Zelle ist somit ihr eigener Impfstoffproduzent. Da hier die Expression eines Virusbestandteils wie bei einer tatsächlichen Infektion stattfindet, wird hierdurch sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort angeregt. Bei herkömmlichen proteinbasierten Impfverfahren wird in der Regel nur eine humorale Immunantwort erreicht (Leitner *et al.* 1999), weshalb man bei der DNA-Vakzinierung von einer höheren und spezifischeren Wirksamkeit ausgeht. Darüber hinaus gilt die plasmidbasierte Impfung als sehr sicher, da hierbei weder genetische Integrationen noch spezifische Immunreaktionen durch das Plasmid selbst zu erwarten sind (Prather *et al.* 2003).

Tabelle 1.1: Vor- und Nachteile von Vektoren für den Gentransfer (Mountain 2000; Walther und Stein 2000; Theodossiou 2002)

Vektor	Vorteil	Nachteil
Retroviren	Stabile Integration ins Genom; relativ lange Expression; hohe Transfektionsrate ex vivo; geringe Immunität; vielfache klinische Erfahrung in der Anwendung	Geringe Transfektionsrate in vivo; limitierte Insertgröße (<8 kb); infiziert nur sich teilende Zellen; potenzielle Mutagenese bei Integration; Herstellung, Lagerung und QC extrem problematisch
Lentiviren	Stabile genomische Integration; Transfiziert sowohl teilende als auch nicht teilende Zellen; Transfiziert hämatopoetische Stammzellen	Virusgruppe potenziell pathogen; mögliche immunologische Wirkung; Herstellung, Lagerung und QC extrem problematisch; limitierte Insertgröße (8 – 10 kb); geringe klinische Erfahrung; potenzielle Mutagenese bei Integration
Adenoviren	Hohe Transfektionseffizienz sowohl ex als auch in vivo; Transfiziert sowohl teilende als auch nicht teilende Zellen; vielfache klinische Erfahrung in der Anwendung;	Starke Immunabwehr bei wiederholter Anwendung; limitierte Insertgröße (7 - 8 kb); Herstellung, Lagerung und QC problematisch; geringe Expressionsdauer; keine genomische Integration
Kationische Lipide	Relativ leichte Herstellung, Lagerung und QC; effiziente Transfektion ex vivo; geringe Immunabwehr; hohe Sicherheit	Ineffiziente Transfektion in vivo; sehr kurze Expressionsdauer; nur geringe klinische Erfahrung; gezielte Transfektion ist kompliziert
Kondensierte DNA Partikel	Relativ leichte Herstellung, Lagerung und QC; effiziente Transfektion ex vivo; geringe Immunabwehr; hohe Sicherheit; gezielte Transfektion bereits gezeigt	Ineffiziente Transfektion in vivo; sehr kurze Expressionsdauer; geringe klinische Erfahrung
Naked DNA	Relativ leichte Herstellung, Lagerung und QC; kaum Immunantwort; bereits erfolgreiche klinische Anwendung; sehr geringe Risiken	Sehr ineffiziente Transfektion in und ex vivo; sehr kurze Expressionsdauer in den meisten Geweben; geringe klinische Erfahrung

1.4 Produktion von Plasmid DNA

1.4.1 Upstream Processing

Die Produktion von pDNA in pharmazeutischer Qualität lässt sich in drei Stadien unterteilen (Abbildung 1.6):

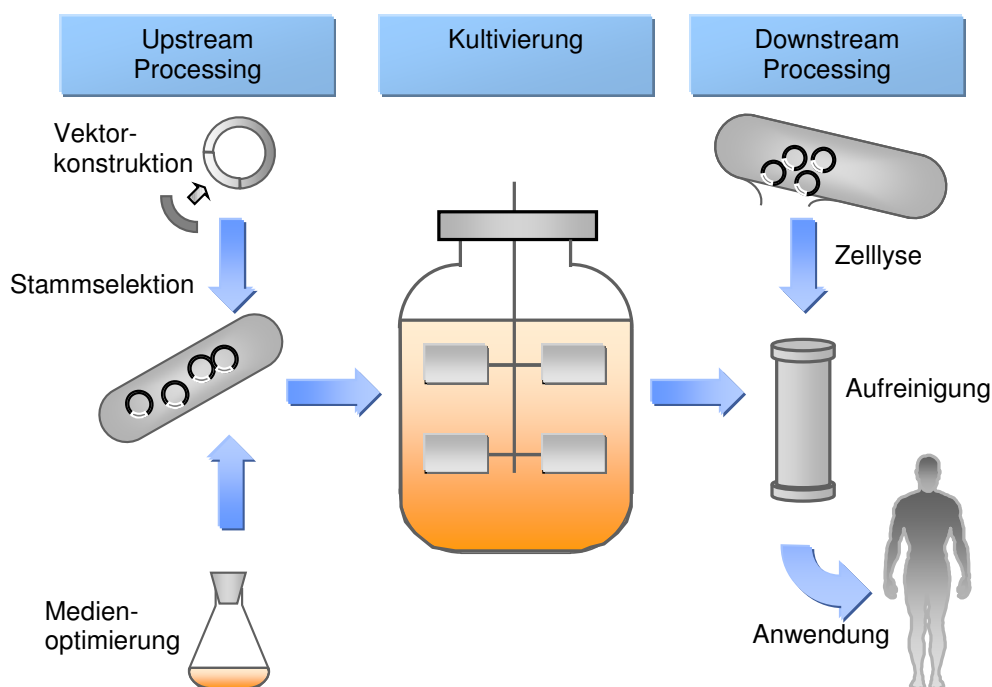


Abbildung 1.6: Die drei Stadien der Plasmidproduktion (nach Ferreira et al. 2000)

Das Upstream Processing zur Herstellung von Plasmid-DNA beginnt bereits mit der Stammwahl und der Konstruktion des Vektors, der der eigentliche Träger der therapeutischen Gene ist. Bei den verwendeten Bakterienstämmen, in denen der Vektor transformiert wird und in denen auch schließlich die Vermehrung stattfindet, handelt es sich in der Regel um *E. coli* Stämme (z. B. K12, DH5 α). Diese sind einerseits gut beschrieben und haben andererseits als Organismus der Sicherheitsstufe S1 bislang keinerlei gefährliches Potential aufgewiesen (Varley *et al.* 1999). Neben Sicherheitsfragen werden bei der Stammoptimierung Parameter wie Wachstumsraten und auch Bildungsraten von Kontaminanten (Endotoxine,

Proteine, RNA, etc.) berücksichtigt. Zur Erzielung hoher Plasmidkopienzahlen, die abhängig von der Plasmidgröße über 1000 betragen können, ist die Wahl geeigneter High copy Plasmide wichtig, was unter anderem durch das Plasmidbackbone festgelegt wird. Daneben hat sich gezeigt, dass auch die Wahl des Kultivierungsmediums ausschlaggebend für die erreichte Kopienzahl ist (O'Kennedy *et al.* 2000).

Erschwerend kommt bei der Kultivierung hinzu, dass auf Empfehlung der FDA (Food and Drug Administration) und WHO (World Health Organization) möglichst auf Resistenzfaktoren im Plasmidbackbone verzichtet werden sollte (FDA 1996). Dies hat zur Folge, dass spezielle Bedingungen zur Vermeidung des Plasmidverlustes während der Kultivierung geschaffen werden müssen (Schleef 1999).

1.4.2 Downstream Processing

Das dritte Stadium im Rahmen der Plasmidproduktion ist das Downstream Processing. Eine Auswahl an Verfahren für die Aufreinigung von pDNA ist in der Abbildung 1.7 dargestellt.

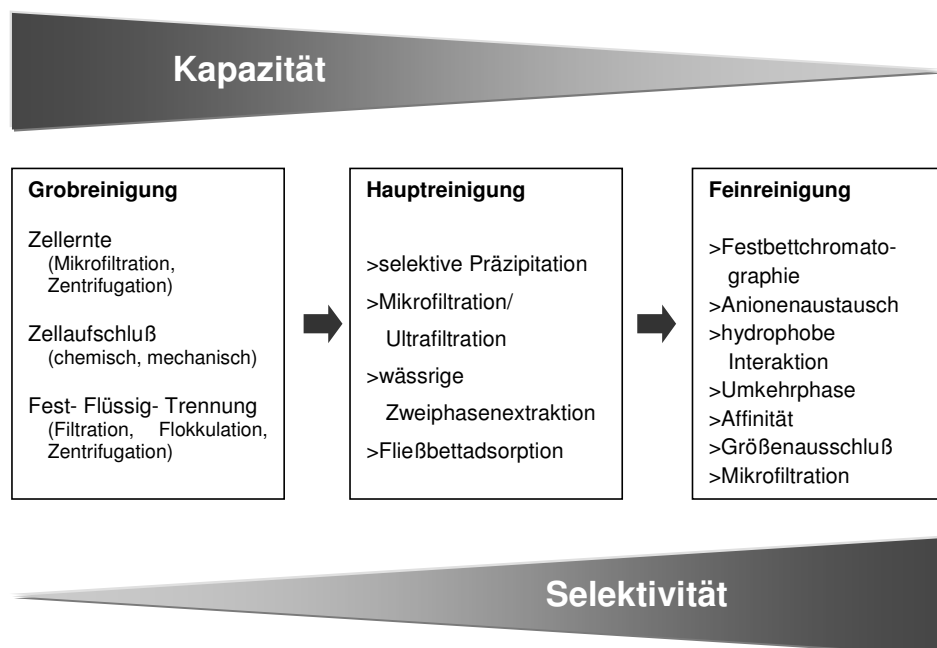


Abbildung 1.7: Generelle Verfahrenswege für das Downstream Processing von pDNA (Ferreira 2005)

Typischerweise nimmt beim Prozeß die Kapazität mit jeder Reinigungsstufe ab, während die Selektivität zunimmt. Das Downstream Processing beginnt nach der Kultivierung mit der Ernte der Biomasse, die durch Zentrifugation oder Filtration erfolgen kann. Im Anschluß erfolgt der Zellaufschluß, der im folgenden Kapitel erläutert wird.

1.4.3 Alkalische Lyse

Der erste kritische Schritt im Downstream Processing von pDNA ist die Zelllyse. Mechanische Aufschlußverfahren (Homogenisation, Kugelmühle) führen aufgrund der hohen Scherkräfte zur Fragmentierung von pDNA und können daher nicht angewendet werden (Levy *et al.* 1999; Chamsart *et al.* 2001). Abgesehen von thermischen Lyseverfahren (Holmes und Quigley 1981; Zhu *et al.* 2005) wird in den allermeisten Prozessen eine alkalische Lyse eingesetzt, die auf der Methode von Birnboim und Doly (1979) basiert (Abbildung 1.8). Sie beginnt mit dem vollständigen Resuspendieren der meist gefrorenen Biomasse in P1 Puffer (50 mM Tris/Cl, 10 mM EDTA, pH 8), woran sich die Zugabe des Lysepuffers (200 mM NaOH und 1 % w/v SDS) anschließt. Dabei bewirkt das starke anionische Detergenz SDS eine Denaturierung und Solubilisierung der Membranproteine, wodurch die Zellen aufgeschlossen werden. Bei diesem Schritt werden alle intrazellulären Komponenten wie pDNA, RNA, chromosomale DNA (gDNA) und Proteine freigesetzt, welche infolge der stark alkalischen Bedingungen denaturiert werden. Nach angemessener Inkubationszeit (meist 5-10 min) wird der Ansatz mit einem 3M Kaliumacetatpuffer (pH 5,5) neutralisiert, was eine sofortige Ausbildung eines Präzipitats zur Folge hat. Dieser besteht hauptsächlich aus Zellwandbestandteilen und denaturierten Proteinen, die als Kaliumdodecylsulfat-Komplex (KDS-Komplex) ausfallen. Infolge der hohen Salzkonzentration kommt es darüber hinaus zur Kopräzipitation denaturierter gDNA und hochmolekularer RNA. Plasmide hingegen renaturieren während der Neutralisation (siehe auch 4.4) und werden im Zentrifugationsüberstand vom Präzipitat abgetrennt.

Die technische Herausforderung ist hierbei die möglichst vollständige Freisetzung intakter supercoiled DNA, was mit zunehmender Plasmidgröße jedoch erschwert wird (Prazeres *et al.* 1999). Im großen Maßstab ist vor allem die Zugabe des Lysepuffers kritisch, da zur Vermeidung von lokalen pH Extrema, die zur irreversiblen Denaturierung von pDNA führen können, eine schnelle Vermischung

erforderlich ist. Die relativ hohe Viskosität bei auftretender Lyse erschwert zudem die vollständige Vermischung, weshalb der Lysevorgang meist in kleinen Ansätzen durchgeführt wird. Eine Alternative hierzu ist die kontinuierliche alkalische Lyse, die z. B. mit statischen Mischern durchgeführt werden kann (Wan *et al.* 1998; Urthaler *et al.* 2004).

Ebenfalls kritisch ist die Vermischung während der Neutralisation, bei der auftretende Scherkräfte zur Bildung schwer abtrennbarer Fragmente der gDNA führen können (Ciccolini *et al.* 1999; Levy *et al.* 1999; Levy *et al.* 1999). Eine unzureichende Durchmischung hingegen führt zur verringerten Plasmidfreisetzung und durch inhomogene Neutralisationsbedingungen folglich zur unvollständigen Renaturierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine möglichst scherarme Durchmischung durch manuelles Schwenken der Lyseflasche gewährleistet, wie es auch beim Referenzprozeß erfolgt (1.4.4).

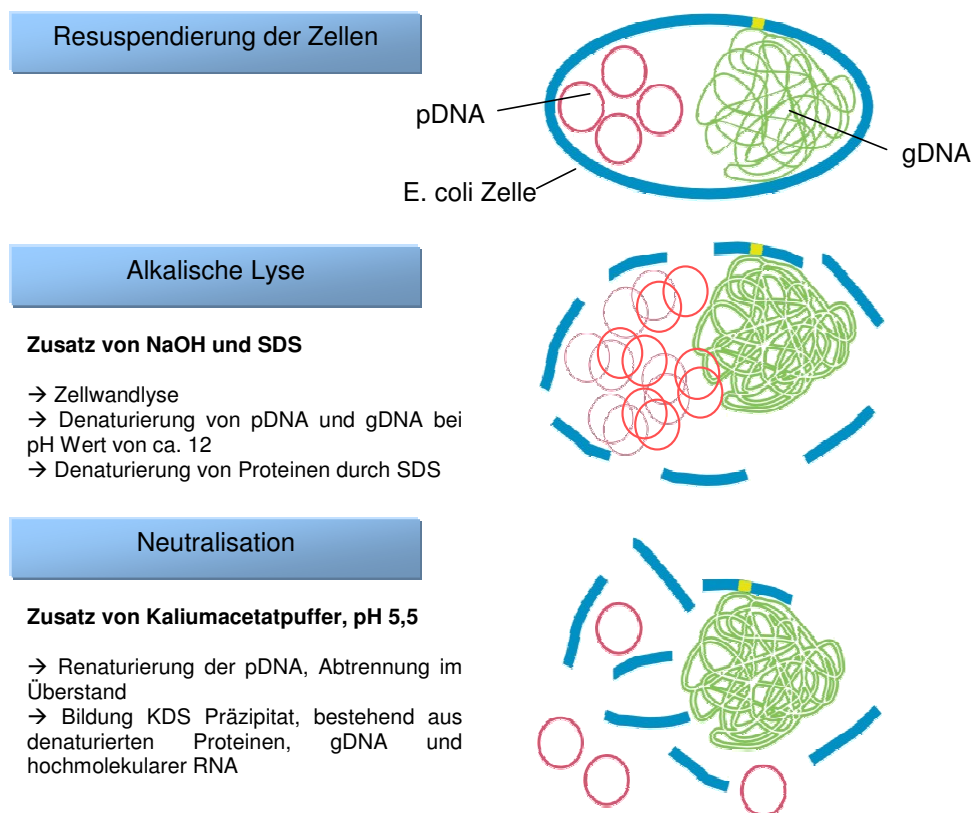


Abbildung 1.8: Prinzip der alkalischen Lyse

1.4.4 Referenzverfahren zur Plasmidaufreinigung

Als Referenz für das entwickelte Extraktionsverfahren gilt in diesem Projekt das etablierte RNase freie Aufreinigungsverfahren von QIAGEN, das zur Plasmidaufreinigung im Grammaßstab eingesetzt werden kann. Der Prozeß (Abbildung 1.9) beginnt mit einer Batchkultivierung eines auf Plasmidproduktion optimierten *E.coli* Stammes, bei der durch eine spezielle Prozeßführung auf Antibiotika verzichtet werden kann. Nach Abschluß der Kultivierung wird die Biomasse durch Batch-Zentrifugation geerntet und entweder sofort weiterverwendet oder bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Das eigentliche Downstream Processing beginnt mit der Resuspendierung der Biomasse zu einer Konzentration von 7,5 % w/v in P1 Resuspendierungspuffer in 5 L Flaschen. Hieran schließt die alkalische Lyse mit einem Volumenteil P2 Lysepuffer und 10 Minuten Inkubation an. Um eine möglichst scherarme Durchmischung zu gewährleisten, wird der Inhalt der Flaschen durch manuelle, rotierende Schüttelbewegungen vermischt. Zur Neutralisation wird ein Volumenteil 4 °C kalter P3 Puffer (3M Kaliumacetat, pH 5,5) zugegeben und wie bei der Lyse ebenfalls vorsichtig durchmischt. Durch Anlegen eines Vakuums flotierte das Zellpräzipitat auf, was zu einer groben aber effektiven und scherarmen Abtrennung der festen Bestandteile führt. Nach anschließender Entfernung restlicher Partikel durch Tiefenfiltration wird die Leitfähigkeit des geklärten Lysates auf optimale Bindungsbedingungen (80 mS/cm) eingestellt und anschließend auf eine equilibrierte Chromatographiesäule geladen. Hierbei handelt es sich um eine Anionenaustauschermatrix mit DEAE (Diethylaminoethanol) Ligand auf einer Silikamatrix, die über eine sehr gute Trennleistung zwischen DNA und RNA verfügt. Darüber hinaus ermöglicht sie aufgrund einer speziellen Formulierung des Beladungspuffers eine vollständige Endotoxineliminierung. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Elution der gereinigten pDNA unter Hochsalzbedingungen. Der Aufreinigungsprozeß endet mit einer Umpufferung sowie Konzentrierung mittels UF/DF in einem Hohlfasermodule mit einer Ausschlußgröße von 100 kDa.

Zu den Nachteilen des beschriebenen Verfahrens zählt die Tatsache, dass das Chromatographiematerial über keinen selektiven Abreicherungseffekt von gDNA oder ocDNA verfügt.

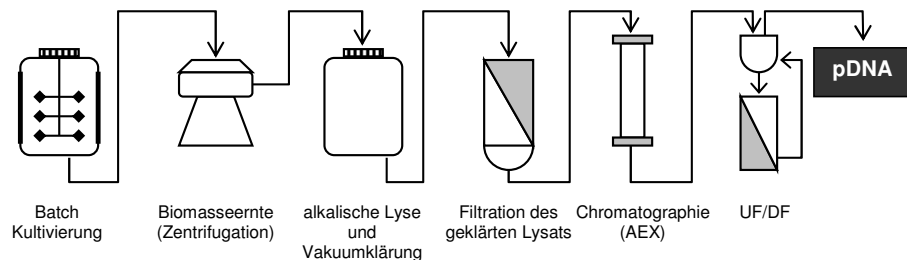


Abbildung 1.9: Verfahrensfließbild der RNase- freien Plasmidaufreinigung bei QIAGEN

1.4.5 Weitere Aufreinigungsverfahren

Wie im QIAGEN-Prozeß, ist die Flüssigchromatographie in den meisten Prozessen zur Aufreinigung von pDNA das zentrale Aufreinigungsverfahren. Anionenaustauschchromatographie zählt dabei zu den am häufigsten eingesetzten Bindungstechniken (Prazeres *et al.* 1998), wofür zahlreiche stationäre Phasen erhältlich sind. Sie basiert auf der Interaktion zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Backbones mit den kationischen Liganden der stationären Phase. Mithilfe eines Salzgradienten werden die Nukleinsäuren von der Matrix verdrängt (Abbildung 1.10), wobei die Elutionsreihenfolge unter anderem eine Funktion der Kettenlänge und der Konformation der Nukleinsäuren ist. Aufgrund ähnlicher Bindungsaffinitäten von pDNA, pDNA Isomeren, hochmolekularer RNA, gDNA und Endotoxinen haben viele stationäre Anionentauscherliganden eine nicht ausreichende Trennleistung, um scDNA in einem Schritt aufzureinigen (Diogo *et al.* 2005). Im Fall der gDNA wird die Trennung besonders dann erschwert, wenn während der alkalischen Lyse Fragmente mit plasmidähnlicher Größe generiert wurden. Eine Verbesserung der RNA-Abtrennung kann durch vorherige Zugabe von RNase erfolgen, was jedoch aufgrund des tierischen Ursprungs aus regulatorischer Sicht unerwünscht ist (Ferreira *et al.* 2000). Um dennoch die geforderte Reinheit zu erreichen, müssen in der Regel zusätzliche Aufreinigungsschritte durchgeführt werden.

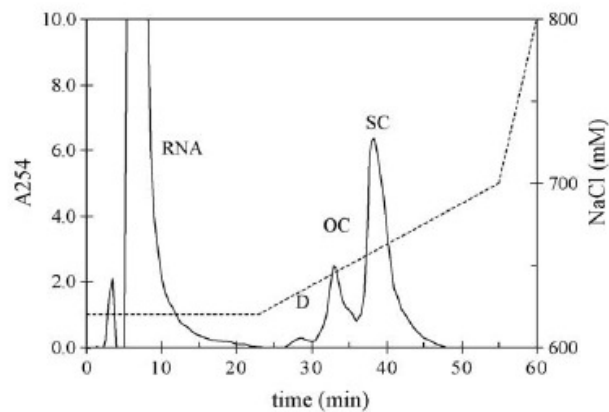


Abbildung 1.10: Typische Plasmidaufreinigung mit Anionenaustauschchromatographie in einer 1ml Q-Sepharose Säule (5 cm x 0,5 cm); Flußrate: 1 ml/min, Beladung: 1 ml geklärtes Lysat (RNase behandelt) mit 22 µg pDNA (2,7 kb), Wasch- und Elutionspuffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 mit NaCl in Konzentrationen der gestrichelten Linie; Peaks entsprechen scDNA (SC), ocDNA (OC) und denaturierte pDNA (D) (aus Prazeres *et al.* 1998)

Ein weiteres Trennverfahren, das ebenfalls häufig zur Plasmidaufreinigung eingesetzt wird, ist die hydrophobe Interaktionschromatographie (Diogo *et al.* 2000; Diogo *et al.* 2000). Diese Aufreinigung basiert auf den unterschiedlichen Hydrophobizitäten der Nukleinsäuren und ermöglicht eine sehr gute, RNase freie Trennung zwischen pDNA und RNA. Im Gegensatz zur Ionenaustauschchromatographie erfolgt die Beladung der Säule unter hoher Ionenstärke kosmotroper Salze (häufig 1,5 M Ammoniumsulfat) und die Elution mit abnehmender Salzkonzentration (siehe auch 2.5.1). Bei Beladungen mit höheren Salzkonzentrationen konnte zudem gezeigt werden, dass eine Trennung zwischen gDNA sowie ocDNA von scDNA möglich ist (Diogo *et al.* 2005). Ein weiteres Verfahren, das selektive Aufreinigung von scDNA ermöglicht, ist die thiophile Interaktionschromatographie (Lemmens *et al.* 2003). Ähnlich wie bei der HIC erfolgt hierbei die Beladung der Säule unter Hochsalzbedingungen, wobei eine selektive Adsorption der supercoiled Konformation an den aromatischen Thioetherliganden erreicht wird.

Im Gegensatz zur Aufreinigung mit einer stationären Phase erfolgt bei der Gegenstromextraktion die Trennung aufgrund unterschiedlicher Verteilung in zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen, wobei sowohl organisch-wässrige als auch wässrige Zweiphasensysteme eingesetzt werden können. Hierzu zeigt

eine Arbeit von Kendall et al. (2001), dass auch ocDNA und scDNA, die in Phasensystemen eine sehr ähnliche Verteilung zeigen, durch zahlreiche im Gegenstrom erfolgenden Extraktionen voneinander getrennt werden können.

Ein Plasmidaufreinigungsprozeß, welcher nicht auf chromatographischen Methoden beruht, wird von Merck & Co., Inc. (USA) eingesetzt (Lander *et al.* 2002). Dieser basiert auf der fraktionierten Fällung von pDNA bzw. der Kontaminanten mit dem kationischen Detergenz CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), welche auch eine Abtrennung von Endotoxinen und Plasmid-Isoformen ermöglicht. Da die selektive Präzipitation bei relativ niedrigen Ionenstärken erfolgen muß, wird anstatt der alkalischen eine enzymatische Lyse gewählt, die bei vergleichsweise geringen Salzkonzentrationen erfolgt.

1.4.6 Regulatorische Anforderungen

Falls die aufzureinigende pDNA als pharmazeutisches Produkt angewendet werden soll, gelten sowohl für die Herstellung als auch für die Reinheit vom Endprodukt besondere Regelungen, die von nationalen und internationalen Gesundheitsbehörden festgelegt und überwacht werden. So wie bei allen pharmazeutischen Produkten, die Menschen oder Tieren verabreicht werden, unterliegt die Herstellung von pDNA den Anforderungen des Good Manufacturing Practices (GMP), welche von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA 1991) und der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) festgelegt wurde. Dieses GMP-Regelwerk behandelt sämtliche Schritte der Produktion, von der Auswahl und Kontrolle der Rohstoffe und Materialien bis hin zur Verpackung und zum Transport der finalen Produkte zum Einsatzort. Ein wichtiger Bestandteil im GMP-Verfahren ist die Prozeßvalidierung. Diese ist eine aufwendige Dokumentation zum Beweis, dass der gesamte Prozeß innerhalb bestimmter Grenzen über die gesamte Produktionslaufzeit eine gleichbleibende Produktspezifikation liefert. So muß z. B. gezeigt werden, dass ein Prozeß zu einer konsistenten Abreicherung von Kontaminanten führt.

Darüber hinaus gibt es hohe Anforderungen, die die geforderte finale Reinheit der pDNA-Präparation betreffen. Je nach Anwendungsgebiet können sich die

geforderten finalen Spezifikationen für pDNA unterscheiden. Eine gängige Richtlinie, die in Anlehnung an den Vorgaben der FDA und der WHO auch von QIAGEN eingehalten wird, zeigt Tabelle 1.2. Eine Überschreitung vorgegebener Reinheiten kann bei der therapeutischen Anwendung zu Sicherheitsrisiken führen. Bedenken im Zusammenhang mit gDNA sind auf eine mögliche Beeinflussung von Onkogenen zurückzuführen (Briggs und Panfili 1991; Rigglin *et al.* 1996), obwohl die damit verbundene Tumoraktivierung als eher unwahrscheinlich gilt. Proteinkontaminationen in der finalen pDNA Präparation können zu Immunreaktionen führen und damit den Stoffwechsel der Zelle negativ beeinflussen (Briggs und Panfili 1991). Ein besonderes Gefährdungspotential geht von Endotoxinen aus, die ein wesentlicher Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien sind. Sie führen bereits in sehr geringen Mengen zu einer pyrogenen Wirkung, so dass grundsätzlich die maximale Aufnahme auf 0,5 ng pro Kg Körpergewicht und Stunde festgelegt wurde (Wicks *et al.* 1995).

Tabelle 1.2: Finale Spezifikation für pDNA

Parameter	Spezifikation	analytische Methode
Endotoxine	<10 E.U./mg pDNA	LAL Assay
gDNA	<5 – 20 µg/mg pDNA	RT- PCR
RNA	<1 – 10 µg/mg pDNA	Agarosegelelektrophorese
Proteine	<7 µg/mg pDNA	BCA Assay
scDNA/pDNA	>90 %	Agarosegelelektrophorese

Die hohen Anforderungen an den Aufreinigungsprozeß werden deutlich, wenn die Reinheitsanforderungen im zusammen mit der Zusammensetzung des Bakterienlysates betrachtet werden (Abbildung 1.11). Zum einen wird die Zusammensetzung durch Proteine und RNA dominiert, während pDNA in relativ geringen Konzentrationen auftritt. Dieses Verhältnis zwischen pDNA und den Kontaminanten muß durch eine effektive Aufreinigung so umgekehrt werden, dass die resultierende Präparation mindestens eine Reinheit aufweist, die in der Abbildung 1.11 b verdeutlicht wurde.

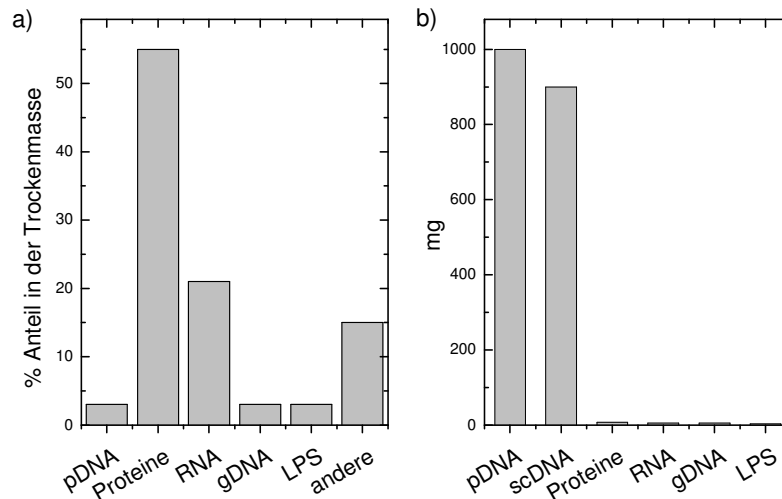


Abbildung 1.11: a) Typische Zusammensetzung der Trockenmasse vom E. coli Lysat (Shamlou 2003); b) grafische Darstellung der geforderten finalen pDNA Reinheit (siehe auch Tabelle 1.2)

1.5 Historie und Einsatzgebiete der wässrigen Zweiphasenextraktion

Die flüssig-flüssig Extraktion in wässrigen Zweiphasensystemen (engl. Aqueous Two Phase System, ATPS) ist ein Verfahren, das zur Aufarbeitung biotechnologischer Wertstoffe eingesetzt werden kann. Das Trennungsprinzip beruht auf der Tatsache, dass sich verschiedene Biomoleküle unterschiedlich in den zwei koexistierenden Phasen verteilen, wodurch eine Trennung erfolgen kann. Ziel der Verfahrensentwicklung ist es dabei, die Zusammensetzung des Phasensystems und die dazugehörigen Parameter so zu wählen, dass möglichst nur das gewünschte Produkt in die eine Phase extrahiert wird, während andere Kontaminanten in die anderen Phase verteilt werden.

Beispielsweise ist die organisch-wässrige Extraktion ein weitverbreitetes Verfahren in der chemischen Industrie. Für die Aufreinigung hochkomplexer Biomoleküle (Proteine, Nukleinsäuren, Zellen, etc.) ist sie allerdings nicht geeignet, da sie aufgrund der hohen Oberflächenspannungen z. B. zur Denaturierung von Proteinen führen kann. Im Gegensatz hierzu bieten wässrige Zweiphasensysteme sehr milde Lösungsbedingungen, die das Beibehalten der biologischen Aktivität

ermöglichen. Die erstaunliche Entdeckung, dass zwei wässrige Phasen nebeneinander koexistieren können, wurde erstmals von dem holländischen Mikrobiologen Beijerinck gemacht (1896). Dabei fand er heraus, dass Lösungen aus wasserlöslicher Stärke mit Gelatine ab einer gewissen Zusammensetzung eine Trübung aufweisen und sich in zwei ineinander unlöslichen Phasen trennen. Nachdem dieses Wissen lange Jahre mangels Anwendung in Vergessenheit geriet, wurde das Verfahren etwa 60 Jahre später von dem Schweden Per Ake Albertsson wiederentdeckt (Albertsson 1956). Nach eingehender Untersuchung des Verfahrens beschrieb er zahlreiche Anwendungen, die sich aus der Zweiphasenextraktion ergeben (Albertsson 1985). Dabei erforschte er hauptsächlich PEG/ Dextran Systeme, welche aus zwei hydrophilen aber inkompatiblen Polymeren bestehen. Ersetzt man das Dextran durch hohe Konzentrationen kosmotroper Salze wie Sulfate, Citrate oder Phosphate, so erhält man Polymer/ Salz Systeme, welche aufgrund des relativ teuren Dextrans bevorzugt für großtechnische Prozesse verwendet werden. Im Vergleich mit chromatographischen Verfahren ist ATPS meist mit geringeren Kosten verbunden. Je nach Anwendung reicht eine einfache Extraktion jedoch nicht aus, um die gewünschten Reinheiten zu erlangen, so dass mehrfache Extraktionen oder zusätzliche Aufreinigungsschritte nachgeschaltet werden müssen. Ein großer Vorteil ist jedoch die Tatsache, dass während der Extraktion ein gewisser Feststoffanteil vorhanden sein kann und somit z. B. bei Aufreinigungen aus dem Zellhomogenat eine gleichzeitige fest-flüssig Trennung möglich ist. Aus diesem Grunde eignet sich ATPS besonders als Capturing Verfahren, also zur ersten Abtrennung der größten Verunreinigungen im Aufreinigungsprozeß.

Ein kritischer Punkt bei der Verfahrensentwicklung mit ATPS ist die Abtrennung des Produktes aus der Phase nach der Extraktion. Bei einer Proteinaufreinigung aus dem Zellhomogenat ist dabei die typische Vorgehensweise, das Zielprotein zuerst in die Oberphase zu extrahieren, wobei Zelltrümmer in die Unterphase abgetrennt werden. Anschließend erfolgt dann eine Rückextraktion des Zielproteins in die Unterphase, wonach eine Entsalzung z. B. durch Ultrafiltration erfolgen kann, während eine Ultrafiltration aus der Oberphase aufgrund der hohen Viskosität (PEG) nur erschwert möglich ist.

Während wässrige Zweiphasensysteme in den Sechzigern bis Achtzigern intensiv untersucht wurden, waren Entwicklungen bis zur großtechnischen Anwendung eher die Ausnahme. Das bessere Verständnis der Extraktion (Brooks *et al.* 1985), die theoretische, modellhafte Beschreibung der Phasenausbildung und der komplexen Verteilung von Biomolekülen (Johansson *et al.* 1998; Asenjo *et al.* 2002) sowie die bessere technische Implementierung (Banik *et al.* 2003) führten in den letzten Jahren zu einem zunehmenden Interesse für ATPS, das auch aus der Industrie kam. Dies ist auch auf die Suche nach kostengünstigeren Aufreinigungsverfahren mit hohen Kapazitäten zurückzuführen, die u. a. Folge der fortschreitenden Entwicklungen im Metabolic Engineering und in der Kultivierungstechnologie ist (Hustedt *et al.* 1985; Kula 1985; Kula und Selber 1999).

1.5.1 Kurze theoretische Beschreibung

Ein wichtiges Hilfsmittel bei der Untersuchung eines Phasensystems und für die Prozeßentwicklung ist das zugehörige Phasendiagramm (Abbildung 1.12). Hierin werden auf den beiden Achsen die Konzentrationen der phasenbildenden Komponenten in Massenprozent in der wässrigen Gesamtlösung aufgetragen. Die kurvenförmige Binodale (siehe auch 2.6) zeigt den Grenzbereich der Systemzusammensetzungen der beiden Komponenten an, so dass Systeme oberhalb der Binodale inkompatibel sind und sich daher zu einem Zweiphasensystem trennen. Systeme unterhalb der Binodale trennen sich nicht und sind miteinander vollständig mischbar. Phasensysteme, deren Zusammensetzungen sich auf einer Konode befinden, haben eine identische Zusammensetzung der jeweiligen Ober- bzw. Unterphase. Die Zusammensetzung des Phasensystems mit der Zusammensetzung P kann durch die beiden Schnittpunkte O und P der betreffenden Konode mit der Binodale bestimmt werden. Somit hat das Phasensystem P, bestehend aus etwa 25 % w/w PEG und 19 % w/w Kaliumphosphat, eine Zusammensetzung der Oberphase von etwa 50 % w/w PEG und 2 % w/w Kaliumphosphat (Schnittpunkt O), während die Unterphase etwa 1 % w/w PEG und 37 % w/w Kaliumphosphat (Schnittpunkt U) enthält. Damit enthält die Oberphase hauptsächlich PEG, während die Unterphase mit der Salzkomponente angereichert ist. Das Absetzen der Phasen ist auf die höhere

Dichte der salzreichen Unterphase zurückzuführen, wobei hohe Dichteunterschiede und geringe Viskositäten der beiden Phasen ausschlaggebend für eine hohe Absetzgeschwindigkeit sind.

Die Punkte O, P und U geben darüber hinaus Auskunft über das Volumenverhältnis der beiden Phasen. Befindet sich die Phasenzusammensetzung nahe am Punkt O, so enthält das System insgesamt mehr PEG, weshalb das Volumen der Oberphase zunimmt und umgekehrt. Dadurch ergibt sich aus dem Streckenverhältnis PO/PU das Volumenverhältnis $V(\text{Unterphase})/V(\text{Oberphase})$.

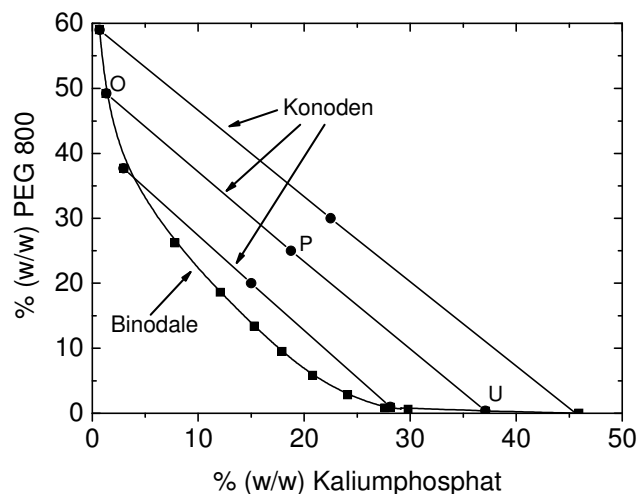


Abbildung 1.12: Phasendiagramm vom PEG 800- Kaliumphosphat-system (pH 7,4; Raumtemperatur)

Die Verteilung von Substanzen in wässrigen Zweiphasensystemen gilt als sehr komplex (Albertsson 1985; Brooks *et al.* 1985) so dass eine umfassende modellhafte Beschreibung sehr schwierig ist. Sie beruht auf der differentiellen Energie bei der Interaktion von Partikel und Makromolekülen wie Proteine oder Nukleinsäuren mit den phasenbildenden Komponenten (Albertsson 1985). Betrachtet man die Verteilung einer Substanz im Zweiphasensystem, so stellt sich im Gleichgewicht ein bestimmtes Verhältnis der Konzentrationen in Ober- und Unterphase ein, welches durch den Verteilungskoeffizienten wiedergegeben wird (Gleichung 1-1).

$$k_i = \frac{C_{iO}}{C_{iU}}$$

Gleichung 1-1

Der Verteilungskoeffizient k_i der Substanz i hängt von der Grenzflächenspannung λ im wässrigen Zweiphasensystem ab. Diese Grenzflächenspannung wiederum steht im Zusammenhang mit den unterschiedlichen freien Energien der Substanz i in der Wechselwirkung mit den Polymersegmenten, die das Phasensystem ausbilden. Diese kann mit der Broenstedtgleichung (Gleichung 1-2) beschrieben werden:

$$\ln k_i = \frac{\lambda \cdot A_i}{k \cdot T}$$

Gleichung 1-2

Anhand dieser Gleichung können einige Eigenschaften der Verteilung qualitativ abgeleitet werden:

1. Der Verteilungskoeffizient hängt exponentiell von den relevanten Parametern des Phasensystems (λ) und dem verteilten Material (A) ab.
2. Die Verteilung wird mit zunehmender Größe bzw. mit steigendem Molekulargewicht der betrachteten Substanz einseitig. Für intakte Zelle oder andere große Partikel ergeben sich somit k_i – Werte von nahe 0 bzw. unendlich. Lösliche Proteine zeigen einen Verteilungskoeffizient meist zwischen 0,01 und 100, während niedermolekulare Bestandteile der Zellen k_i – Werte um 1 aufweisen.
3. Die Verteilung wird mit zunehmender Länge der Konode (tieline length) einseitig (d. h. λ nimmt zu)

1.5.2 Veröffentlichungen zur Plasmidaufreinigung mittels wässriger Zweiphasenextraktion

Bislang ist die Anzahl der Veröffentlichungen zur pDNA Aufreinigung mittels wässriger Zweiphasensysteme verhältnismäßig gering.

Eine erste Anwendung zur Aufreinigung von pDNA aus geklärtem Lysat in PEG Dextransystemen geht auf die Publikation von Ohlsson et al. zurück (1978), während eine Aufreinigung in PEG/ Salz Systemen erstmals von Cole et. al. (1991) beschrieben wurde. Ribeiro et al. (2002) veröffentlichten eine detailliertere Studie mit PEG/ Kaliumphosphatsystemen zur Vorreinigung von pDNA im geklärten Lysat. Dabei wurden PEG-Molekulargewichte und auch die Beladung mit geklärtem Lysat variiert, wobei ein System bestehend aus PEG 600 mit 40 % geklärtem Lysat mit einer Ausbeute von 42 % den besten Aufreinigungseffekt zeigte. Kepka et. al (2004) untersuchten die Aufreinigung in einem thermoseparierenden Phasensystem, das ebenfalls zur Vorreinigung diente. Hierzu konnte in einem System, bestehend aus dem Copolymer EO₅₀PO₅₀ (50 % Ethylenoxid – 50 % Propylenoxid) und Dextran T500, etwa 80 % der RNA und 53 % der Proteinfraction von der gesamten pDNA abgetrennt werden. Nach anschließender Erhitzung der pDNA-haltigen Oberphase auf 55 °C kam es zu einer erneuten Ausbildung von zwei Phasen, die aus einer polymerreichen und einer polymerarme Phase bestanden. Die pDNA konnte dabei vollständig in der polymerarmen Phase abgetrennt werden. Nachteil dieses Verfahrens ist die notwendige Entsalzung des geklärten Lysates vor der Extraktion mittels Gelfiltration.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit der QIAGEN GmbH in Hilden durchgeführt. Dieses Biotechnologieunternehmen hat sich unter anderem auf die Aufreinigung von Nukleinsäuren und auf die Vermarktung von Aufreinigungssystemen spezialisiert. Zusammen mit der Abteilung Contract Manufacturing & Process Development von QIAGEN wurde im Rahmen einer

Diplomarbeit eine Machbarkeitsstudie durchgeführt (Frerix 2002), die sich mit der Aufreinigung von Plasmid DNA (pDNA) durch Extraktion im wässrigen Zweiphasensystem beschäftigte. Darauf aufbauend sollte in der anschließenden Dissertation ein vollständiger Prozeß entwickelt werden, der Plasmid DNA in möglichst hoher Reinheit liefert und zudem skalierbar ist. Ziel war dabei, ein Verfahren zu generieren, das hinsichtlich Plasmidausbeute und Plasmidqualität eine mögliche Alternative bzw. Ergänzung zu der derzeit eingesetzten Aufreinigungsmethode bei QIAGEN ergibt (siehe 1.4.4). Dieses Interesse war vor allem darin begründet, dass Prozesse mit wässriger Zweiphasenextraktion allgemein als kostengünstig gelten und zudem leicht skalierbar sind. Neben der Verfahrensentwicklung war geplant, die Verteilung der Plasmid DNA und der Kontaminanten im wässrigen Zweiphasensystem genauer zu untersuchen, um weitere Selektivitäten der Extraktion zu finden. In einem vergleichenden Versuch sollte der Extraktionsprozeß dem QIAGEN Verfahren gegenübergestellt und hinsichtlich Plasmidausbeute und Plasmidqualität beurteilt werden. Zudem war geplant, die Plasmidextraktion als Verfahren für Kit-Anwendungen zu prüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.1: Verwendete Phasenkomponenten

Hersteller	Qualität	Produkt
Merck	zur Synthese	Polyethylenglykol 600 und 1000
Merck	DAB	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
Merck	DAB	di- Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)

Tabelle 2.2: Pufferzusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
TE	10 mM Tris·Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA
Puffer P1 (Resuspendierungs Puffer)	50 mM Tris·Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA
Puffer P2 (Lyse Puffer)	200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v)
Phosphatpuffer 1000 g; pH 7,4; 50 % (w/w)	333,3 g K_2HPO_4 , 166,6 g KH_2PO_4 , 500 g H_2O

Tabelle 2.3: Zusammensetzung PEG Stammlösung

Mw(PEG)	Zusammensetzung
800 (1000g, 75 % w/w)	285 g PEG 600 465 g PEG 1000 250 g H_2O

Da Polyethylenglykole mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 600 und 1000 gewöhnlich nicht erhältlich sind, wurden Mischungen aus PEG 600 und PEG 1000 angesetzt. Die jeweiligen PEG-Anteile wurden so gewählt, dass die resultierende durchschnittliche OH- Zahl in der Mischung der Zusammensetzung

eines homogenen PEG's mit gewünschtem Molekulargewicht (Mw) entspricht (Hoechst 1992).

Die entsprechenden PEG-Anteile für die Mischungen zeigt Abbildung 2.1:

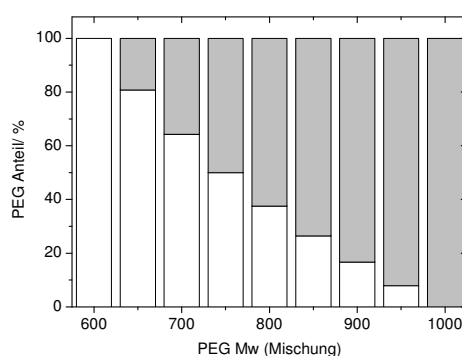


Abbildung 2.1: Gewichtsanteile von PEG 600 (weiß) und PEG 1000 (grau) in PEG-Mischungen mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 600 und 1000 Da.

2.2 Nukleinsäuren und Biomasse

Die für die Versuche eingesetzten Nukleinsäuren (Tabelle 2.4) sowie die Feuchtbio­masse von *E. coli* DH5 α wurden von der Fa. QIAGEN GmbH (Hilden) zur Verfügung gestellt. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

Tabelle 2.4: Konzentrationen der Nukleinsäure- Stammlösungen

Nukleinsäure	Konzentration der Stammlösung
Plasmid pCMV β	1 mg/ml in TE
RNA aus <i>E. coli</i>	2,8 mg/ml in TE
gDNA aus <i>E. coli</i>	0,49 mg/ml in TE

2.3 Ansatz von Phasensystemen

2.3.1 Ansätze ohne Biomasse

In gespikten (artificialen) Phasensystemen ohne Biomasse wurden Stammlösungen von PEG (75 % w/w), Kaliumphosphat (50 % w/w) sowie Wasser und Nukleinsäuren nacheinander in graduierte Reaktionsgefäße eingewogen, durch mehrmaliges Invertieren gründlich vermischt und anschließend für 5 min bei 2000g abzentrifugiert. Nach Volumenbestimmung und Entnahme von Proben aus Ober- und Unterphase erfolgte die Analytik.

2.3.2 Ansätze mit Biomasse

Bei Ansätzen mit *E. coli* Biomasse erfolgte vor der eigentlichen Zwei-Phasentrennung eine alkalische Lyse, die die Freisetzung der Plasmid-DNA aus der Zelle bewirkte. Der prinzipielle Vorgang wird am Beispiel eines Systems mit 15 % PEG 800, 20 % Phosphat mit einem Gesamtgewicht von 5 g gezeigt:

Resuspendierung der Biomasse:

Die Aufreinigung begann mit der Resuspendierung der *E. coli* Biomasse, die nach der Kultivierung meistens im gefrorenen Zustand vorlag. Die gefrorene Biomasse wurde in P1 Resuspendierungspuffer zu einer Gesamtkonzentration von 10 % w/w eingewogen und so lange bei Raumtemperatur vermischt, bis eine völlig homogene Lösung vorlag (je nach Menge 30-120 min). Bis zur eigentlichen Verwendung erfolgte die Lagerung auf Eis.

Alkalische Lyse und Extraktion:

Nachfolgende Schritte wurden in graduierten 5 ml Reaktionsröhrchen mit Stopfen durchgeführt².

- 1 ml resuspendierte Biomasse (10 % w/w) mit

- 1 ml P2 Lysepuffer

→ vermischen, 5-mal invertieren, 5 min Inkubation bei RT

- 2 g Kaliumphosphatpuffer (50 % w/w, RT) zugeben

- 1 g PEG 800 (75 % w/w) zugeben und vollständig vermischen

² Da die Dichte der resuspendierten Biomasse und des P2 Lysepuffers näherungsweise 1 g/ml beträgt, wurden diese volumetrisch zugegeben.

→ 5 min bei 2000g zentrifugieren, Volumen der Unterphase bestimmen und anschließend abnehmen

2.3.3 Plasmidpräparation im Mikrogramm-Maßstab

Für die Plasmidpräparation im kleinen Maßstab wurde folgender Ansatz im 2 ml Reaktionsgefäß verwendet:

400 µl resuspendierte Biomasse (10 % w/w *E. coli* mit pCMVβ)

400 µl P2 Lysepuffer

→ vermischen und 5 min inkubieren

475 µl Kaliumphosphatpuffer (50 % w/w; pH 7.4, entspricht ca. 700 mg)

400 µg PEG 800 (75 % w/w)

→ vermischen und 3 min bei 3000 g zentrifugieren

→ Abnahme der Unterphase (ca. 800 µl) und Filtration mittels 96well Nylonfilterplatte, Waschen (300 µl 80 % Isopropanol) und Elution (200 µl TE)

2.4 Versuch zur Maßstabsvergrößerung

2.4.1 Durchführung des Referenzverfahrens

Als Standardverfahren diente der QIAGEN-Prozeß mit einer Ultrapure 100 Chromatographiesäule, der unter 1.4.4 beschrieben wurde.

2.4.2 Durchführung der wässrigen Zweiphasenextraktion

Für den Versuch zur Maßstabsvergrößerung wurden Grobreinigung mittels ATPS (4.1), reversible Membranadsorption (4.3) und Feinreinigung mittels ATPS (4.4) miteinander kombiniert. Das Capturing (Abbildung 2.2) wurde in einer 5 L Flasche durchgeführt, wobei die Vermischung wie beim Referenzprozeß durch scherarme, manuelle Schüttelbewegungen erfolgte. Durch Zugabe der PEG-Stammlösung mit einer Temperatur von etwa 60 °C wurde während der Extraktion eine Mischtemperatur von etwa 30 °C erreicht. Hierbei wurde erst nach Zugabe vom Phosphatpuffer und PEG die Neutralisation durch Vermischen eingeleitet. Zur Abtrennung der Unterphase dienten 5 x 1L Zentrifugenbechern, in denen bereits bei relativ geringen Drehbeschleunigungen (5 min bei 3000g) ein vollständiges Absetzen der Phasen erfolgte. Zur Abnahme der Unterphasen aus den Zentrifugenbechern wurden spezielle Deckel mit Belüftungsrohr und Abbläbventil

eingesetzt. Die so gepoolten Unterphasen wurden zur Entsalzung durch eine Nylonmembrankapsule mit einer Filterfläche von 1000 cm² vollständig gepumpt und durch Filtration von 80 % v/v Isopropanol gespült. Durch weitere Filtration von P1 Resuspendierungspuffer wurde die pDNA von der Membran gelöst und im Eluat aufgefangen.

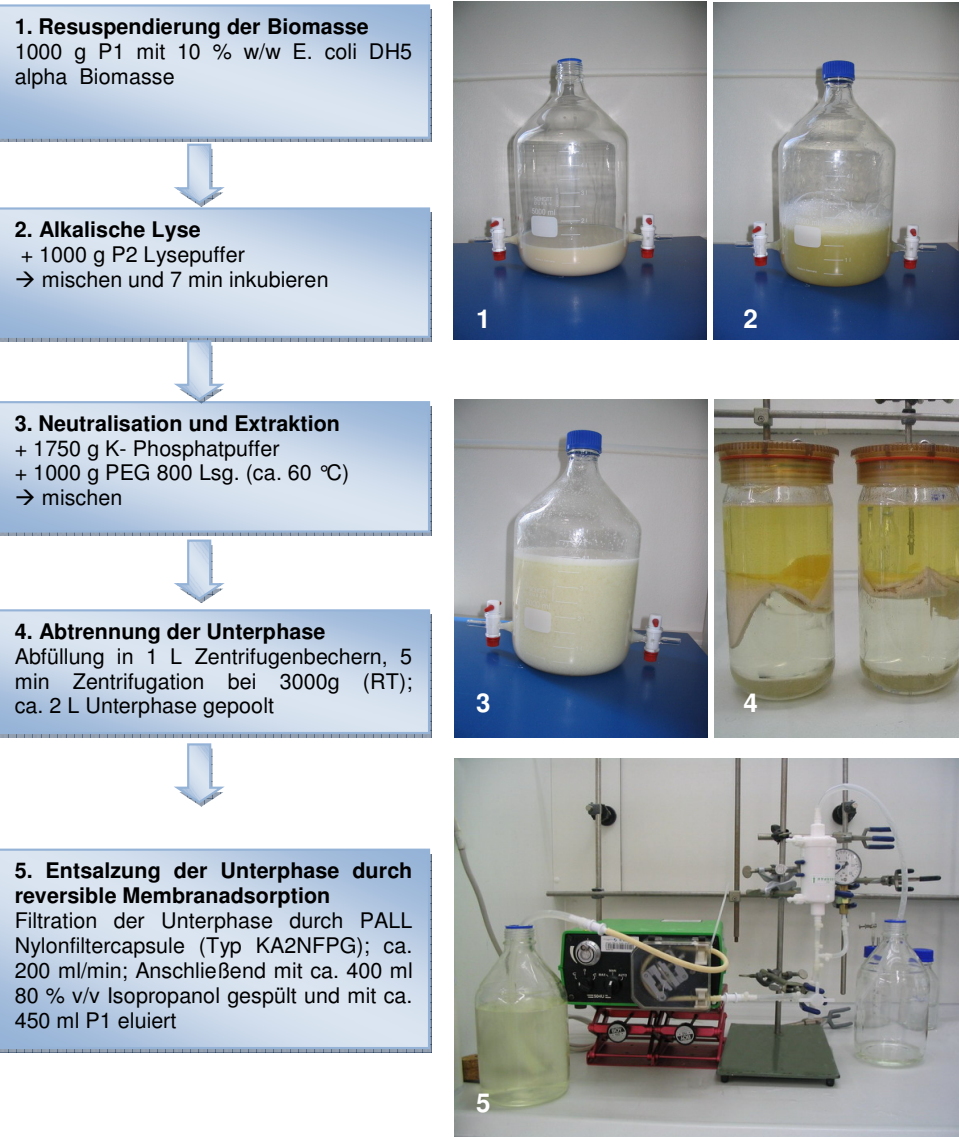


Abbildung 2.2: Grobreinigung mittels ATPS und Entsalzung

Im Anschluß erfolgte Feinreinigung mittels ATPS, die in der Abbildung 2.3 dargestellt wurde. Hierzu wurde durch Zugabe von NaOH zum Eluat eine alkalische Denaturierung durchgeführt und mit K-Phosphatpuffer und PEG Lösung neutralisiert und extrahiert. Die Abtrennung der Unterphase erfolgte ebenfalls durch Zentrifugation in 2 x 1L Zentrifugenbechern, die anschließend gepoolt und mittels UF/DF entsalzt und konzentriert wurde.

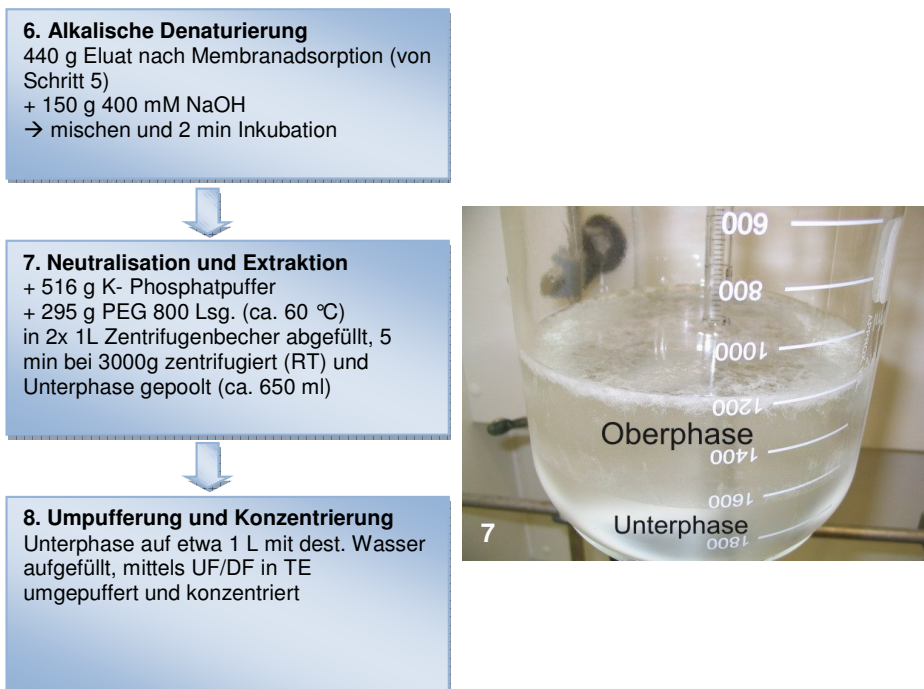


Abbildung 2.3: Feinreinigung mittels ATPS

2.5 Nukleinsäureanalytik

Zu Beginn der Arbeit stand die Etablierung einer Nukleinsäureanalytik im Vordergrund:

2.5.1 HPLC

Zur schnellen Quantifizierung von pDNA, RNA sowie weiteren Verunreinigungen wurde eine Trennung der Nukleinsäuren durch eine Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC) eingesetzt, die in Anlehnung an der Arbeit von Diogo et al. (2003) weiterentwickelt wurde. Zum Einsatz kam eine HP 1090 HPLC (Agilent, Waldbronn) zusammen mit der HIC-Trennsäule SOURCE 15 PHE 4.6 (GE-Healthcare, Freiburg). Folgende Tabelle 2.5 listet die verwendeten Parameter auf:

Tabelle 2.5: Parameter für HPLC-Analytik

HPLC	HP 1090, Agilent
Trennsäule	SOURCE 15PHE4.6
Detektion	UV-Absorption bei 260 nm
Puffer A:	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 20 mM TrisCl; pH 8,0
Puffer B:	20 mM TrisCl; pH 8,0
Injektionsvolumen	25 µl
Volumenstrom	0,8 ml/min

Im resultierenden Chromatogramm (Abbildung 2.4) zeigt sich, dass unter den gegebenen Bedingungen pDNA auf der Säule nicht gebunden wurde und basisliniengetrennt bereits nach 1 Minute eluierte. Im Anschluß folgten zusammenliegend Salze, degradierte RNA und Proteine, die Retentionszeiten zwischen 1,5 und etwa 3 min aufwiesen. RNA wurde nach linearem Gradient zu 100 % Puffer B mit einer Retentionszeit von etwa 6 min detektiert, so dass im resultierenden Chromatogramm die wichtigsten Komponenten voneinander getrennt und quantifiziert werden konnten.

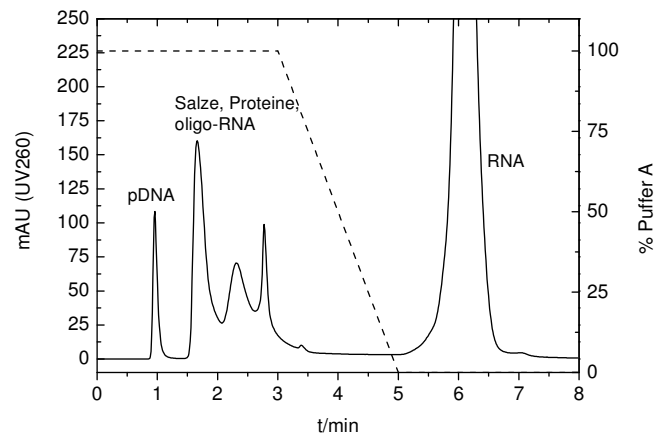


Abbildung 2.4: HIC-Chromatogramm vom geklärten Lysat

Die resultierenden Kalibrierfunktionen von pDNA und RNA sind in Abbildung 2.5 dargestellt. Die relative Standardabweichung der Analytik betrug 3,4 %.

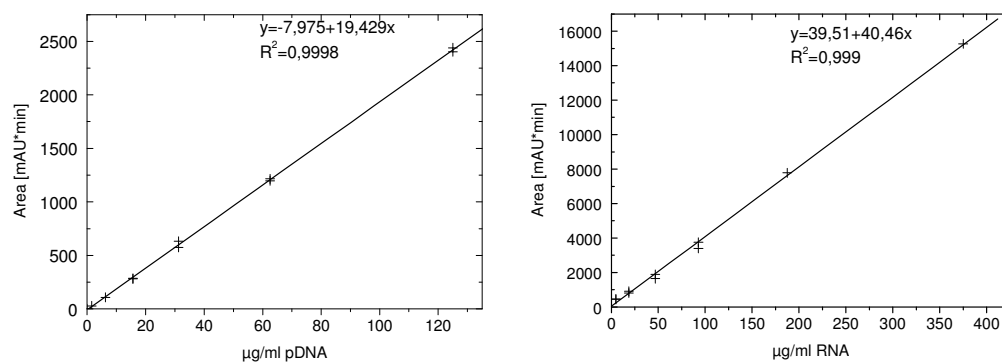


Abbildung 2.5: HPLC Kalibrierfunktionen für pDNA und RNA

2.5.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Abschätzung des gDNA Anteils und des oc/scDNA Verhältnisses in Plasmidpräparationen sowie zur Bestätigung der HPLC-Resultate wurde eine gelelektrophoretische Analytik eingesetzt. Folgende Tabelle 2.6 zeigt die eingesetzten Bedingungen.

Tabelle 2.6: Bedingungen für die Gelelektrophorese

Elektrophoresekammer	BIORAD, minisubcell GT
Laufpuffer	TAE (40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 7,5)
Agarosekonzentration	0,8 %
Auftragevolumen	10 µl Probe + 2 µl Blaumarker
Spannung	80 V, für ca. 45 min
Detektion	Ethidiumbromidfärbung, 10 min in Färbelösung (1µg/ml in TAE), 10 min Entfärbung in TAE
Gelbelichtung	Pharmacia Biotec, Imagemaster VDS
Auswertung	ImageQuant evaluation software

Als Beispiel ist in Abbildung 2.6 eine gelelektrophoretische Darstellung zu sehen, die eine Probe eines geklärten Lysats zeigt (Spur 1) sowie Plasmidpräparationen in unterschiedlicher Reinheit (Spur 2-7). Der helle „Schmier“ in der Spur 1 oberhalb der Plasmidbanden deutet auf gescherte gDNA hin, während die Bande in der Auftragetasche der Spur 6 auf einen hohen Gehalt denaturierter DNA schließen läßt. Zur densitometrischen Abschätzung des oc/scDNA Verhältnisses wurden mit der Software ImageQuant die Bandenintensitäten der opencircular und supercoiled DNA Bande ermittelt und anschließend die Verhältnisse berechnet. Zwar ist diese indirekte Bestimmung aus dem Agarosegel fehlerbehaftet (relative Standardabweichung etwa 10-15 %), sie genügte jedoch, um tendenzielle Änderungen des oc/scDNA Verhältnisses zu erkennen.

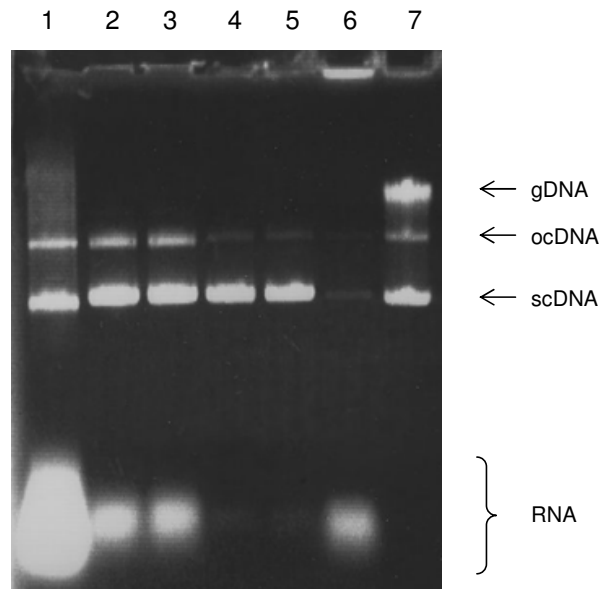


Abbildung 2.6: Beispiel für Agarosegel

2.5.3 Sequenzierung

Die Sequenzierbarkeit der pDNA wurde durch den Sequenzierservice von QIAGEN auf einem ABI Prism 3730 DNA Analyser mit dem ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ermittelt.

2.6 Phasendiagramm

Die Bestimmung von Binodalen für Phasendiagramme erfolgte durch Titration bis zur auftretenden Trübung (Bamberger *et al.* 1985). Dazu wurde eine Phasenkomponente in hoher Konzentration gelöst in Wasser (z. B. 75 % w/w PEG) vorgelegt und unter Zugabe der anderen, ebenfalls gelösten Phasenkomponente (z. B. 50 % w/w Kaliumphosphat), ständig gründlich vermischt. Der Titrationsendpunkt wurde durch eine plötzlich eintretende Trübung festgestellt. Anhand der Massen der eingesetzten Phasenkomponenten wurde schließlich die Konzentration des Binodalenpunktes in Massenprozent berechnet und im Phasendiagramm eingetragen. Die Titration wurde mehrfach wiederholt, indem

bekannte Massen Wasser bis zum Verschwinden der Trübung zugegeben wurde. Zur Ermittlung der Konoden wurden PEG- und Phosphatkonzentrationen in Unter- und Oberphasen mehrerer Phasensysteme quantifiziert. Der Phosphatgehalt wurde colorimetrisch mittels Nanocolor Assay (Macherey-Nagel, Düren) bestimmt, während die PEG-Konzentration gravimetrisch durch Trockenmassebestimmung abzüglich des Salzanteils ermittelt wurde.

2.7 Dynamische Lichtstreuung

Hydrodynamische Radien von pDNA und deren Agglomerate wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering, DLS) gemessen. Zum Einsatz kam das DynaPro DLS System (Wyatt Technology Corp., CA, USA) zusammen mit der Dynamics V6 Software. Zur Probenvorbereitung wurden alle Lösungen für 10 min bei 15000 g zentrifugiert, um Störungen der Messung durch feinste Partikel und Staub zu vermeiden. Die Lichtstreuexperimente wurden in 45 µl Küvetten bei 20 % Laserleistung für 10 Sekunden pro Analyse und insgesamt 10 Wiederholungen je Probe durchgeführt. Da für die Berechnung der hydrodynamischen Radien durch die Software Angaben zur Viskosität und zum Brechungsindex der Proben notwendig waren, wurden nachfolgende Größen bestimmt:

Tabelle 2.7: Brechungsindex (RI) und dynamische Viskosität von Ober- und Unterphase (15 % PEG 800, 20 % K-Phosphat), bei 20 °C

	RI	η
Oberphase	1,395	10,9 mPa s
Unterphase	1,375	2,4 mPa s

2.8 Flammenphotometrie

Kaliumkonzentrationen wurden mit dem Flammenemissionspektrometer ELEX 6361 von Eppendorf bestimmt. Die Messungen in Ober- und Unterphase erfolgten nach einer internen Kalibrierung im Bereich zwischen 0,3 und 6 mM K⁺ in entsprechender Verdünnung.

2.9 Filtrationsexperimente

Falls nicht anders angegeben, wurden die Adsorptionsversuche mit Membranen aus der Tabelle 2.8 durchgeführt. Die Charakterisierung der Membranen mittels Durchbruchkurven erfolgte mit einem druckbetriebenen Filterhalter (Sartorius, Göttingen) mit einem Gesamtvolumen von 50 ml. Lösungen mit 20 µg/ml pDNA in 30 % w/w Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) wurden mit einer Flußrate von 4-5 ml/min durch unterschiedliche Membranen filtriert, und die resultierenden Fraktionen von je 2 ml Volumen wurden mittels HPLC analysiert.

Tabelle 2.8: Verwendete Membrantypen

Membrantyp	Filtertyp	Filterfläche	Porengröße	Hersteller
Nylon	Scheibe	12,5 cm ²	0,2 µm	PALL
Polyvinylidenfluorid (PVDF)	Scheibe	12,5 cm ²	0,2 µm	PALL
hydrophil. Polypropylen (GHP)	Scheibe	12,5 cm ²	0,2 µm	PALL
Nitrocellulose	Scheibe	12,5 cm ²	0,2 µm	Sartorius
Celluloseacetat	Scheibe	12,5 cm ²	0,2 µm	Sartorius
Nylon	Spritzenfilter	5 cm ²	0,45 µm	PALL
Nylon	96 well filter Platte	0,25 cm ²	0,2 µm	PALL
Nylon	Filterkapsule Typ: KA2NFP2G	2 x 10000 cm ²	0,2 µm	PALL

2.10 Diagramme

Die grafische Darstellung der Daten in Diagrammen wurde mittels der Software Origin 7.0 (OriginLab) durchgeführt. Da für die Daten kein funktioneller Zusammenhang bekannt ist, wurde zur Verdeutlichung des Kurvenverlaufs die nichtrationale Kurvenanpassung „B- Spline“ verwendet.

3 Ausgangssituation

Im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit (Frerix 2002) wurde eine integrierte Aufreinigungsmethode für pDNA aus *E. coli* Biomasse entwickelt, die den Ablauf der alkalischen Lyse mit der Zweiphasenextraktion verbindet.

In dieser Arbeit wurden zunächst systematisch Zusammensetzungen von Phasensystemen gesucht, bei denen entgegengesetzte Verteilungen von pDNA als Produkt und RNA als Hauptkontaminant zu finden waren. Das Screening wurde in Verteilungsexperimenten durchgeführt, bei denen pDNA und RNA zu verschiedenen Phasensystemen zugesetzt und anschließend die jeweilige Verteilung der Nukleinsäuren in den Phasen quantifiziert wurden. Aus diesen Verteilungsexperimenten ging ein System bestehend aus 15 % PEG 800 und 20 % Kaliumphosphat hervor, welches etwa 85 % der pDNA in die Unterphase extrahiert und etwa 90 % RNA in die Oberphase abtrennt (eine genauere Betrachtung der RNA und Plasmid Verteilung wird im Kapitel 4.2.2 vorgenommen.) Nachdem dieses Phasensystem eine erste Trennung zwischen RNA und pDNA ermöglichte, wurde die alkalische Lyse in das Extraktionsverfahren integriert (Abbildung 3.1). Die ersten Schritte zur Resuspendierung der Biomasse und zur Lyse mit P2 Lysepuffer entsprechen dabei dem Standardverfahren der alkalischen Lyse, wie es auch beim Referenzverfahren eingesetzt wird (1.4.4). Abweichend von der herkömmlichen alkalischen Lyse wurde die Neutralisation mit Kaliumphosphatpuffer durchgeführt, womit sowohl die Fällung des protein- und gDNA- haltigen KDS- Komplexes eingeleitet als auch die Salzkomponente des Phasensystems zugeführt werden konnten. Durch Zugabe der PEG-Stammlösung im nachfolgenden Schritt wurde die Extraktion eingeleitet, so dass schließlich nach Vermischung und Zentrifugation zwei getrennte Phasen vorlagen. Dabei führt die hohe Dichte der salzhaltigen Unterphase zu einer vollständigen Abtrennung des KDS Präzipitates in die Oberphase. Dies ist insofern vorteilhaft, da damit eine zusätzliche Entfernung des Präzipitates durch Mikrofiltration (siehe 1.4.4) oder Zentrifugation wie bei konventionellen chromatographischen Verfahren (Prazeres *et al.* 1998; Diogo *et al.* 2000; Ferreira *et al.* 2000) entfällt. Somit handelt es sich bei dem hier entwickelten Verfahren um eine integrierte Grobreinigung mittels ATPS (Frerix *et al.* 2005).

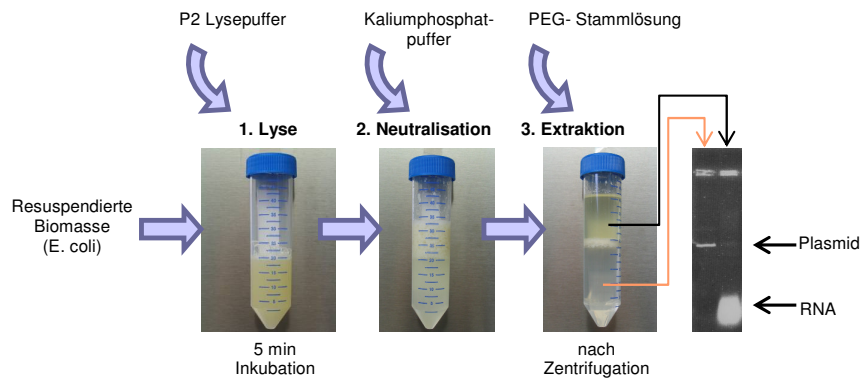


Abbildung 3.1: Integration der alkalischen Lyse in die wässrige Zwei-Phasenextraktion

Der Aufreinigungseffekt bei dieser Extraktion wird in den Chromatogrammen der Abbildung 3.2 verdeutlicht. Bei diesem Extraktionsversuch konnte eine Plasmid Ausbeute von ca. 90 % erzielt und der RNA Gehalt ebenfalls um etwa 90 % reduziert werden. Im Vergleich zur Zusammensetzung der Biomasse konnte der Proteingehalt um 90-95 % verringert werden, wobei der Hauptteil der Proteine bereits im KDS Präzipitat während der alkalischen Lyse abgetrennt wurde.

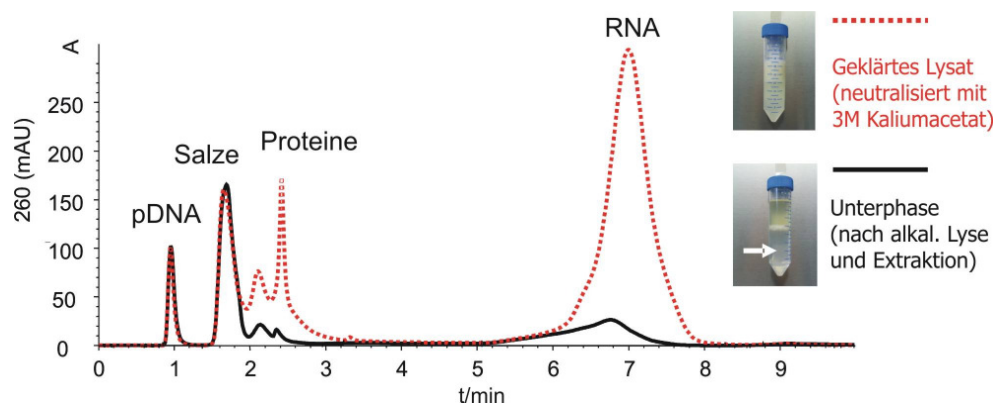


Abbildung 3.2: HIC Chromatogramme vom geklärten Lysat und Unterphase

Ausgehend von diesem integrierten Verfahren behandelt die Dissertation folgende Gesichtspunkte: In 4.1 werden Ergebnisse diskutiert, die die oben beschriebene Kombination der alkalischen Lyse mit dem Extraktionsverfahren weiter untersuchen. Unterschiedliche Einflüsse auf die Verteilung der pDNA und der RNA wurden unter 4.2 untersucht, wobei versucht wurde, eine mechanistische Erklärung für das Verteilungsverhalten zu geben. Wie das Chromatogramm in der Abbildung 3.2 erkennen läßt, beinhaltet die Unterphase eine relative hohe Salzkonzentration (hauptsächlich Phosphatsalze). Hierzu wird in Kapitel 4.3 ein Verfahren zur effektiven Entsalzung der Unterphase beschrieben. Da die Reinheit der durch die Zweiphasenextraktion aufgereinigten pDNA in dem hier beschriebenen Fall für eine therapeutische Anwendung noch nicht ausreicht (siehe Chromatogramm), wird unter Kapitel 4.4 ein auf ATPS basierendes Verfahren beschrieben, das eine weitere Feinreinigung ermöglicht. Die Kombination der einzelnen Verfahrensschritte ergibt einen vollständigen Prozeß, der im Vergleich mit dem QIAGEN-Prozeß im Kapitel 4.5 getestet wird. Unter 4.6 wird schließlich der Versuch unternommen, eine Minipräparation von Plasmid DNA mittels ATPS durchzuführen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Integration der alkalischen Lyse in die wässrige Zweiphasenextraktion

4.1.1 Einleitung

Wie unter Punkt 1.4.3 beschrieben, gilt die alkalische Lyse als eine der kritischsten Schritte im gesamten Prozeß (Ferreira *et al.* 2000). Ein zu niedriger pH-Wert während der Lyse und eine unvollständige Vermischung kann eine unzureichende Denaturierung der gDNA zur Folge haben. Zu starke Scherkräfte führen vor allem während der Neutralisation zur Fragmentierung von gDNA, die aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften nur schwer von pDNA abzutrennen ist (Prazeres *et al.* 1999). Da abweichend von der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) die Neutralisation nicht mit Kaliumacetat sondern direkt mit Kaliumphosphatpuffer erfolgt, wurden die Bedingungen während der Lyse variiert, um mögliche Einflüsse auf die pDNA festzustellen.

Ein wichtiger Parameter während der Lyse ist die Biomassebeladung. Wässrige Zweiphasensysteme zeichnen sich unter anderem durch ihre hohe Beladungskapazitäten aus (Albertsson 1985; Hustedt *et al.* 1985), die nur durch die Löslichkeit der Produkte im Phasensystem limitiert sind. Vor allem bei großen Molekülen wie pDNA ist dies gegenüber chromatographischen Methoden ein Vorteil. Mit zunehmendem Molekulargewicht findet die Adsorption lediglich an der Oberfläche der stationären Phase statt, weshalb die chromatographische Bindungskapazitäten für pDNA meist im Bereich von 1 mg/ml liegen, für Proteine hingegen bis zu 100 mal höher (Ljunglof *et al.* 1999; Diogo *et al.* 2005).

Daher wurde die Auswirkungen einer höheren Biomassebeladung auf die Reinheit und die Ausbeute der pDNA untersucht, da eine Steigerung der Produktbeladung zu einer höheren Auslastung bzw. Produktivität der Extraktion führt und dadurch die Wirtschaftlichkeit erhöht.

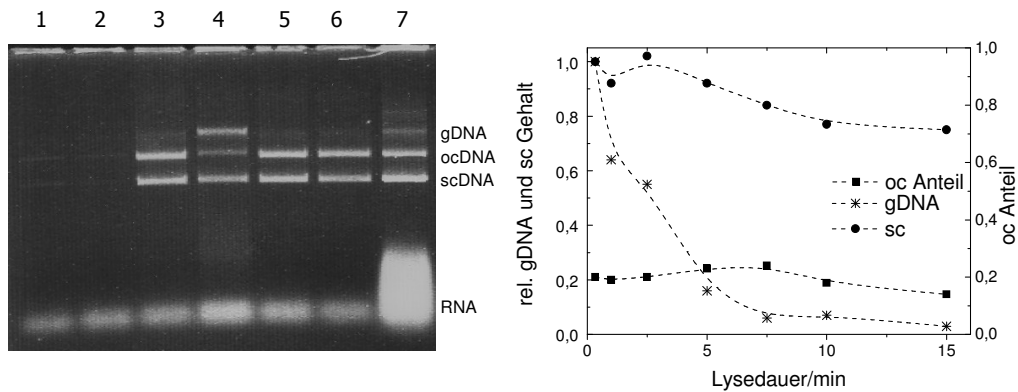
4.1.2 Ergebnisse

a) Zusammensetzung P2 Lysepuffer

Für den folgenden Abschnitt wurden Versuche mit unterschiedlichen Lysebedingungen mit dem Ziel durchgeführt, die einzelnen Einflüsse der Parameter wie NaOH- und SDS-Konzentration sowie die Lysedauer genauer zu untersuchen. Beim ersten Ansatz wurde die Zusammensetzung des P2 Lysepuffers variiert und nach der alkalischen Lyse eine Zweiphasenextraktion vorgenommen (Abbildung 4.1, Spuren 1-6). Bei NaOH Konzentrationen ≥ 300 mM konnten nach Extraktion in die Unterphase nur Spuren von DNA im Agarosegel nachgewiesen werden (Spur 1+2), während bei 200 mM NaOH (Spur 3) pDNA-Konzentrationen festgestellt wurden, die mit der Bandenintensitäten im geklärten Lysat (Spur 7) unter Standardbedingungen (200 mM NaOH, 1 % SDS in P2) vergleichbar waren. Wurde die NaOH Konzentration auf 100 mM reduziert, so waren die Bandenintensitäten von pDNA geringer, allerdings war eine deutliche gDNA Bande und eine erhöhte RNA-Konzentration erkennbar (Spur 4). Eine Verdopplung bzw. Verdreifachung der SDS Konzentration in Gegenwart von 200 mM NaOH (Spur 5 bzw. 6) hingegen ergab keine signifikante Änderung im Vergleich zu 1 % SDS (Spur 3).

b) Inkubationsdauer während der alkalischen Lyse

Neben der Zusammensetzung des Lysepuffers hat die Inkubationsdauer während der Lyse einen Einfluß auf die Plasmidqualität in der Unterphase (Abbildung 4.2). Durch Verlängerung der Lysedauer von 20 Sekunden auf 7,5 Minuten konnte der gDNA Gehalt in der Unterphase auf weniger als ein Zehntel reduziert werden, während der relative scDNA Gehalt um etwa 15 % reduziert wurde. Der Anteil an ocDNA verblieb in diesem Zeitraum bei etwa 20 bis 25 %, eine Ausdehnung der Inkubation auf 15min führte zu einer Reduktion auf 15 %.



Spur Probe/ Zusammensetzung Lysepuffer

1	360 mM NaOH; 1 % SDS; UP nach ATPS
2	300 mM NaOH; 1 % SDS; UP nach ATPS
3	200 mM NaOH; 1 % SDS; UP nach ATPS
4	100 mM NaOH; 1 % SDS; UP nach ATPS
5	200 mM NaOH; 2 % SDS; UP nach ATPS
6	200 mM NaOH; 3 % SDS; UP nach ATPS
7	gekl. Lysat, neutralisiert mit KAc

Abbildung 4.2: Einfluß der Lysedauer auf gDNA, scDNA und oc-Anteil; Proben aus UP 15 % PEG 800, 20 % K-Phosphat System; (Densitometrische Quantifizierung aus Agarosegel)

Abbildung 4.1: Variation der NaOH und SDS Konzentrationen im P2 Puffer³ während der alkalischen Lyse (5 min Lysedauer); Spur 1-6 sind Proben aus der UP vom 15 % PEG 800, 20 % K- Phosphat System

c) Neutralisationsdauer

Der Einfluß der Neutralisationsdauer wurde in sechs Parallelansätzen verfolgt. Dabei wurde der Zeitpunkt zwischen Zugabe vom Kaliumphosphatpuffer zur Neutralisation und der Zugabe von PEG zum Beginn der Extraktion variiert. Die Gesamtinkubationszeit von 20 min bei 37 °C war für alle Proben gleich. Das Diagramm in Abbildung 4.3 zeigt einen klaren Zusammenhang zwischen der Neutralisationsdauer und dem ocDNA Anteil. Wurde PEG unmittelbar nach der Neutralisation zugegeben und extrahiert, war der oc Anteil unter 10 %. Eine um

³ Die resuspendierte Biomasse wird mit dem Lysepuffer im volumetrischen Verhältnis 1:1 vermischt. Dadurch entspricht die NaOH Konzentration im Lyseansatz der halben Konzentration im P2 Puffer.

eine Minute verzögerte Extraktion ließ diesen Anteil bereits auf etwa 25 % ansteigen, und erhöhte sich auf ca. 45 %, wenn die PEG Zugabe erst nach 15 Minuten erfolgte.

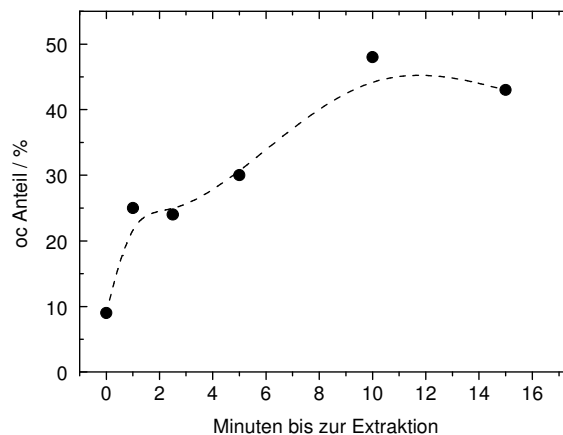


Abbildung 4.3: Einfluß der Neutralisationsdauer bis zur Extraktion auf den oc Anteil in der Unterphase; Alle Proben hatten eine Gesamtkubationszeit von 20 min bei 37 °C; System: 15 % PEG 800, 20 % Phosphat; densitometrische Quantifizierung aus Agarosegel

d) Einfluß der Extraktionstemperatur

Es ist bekannt, dass Temperaturänderungen bei Aufreinigungsprozessen mit wässrigen Zweiphasensystemen erhebliche Auswirkungen auf die Systemleistung haben können (Albertsson 1985; Brooks *et al.* 1985). Zum einen besteht die Gefahr, dass durch Verringerung der Temperatur bei Systemzusammensetzungen nahe der Binodale eine Phasentrennung ausbleibt, zum anderen ist die Verteilung von Substanzen grundsätzlich temperaturabhängig⁴ (siehe auch Broenstedtgleichung unter 1.5.1). Aus diesem Grund wurden pDNA Ausbeuten und RNA Abreicherungsraten bei unterschiedlichen Extraktionstemperaturen ermittelt (Abbildung 4.4). Während bei Temperaturen zwischen 5 und 10 °C nur

⁴ siehe auch 4.2.2

geringe pDNA Ausbeuten in der Unterphase gemessen wurden, nahm diese zwischen 15 und 20 °C auf 35 und 85 % zu. Eine weitere Steigerung der Temperatur auf 30 °C ließ die rechnerische Ausbeute auf über 110 % ansteigen, wobei die RNA Abreicherung von 95 auf 90 % abnahm.

e) Plasmidlöslichkeit

Zur Untersuchung der Beladungskapazität wurde zunächst die maximale Löslichkeit der pDNA in der Unterphase ermittelt (Abbildung 4.5). Hierzu wurden Ansätze mit unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen zentrifugiert und die Plasmidkonzentrationen in den Überständen quantifiziert. Jede Lösung enthielt 30 % w/w Kaliumphosphat, und entsprach somit in etwa der Unterphasenzusammensetzung eines 15 % PEG 800, 20 % Kaliumphosphatsystems (siehe auch Phasendiagramm unter 2.6). Die Versuche zeigten, dass bis zu der gemessenen Konzentration von 450 µg/ml keine limitierende Löslichkeit festgestellt wurde. Die tatsächliche Löslichkeit konnten hierbei nicht ermittelt werden, da die Ausgangskonzentration der pDNA Stammlösung keine höhere Beladung ermöglichte.

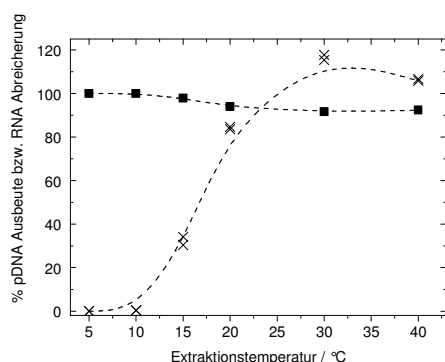


Abbildung 4.4: pDNA Ausbeuten (X) und RNA Abreicherung (■) als Funktion der Extraktionstemperatur im 15 % PEG 800, 20 % Phosphat System (Ausbeuten und Abreicherungen wurden auf pDNA und RNA Konzentrationen im geklärten Lysat bezogen; die Lyse wurde bei RT durchgeführt)

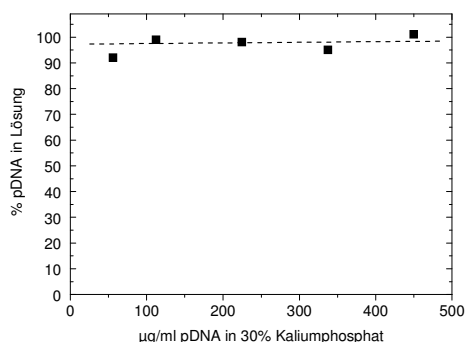


Abbildung 4.5: pDNA Löslichkeit in 30 % w/w Kaliumphosphat; die Löslichkeit wurde durch Quantifizierung der pDNA im Zentrifugationsüberstand gemessen (5 min, 10000 g, RT)

f) Biomassebeladung im System mit alkalischer Lyse

Der Einfluß der Biomassebeladung während der alkalischen Lyse ist in der Abbildung 3.8 dargestellt. Dabei erfolgten die Neutralisation mit Kaliumacetat und die Quantifizierung der Nukleinsäuren im durch Zentrifugation geklärten Lysat. Anhand der ermittelten Plasmid- und RNA Konzentrationen im geklärten Lysat wurden die erzielten Ausbeuten pro Gramm Biomasse gegen die Beladung aufgetragen (Abbildung 4.6). Diese Versuche zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Biomassebeladung während der alkalischen Lyse und der relativen freigesetzten Plasmid bzw. RNA-Mengen. Während bei 5 % Biomasseanteil im P1 etwa 800 µg pDNA/ g Biomasse ermittelt wurden, nahm dieser Anteil bei einer Steigerung der Biomassebeladung auf 20 % w/w linear auf etwa 400 mg/g Biomasse ab und halbierte sich demnach. Im gleichen Bereich verringerte sich die freigesetzte RNA-Menge von 11 auf etwa 9 mg/g Biomasse.

g) Biomassebeladung im System mit alkalischer Lyse und Extraktion

Der Einfluß der Biomassebeladung auf die Extraktion wurde in Systemen bestimmt, bei denen die Menge der resuspendierten Biomasse im P1-Puffer variiert wurde. Die Abbildung 4.7 zeigt hierzu pDNA Ausbeuten und die RNA Abreicherungen als Funktion der Beladung. Für die Berechnung wurde von einer theoretisch maximalen Ausbeute von 8,3 µg pDNA pro % w/w Biomassebeladung in P1 ausgegangen. Dabei wurde in Systemen mit 10-15 % w/w Biomasseanteil in P1 pDNA-Ausbeuten von etwa 93 % und RNA Abreicherung von 75-80 % gemessen. Eine weitere Steigerung der Biomassebeladung zu 20 bzw. 22,5 % w/w führte zu einer deutlichen Abnahme der Plasmidausbeute zu 70 bzw. 55 %, während die RNA Abreicherung auf 83 bzw. 90 % zunahm.

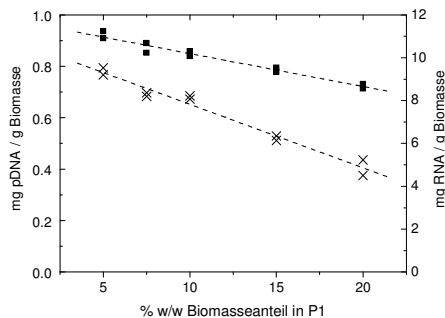


Abbildung 4.6: Abhängigkeit der pDNA (X) und RNA (■) Freisetzung von der Biomassebelastung im geklärten Lysat (Neutralisation mit 3 M Kaliumacetat)

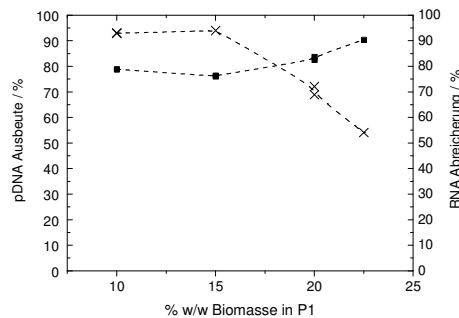


Abbildung 4.7: pDNA Ausbeuten (X) und RNA Anreicherung (■) in 15 % PEG 800, 20 % Phosphat Systemen in Abhängigkeit von der Biomassebelastung (je System wurde 1 g P1 inkl. Biomasse im 5 g Gesamtsystem eingesetzt, die Ausbeuten bzw. Anreicherungen beziehen sich auf 830 µg pDNA bzw. 11,5mg RNA pro g Biomasse; V(UP)= 2,4 ml)

4.1.3 Diskussion

Die Untersuchung der Lysebedingungen zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen den gewählten Parametern und der extrahierten Ausbeute bzw. der Reinheit der pDNA in der Unterphase. Wird die NaOH-Konzentration erhöht, so führt dies zu einer verstärkten und beschleunigten Zelllyse und damit Freisetzung von pDNA (siehe auch 1.4.3). Ein weiterer Effekt, der mit der Erhöhung des pH Wertes auf 12-12,5 verbunden ist, ist die Denaturierung der DNA und damit die Trennung der DNA-Doppelstränge. Dies wirkt sich positiv auf die Eliminierung der denaturierten gDNA aus (Abbildung 4.1, Spur 3+4), führt jedoch ab einem gewissen Punkt auch zur irreversiblen Denaturierung von pDNA (siehe auch Kapitel 4.4), die folglich nicht in die Unterphase extrahiert wird (Abbildung 4.1, Spur 1+2). Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls in der Arbeit von Meacle et al. (2004) für die Zusammensetzung des geklärten Lysats gefunden. In den dort durchgeführten Versuchen führte eine Erhöhung der P2 NaOH- Konzentration von 250 auf 300 mM ebenfalls zu einem deutlichen Verlust an scDNA, der auf irreversible Denaturierung der pDNA zurückgeführt wurde.

Eine leichte Erhöhung der SDS Konzentration über 1 % hingegen hatte keinen Einfluß auf die Lyse, der sich positiv auf den pDNA Gehalt nach der Extraktion auswirken würde. Während der Lyse bewirkt SDS lediglich die Solubilisierung der Membranproteine und führt damit durch die Destabilisierung der Membran zur Lyse. Ein Verzicht auf SDS im Lysepuffer würde hingegen die Plasmidausbeute aufgrund des stark verminderten Zellaufschlusses deutlich reduzieren (Daten nicht gezeigt).

Ebenso wie eine Steigerung des pH-Wertes infolge der erhöhten NaOH-Konzentration wirkt sich auch die Dauer der Denaturierung auf das Ergebnis der Extraktion aus. Die Zellyse und damit die Freisetzung von pDNA erfolgt je nach Vermischungsgrad innerhalb von 10-20 Sekunden. Das lokale Maximum der Viskositätskurve nach 40 Sekunden (Abbildung 4.8, linker Pfeil) weist auf das Ende der Zellyse hin (Ciccolini *et al.* 1998; Ciccolini *et al.* 1999), während das weitere sich andeutende Maximum (rechter Pfeil) auf die vollständige Denaturierung und beginnende Scherung der gDNA hindeutet. Diese Interpretation steht im Einklang mit den Ergebnissen aus Abbildung 4.2, in der bereits nach kurzer Lysezeit pDNA in die Unterphase extrahiert wird, während die Denaturierung und damit Abreicherung der gDNA deutlich langsamer ist. Da gegenüber den Versuchen von Ciccolini *et al.* während der Lyse keine kontinuierliche Vermischung erfolgte, tritt das Minimum des gDNA Gehaltes erst nach etwa 6-7 Minuten auf (Abbildung 4.2). So weist pDNA im begrenzten pH Bereich bis 12,5 eine höhere Stabilität gegenüber alkalischen Bedingungen auf, die auf den Renaturierungseffekt zurückzuführen ist (siehe auch 4.4). Clemson und Kelly (2003) zeigten im geklärten Lysat, dass erst Inkubationszeiten von mehr als 10 Minuten zur Denaturierung und damit Reduktion der scDNA führten. Dies spiegelt sich in der Abbildung 4.2 wider, in der bei langer Lysedauer sowohl eine Abnahme der gesamt scDNA Menge, wie auch des ocDNA Anteils zu erkennen sind.⁵

Es konnte gezeigt werden, dass der wie im Standardprotokoll zur Plasmidreinigung verwendete P2 Lysepuffer (200 mM NaOH; 1 % w/v SDS) mit einer 5 minütigen Inkubation die besten Bedingungen für die alkalische Lyse mit der integrierten Zweiphasenextraktion bietet. Eine Ausdehnung der Lysedauer auf 7,5 Minuten

⁵ Eine ausführlichere Diskussion wird unter 4.4.3 vorgenommen.

würde den besten Kompromiß zwischen gDNA Abreicherung und scDNA Gehalt bzw. Ausbeute ergeben.

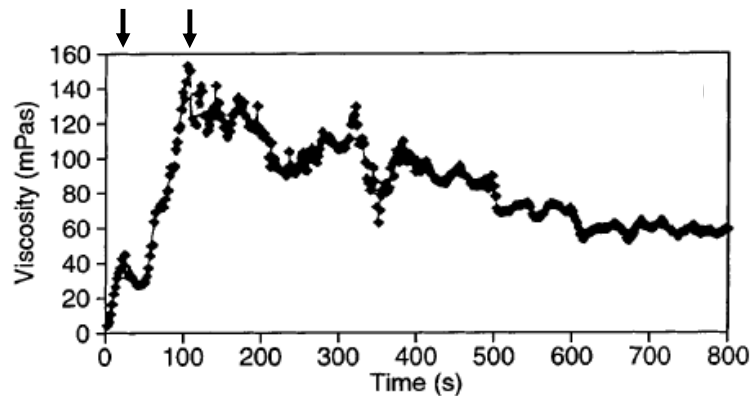


Abbildung 4.8: Viskosität des Bakterienlysates während der Lysereaktion; Messungen erfolgten im Viskosimeter mit einer Scherrate von 46 s^{-1} (aus Ciccolini *et al.* 1999)

Die Untersuchung der Neutralisationsdauer zeigt einen deutlichen Einfluß auf den ocDNA Anteil der extrahierten pDNA, die auf die endogene Nukleaseaktivität zurückzuführen ist. Wie hoch die enzymatische Restaktivität nach der Neutralisation noch ist, zeigen Inkubationsversuche von Monteiro *et al.* (1999), die die endogene Nukleaseaktivität zelleigener RNasen zum RNA-Abbau nutzten. Gleichzeitig wurde dabei auch ein Verlust an scDNA festgestellt, der auf den durch DNasen hervorgerufenen Einzelstrangbruch (engl.: nick) zurückgeführt wurde. Bei der alkalischen Lyse wird zwar der Großteil der Enzyme infolge der hohen SDS Konzentration und des pH Wertes inaktiviert, nach Neutralisation kann es jedoch zur Renaturierung einiger stabiler Enzyme kommen, zu denen auch Nukleasen zählen. Nach Zugabe von PEG und Vermischen werden 90-95 % der Proteine (Frerix 2002) in die Oberphase extrahiert, so dass die Nukleasen getrennt von der pDNA vorliegen. Die direkte Einleitung der Extraktion und die dadurch bedingte Trennung der Proteine von der pDNA reduziert dadurch den enzymatischen Abbau der scDNA erheblich und wirkt sich somit stabilisierend aus.

Die Versuche zur Biomassebeladung während der Extraktion zeigen, dass eine Erhöhung der Biomassekonzentration zu einer Abnahme der relativen Ausbeuten führt (Abbildung 4.7). Unter den gegebenen Bedingungen liegt die maximal zu

erwartende pDNA Konzentration im System mit 22,5 % Beladung bei ca. 77,8µg/ml pDNA (187 µg pDNA in 2,4 ml Unterphase) und befindet sich innerhalb der pDNA Löslichkeit in der Unterphase (Abbildung 4.5). Der gemessene Wert zeigt jedoch eine Verringerung um etwa 50 % gegenüber der maximalen Ausbeute. Dass diese Reduktion weder auf zu geringe Löslichkeit noch auf das Extraktionsverhalten im ATPS zurückzuführen ist, zeigt die Tatsache, dass bereits die pro g Biomasse freigesetzte Menge pDNA mit zunehmender Beladung abnimmt (Abbildung 4.6). Diese Erkenntnis wurde auch in der Arbeit von Clemson und Kelly (2003) gewonnen. Darin wurde festgestellt, dass bei einer 6-fachen Steigerung der Biomassebeladung während der Plasmidpräparation die Plasmidkonzentration im Eluat nur um etwa 20 % erhöht wurde. Vermutlich ist dies im Zusammenhang mit einer unvollständigen Zellyse und der Bildung von größeren Agglomeraten zu sehen, die zum Einschluß von pDNA und damit zum Verlust im Präzipitat führen. Ungeklärt bleibt, warum zwischen 10 und 15 % Biomassebeladung in P1 keine Abnahme der Ausbeute festgestellt wird (Abbildung 4.7).

In diesem Zusammenhang soll noch erwähnt werden, dass eine Vergrößerung des Flockendurchmessers auch bei der Durchführung der alkalischen Lyse in größeren Gefäßen (bis zu 5 L Flaschen, siehe 4.5) festgestellt wurde. Diese können zwar durch eine stärkere Vermischung zerkleinert werden, hätte aber möglicherweise die Freisetzung von gDNA zur Folge (Ciccolini et al. 1999). Als mögliche Alternative zur Vermischung im Batchverfahren wird unter 4.5.3 der Einsatz von statischen Mischern vorgeschlagen, mit denen zusätzlich zum scherungsarmen Vermischen der Prozeßlösung eine kontinuierliche Lyse ermöglicht wird.

Bei der Variation der Extraktionstemperatur wird ein deutlicher Ausbeuteverlust bei niedrigen Temperaturen (Abbildung 4.4) erkennbar. Es ist daher nicht sinnvoll, die Extraktion bei dem untersuchten System bei niedrigen Temperaturen (<10 °C) durchzuführen, um damit die degradative enzymatische Aktivität zu verringern. (Die Ursache für den deutlichen Ausbeuteverlust <20 °C wird unter 4.2 diskutiert). Eine Erhöhung der Temperatur hingegen wirkt sich positiv auf die Ausbeute aus. So führt eine Temperaturerhöhung zu einer erhöhten Löslichkeit und damit zu einer verminderten Ausbildung des KDS-Präzipitates, wodurch die in der Fällung eingeschlossene pDNA durch Extraktion leichter herausgelöst werden kann. Dies erklärt auch die hohen Ausbeuten von >100 %, da der Bezugswert für die Ausbeuten auf die Zusammensetzung des geklärten Lysates bei Raumtemperatur

bezogen wurde. Ebenso führt die Temperatursteigerung zu einer Erhöhung der Löslichkeit der am Präzipitat adsorbierten RNA und so zur Verringerung der RNA-Abreicherung. Darüber hinaus zeigt auch die Abbildung 4.14 in Kapitel 4.2 eine zunehmende RNA Verteilung in die Unterphase bei Erhöhung der Extraktionstemperatur.

4.1.4 Schlußfolgerung

Für das integrierte Extraktionsverfahren können die Bedingungen der herkömmlichen alkalischen Lyse (200 mM NaOH, 1 % w/v SDS im P2 Lysepuffer) übernommen werden. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass die pDNA Ausbeuten mit zunehmender Biomassekonzentration im ATPS abnehmen. Die maximale Beladung und damit die Produktivität der Zweiphasentrennung sind jedoch nicht durch die Kapazität der Extraktion begrenzt, sondern aufgrund der Bedingungen während der alkalischen Lyse limitiert. Durch Erhöhung der Extraktionstemperatur kann die pDNA Ausbeute erheblich verbessert werden, wobei die direkte Einleitung der Extraktion nach der Lyse zu einer Stabilisierung der scDNA führt.

Unabhängig davon ist zu berücksichtigen, dass je nach Verfahren 60-90 % der Gesamtproduktionskosten auf das Downstream Processing fallen (Lyddiatt und O'Sullivan 1998; Banik et al. 2003) und die Bereitstellung der Biomasse demnach mit vergleichsweise geringen Kosten verbunden ist. Somit kann eine höhere Beladung des Phasensystems zur Erhöhung der Produktivität auch bei begrenzten Ausbeuteverlusten noch wirtschaftlich sinnvoll sein.

4.2 Strukturelle Einflüsse auf die Verteilung von Plasmid DNA

4.2.1 Einleitung

In Kapitel 4.1 wurde die Zwei-Phasenextraktion von pDNA aus der Biomasse mit integrierter Zelllyse untersucht. Kapitel 4.2 beschäftigt sich mit unterschiedlichen Einflußparametern auf die Verteilung von pDNA und RNA im ATPS. Die Durchführung dieser Versuche dient einerseits dazu, die Stabilität der Extraktionsleistung zu untersuchen. Andererseits gibt sie Rückschlüsse auf das

mechanistische Prinzip, welches der Trennung von pDNA und Kontaminanten zugrunde liegt.

Die Verteilung von Substanzen in Zweiphasensystemen (hier PEG/Kaliumphosphat Systeme) hängt von zahlreichen Parametern ab (Albertsson 1985; Brooks *et al.* 1985; Kula 1985; Johansson *et al.* 1998), die u. a. nachfolgend aufgelistet sind:

- PEG Konzentration
- PEG Kettenlänge (Molekulargewicht)
- Art des phasenbildenden Salzes
- Salzkonzentration
- pH Wert
- Temperatur⁶

Eine Untersuchung der Einflüsse dieser Parameter dient nicht nur dazu, die komplexe Verteilungsmechanismen besser zu verstehen, sondern erlaubt auch Rückschlüsse auf die Stabilität gegenüber veränderter Prozeßbedingungen, die vor allem im technischen Verfahren eine entscheidende Rolle spielt.

Betrachtet man die aufgeführten Parameter, können sich die unterschiedlichen Einflüsse auf das Phasensystem und somit auf die Zusammensetzung der einzelnen Phasen auswirken. So bedeutet eine Variation der PEG- oder Salzkonzentration ein Verrücken des Systempunktes im Phasendiagramm, während Änderungen des PEG Molekulargewichtes, der Temperatur oder des pH-Wertes zu einer Verschiebung der Binodale führen (Albertsson 1985; Frerix 2002). Andererseits können diese Parameter auch einen direkten Einfluß auf die Struktur und somit Oberflächeneigenschaften der Substanzen haben, deren Verteilung untersucht wird. Änderungen der Ladung, der Größe oder der Hydrophobizität wirken sich dadurch ebenfalls auf die Verteilung aus. So wurde in einer Arbeit von Ribeiro *et. al.* (2002) festgestellt, dass das PEG-Molekulargewicht zu einer

⁶ Ein Einfluß der Temperatur während der Extraktion wurde bereits unter 4.1 dargestellt.

Änderung der Plasmid-DNA Verteilung im ATPS führt. Dabei wurde vermutet, dass die Ursache auf eine strukturelle Änderung der Plasmid-DNA zurückgeführt werden kann, die bereits als sogenannte Coil-Globule Transition bekannt ist. Hierunter versteht man eine plötzlich auftretende Kontraktion von DNA Molekülen bei Verschlechterung der Lösungsbedingungen (Abbildung 4.9). Die mechanistische Begründung ist wie folgt: Der Kontakt der relativ hydrophoben PEG-Polymere mit der relativ hydrophilen DNA ist aus thermodynamischer Sicht ungünstig. Demzufolge verschlechtern sich die Lösungseigenschaften der DNA bei steigender PEG Konzentration zunehmend, so dass die Anziehung zwischen den DNA-Monomeren zunimmt. Ab einer gewissen PEG-Konzentration sind die Lösungseigenschaften der Umgebung so schlecht, dass es zu einer Kontraktion der zuvor relaxierten DNA kommt.

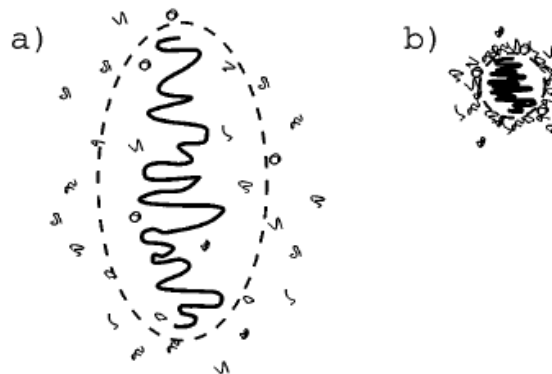


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der DNA-Konformation in Lösung mit PEG; a) Zustand guter Kompatibilität (Coil-Zustand); b) Zustand der Segregation (globule Zustand) (entnommen aus Vasilevskaya *et al.* 1995)

Aus biologischer Sicht kann man die Coil-Globule Transition als eine Art Datenkomprimierung verstehen. So nimmt das aus 4,2 Millionen Basenpaaren bestehende *E.coli* Chromosom beispielsweise etwa 1,4mm im expandierten Zustand ein, muß jedoch in eine nur wenige Mikrometer große Zelle untergebracht werden, was einem Kompressionsfaktor von etwa 1400 entspricht (Bloomfield 1997). Die in vivo Kompaktierung der DNA wird bei Eukaryoten durch Histonproteine erreicht (Zinchenko *et al.* 2004), während in vitro eine Vielzahl kondensierender Substanzen bekannt sind. Mechanistisch können letztere in zwei

unterschiedliche Gruppen aufgeteilt werden: Zum einen sind dies kondensierende Agenzien, die die Abstoßung zwischen den negativ geladenen DNA Segmenten vermindern. In wässriger Lösung sind für die Neutralisation der negativ geladenen Phosphatgruppen Kationen mit einer Ladung von 3+ (Spermin, 3+) oder höher (Spermidin, 4+) notwendig. In diesem Fall führt eine Neutralisation von 90 % der Phosphatladungen zur Kondensierung der DNA (Arscott *et al.* 1995). Zu der anderen Gruppe der kondensierenden Agenzien zählen jene, die die Wechselwirkung der DNA mit dem Lösungsmittel vermindern. Hierzu zählen neutrale Polymere, wie hohe Konzentrationen an PEG, die in der Anwesenheit einer ausreichenden Menge von (monovalenten) Salzen eine Kondensation der DNA hervorrufen können. Dieser Effekt wird ebenfalls für die Präzipitation von Nukleinsäuren eingesetzt.

Im Folgenden werden unterschiedliche Einflußfaktoren auf die Verteilung von pDNA untersucht und versucht, einen Zusammenhang zwischen der ermittelten Verteilung und der Coil-Globule Transition herzustellen.

4.2.2 Verteilungsstudien

a) PEG Molekulargewicht

Bei den Untersuchungen mit unterschiedlichen PEG Molekulargewichten (d. h. unterschiedlichen PEG 600/ PEG 1000 Mischungsverhältnissen) auf die Verteilung der Nukleinsäuren wurde ein signifikanter Effekt auf das Verteilungsverhalten von pDNA gefunden (Abbildung 4.10). Bei einem PEG_{MW} von 650 wurden sowohl pDNA als auch RNA zu über 80 % in die Oberphase verteilt. Eine vergleichsweise geringe Steigerung des PEG_{MW} von 650 auf 700 ergab eine signifikante Änderung des pDNA Verteilungskoeffizienten, der zu einer fast vollständigen Verteilung von pDNA in die Unterphase führte, während die Verteilung von RNA davon nicht beeinflusst wurde. Der Unterschied in der PEG Mischung von PEG 650 zu 700, der zu diesem Phasenwechsel führte, liegt bei einem etwa um 15 % gestiegenem PEG 1000 Anteil (Abbildung 2.1). Durch Erhöhung des PEG_{MW} von 700 auf 950 wurde die RNA Ausbeute in der Oberphase von 80 auf 53 % reduziert, während sie sich in der Unterphase auf 6 % erhöhte. Demnach lagen bei PEG 950 etwa 40 % der RNA präzipitiert als makroskopisch sichtbare Interphase vor und fehlen daher in

der gemessenen Bilanz. Auf die Verteilung von pDNA wirkte sich die weitere Steigerung des PEG_{MW} auf 950 nicht signifikant aus.

b) PEG Konzentration

Das Verteilungsverhalten von pDNA und RNA als Funktion der PEG-Konzentration ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Bei einer PEG-Konzentration zwischen 10 und 15 % w/w wurden über 80 % der pDNA in der Unterphase des Phasensystems lokalisiert. Bei einer Steigerung der Konzentration auf 20 % w/w befand sich die pDNA noch in der Unterphase, allerdings wurde eine Abnahme der gelösten pDNA Menge auf etwa 50 % gemessen. Dieser Anteil gelöster pDNA blieb in etwa auch bei einer Steigerung der PEG-Konzentration auf 25 % w/w erhalten, die Verteilung änderte sich jedoch vollständig in die Oberphase. Während die RNA bei 10 % w/w PEG in etwa gleich zu je 40 % in beide Phasen verteilt wurde, führte eine

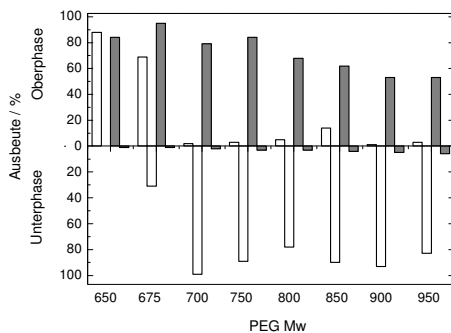


Abbildung 4.10: Einfluß PEG Mw auf Verteilung von pDNA und RNA; System 15 % w/w PEG, 20 % Phosphat, pH 7,4; RT; pDNA: weiß; RNA: grau

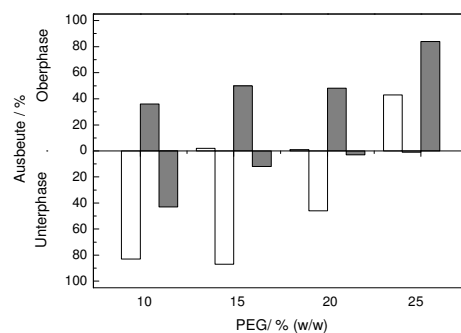


Abbildung 4.11: Einfluß PEG Konzentration auf Verteilung von pDNA und RNA; System PEG 800, 20 % Phosphat, pH 7,4; RT; pDNA: weiß; RNA: grau

Erhöhung der PEG-Konzentration auf 15 % zu einer Abnahme der RNA in der Unterphase auf etwa 10 % und nahm in der Oberphase auf etwa 50 % zu. Durch weitere Steigerung der PEG-Konzentration auf 25 % verteilte sich die RNA zu über 80 % in die Oberphase, während in der Unterphase keine RNA mehr gemessen wurde.

c) Kaliumphosphatkonzentration

Die Abhängigkeit der pDNA Verteilung von der Kaliumphosphatkonzentration wurde in Abbildung 4.12 wiedergegeben. Bei einer Kaliumphosphatkonzentration von 10 % w/w wurden etwa 50 % der pDNA in der Unterphase gemessen. Eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 15 % bewirkte eine gleichmäßige Verteilung von pDNA in beide Phasen, wobei sich jedoch nur etwa 30 % der pDNA in Lösung befanden. Durch weitere Steigerung der Phosphatkonzentration von 20 auf 25 % w/w erhöhte sich der Anteil der pDNA in der Oberphase auf etwa 50 %, wobei in der Unterphase nur noch sehr geringe Mengen gemessen wurden. Die Verteilung von RNA hingegen wurde durch die Änderung der Salzkonzentration nur gering beeinflusst und verteilte sich zu etwa 50-80 % mit einer zunehmenden Tendenz in die Oberphase.

d) pH Wert vom Kaliumphosphatpuffer

Seitens der Messungen zum pH- Einfluß (Abbildung 4.13) wurde zwischen pH 5,9 und 8,4 fast 90 % der pDNA in der Unterphase gemessen. Die RNA Ausbeute in der Oberphase nahm zwischen pH 5,9 und 6,9 von 40 auf 70 % zu und verblieb bei weiterer pH Steigerung auf diesem Niveau. Seitens der pDNA führte eine Erhöhung des pH-Wertes von 8,4 auf 9,1 zu einer signifikanten Reduktion der Ausbeute in der Unterphase von 89 auf 12 % und dadurch in der Oberphase zu einem Anstieg von 2 auf 68 %.

e) Temperatur

Der Einfluß der Temperatur wurde durch Verteilungsexperimente im Temperaturbereich zwischen 10 und 40 °C ermittelt (Abbildung 4.14). Während sich die pDNA für Temperaturen bis 15 °C vorwiegend in die Oberphase verteilte, bewirkte eine weitere Temperaturerhöhung auf 20 °C eine Verteilungsänderung in die Unterphase. RNA hingegen wurde über den gesamten Bereich hauptsächlich in der Oberphase nachgewiesen, zeigte jedoch mit steigender Temperatur ein ähnliches Verhalten wie bei der Variation des PEG_{MW}, nämlich eine zunehmende Präzipitation und Bildung einer makroskopisch sichtbaren Interphase. Über den gesamten Temperaturbereich wurde eine Abnahme der RNA-Ausbeute und damit Löslichkeit in der Oberphase von 100 auf etwa 40 % gemessen.

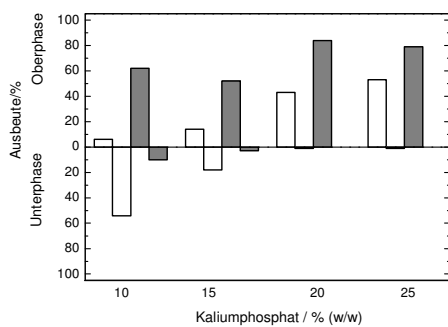


Abbildung 4.12: Einfluß der Kaliumphosphat-konzentration auf Verteilung von pDNA und RNA; System 25 % w/w PEG 800; pH 7,4; RT; pDNA: weiß; RNA: grau

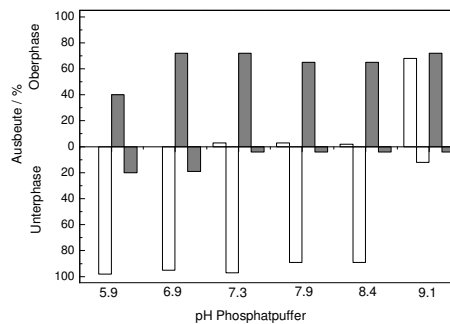


Abbildung 4.13: Einfluß pH Wert auf Verteilung von pDNA und RNA; System 15 % PEG 800, 20 % Phosphat; RT; pDNA: weiß; RNA: grau

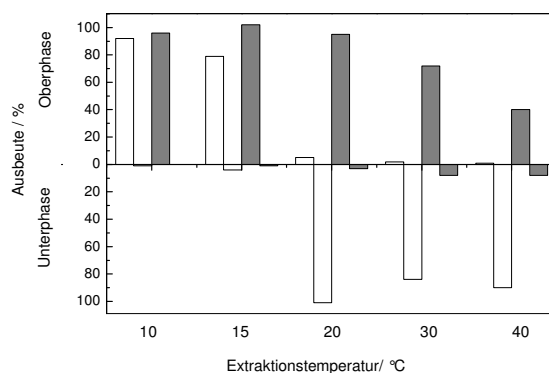


Abbildung 4.14: Einfluß der Extraktionstemperatur auf die Verteilung von pDNA und RNA; System 15 % w/w PEG 800; 20 % Kaliumphosphat; pH 7,4; pDNA: weiß; RNA: grau

Die durchgeführten Verteilungsstudien zeigen, dass Variationen der PEG- und Salzkonzentration eine allmähliche Änderung der Plasmid- Verteilung von der Unter- in die Oberphase bewirken, während eine geringfügige Änderung von pH-Wert, Temperatur oder PEG_{Mw} zu einem rapiden Wechsel von der Ober- in die Unterphase führt. Die Kenntnis über diese Umschlagpunkte von pDNA ist aus

prozeßtechnischer Sicht für die Entwicklung eines robusten Aufreinigungsverfahrens von Bedeutung und hat auch die Trennung von pDNA und RNA zur Folge. Darüber hinaus wurde diese Eigenschaft von pDNA und des Phasensystems zum Anlaß einer weitergehenden Untersuchung genommen.

4.2.3 Untersuchungen zur Löslichkeit von Plasmiden

Die Verteilungsstudien in 4.2.2 deuten an, dass die Löslichkeit der betreffenden Nukleinsäuren in der polymerreichen Oberphase eine wichtige Rolle spielt (Abbildung 4.14). Um dies genauer zu untersuchen, wurde ein Zweiphasensystem bei 10 °C angesetzt, bei dem pDNA in die Oberphase verteilt wird (Abbildung 4.14). Aliquots dieser Oberphase wurden anschließend in einem Temperaturbereich zwischen 10 und 20 °C inkubiert und für 5 min bei 15000g unter Beibehaltung der Inkubationstemperatur abzentrifugiert. Die Quantifizierung der pDNA Konzentration im Zentrifugationsüberstand dieser Aliquots aus der Oberphase wurde in Abbildung 4.15 dargestellt. Die pDNA Konzentration im Überstand wurde zwischen 10 und 17 °C nicht beeinflusst, eine weitere Erhöhung führte jedoch dazu, dass die Löslichkeit unter 5 µg/ml reduziert wurde. Ein analoger Versuch mit pDNA, die zuvor bei 20 °C in die Unterphase extrahiert wurde, zeigte infolge der Temperaturänderung keine Änderung der Löslichkeit (Abbildung 4.15). Damit liegt ein Zusammenhang zwischen pDNA Löslichkeit in der Oberphase und seiner Verteilung im Phasensystem vor.

Um die Effekte der einzelnen Systemparameter auf die pDNA Löslichkeit unabhängig von der Ausbildung des Phasensystems zu betrachten, wurde die Salzkomponekte für nachfolgende Versuche von Kaliumphosphat auf Kalium- oder Natriumchlorid geändert. Die beteiligten Konzentrationen wurden hierbei so gewählt, dass die Zusammensetzung aus PEG und K⁺ in etwa der einer entsprechenden Oberphase eines Phasensystems entspricht. Tabelle 4.1 listet die Zusammensetzungen der Ober- und Unterphasen der Systeme auf, die in der Verteilungsstudie zum Einsatz kamen.

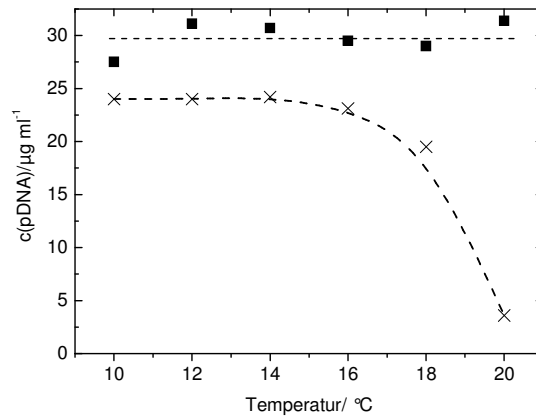


Abbildung 4.15: pDNA Konzentration im Zentrifugations-überstand (pDNA wurde zuvor bei 10 °C in die Oberphase bzw. bei 20 °C in die Unterphase extrahiert); (X) Oberphase; (■) Unterphase

Tabelle 4.1: Zusammenstellung der Konzentrationen von PEG 800, PO_4^{3-} und K^+ der Phasensysteme für die Verteilungsstudien und die Zusammensetzung der einzelnen Phasen. Die angegebenen PEG-Konzentrationen wurden aus dem Phasendiagramm aus Abbildung 1.12 entnommen; Kaliumkonzentrationen wurden flammenphotometrisch bestimmt

Gesamtzusammensetzung		Oberphase		Unterphase	
[PEG]	[K-Phosphat]	[PEG]	[K ⁺]	[PEG]	[K ⁺]
% w/w	% w/w	% w/w	mM	% w/w	mM
10	20	31	470	2	3450
15	20	41	325	1	3900
20	20	45	245	0,5	4750
25	20	51	205	0,5	5550
25	10	31	500	2	3350
25	15	42,5	305	0,5	4400
25	20	51	205	0,5	5600
25	25	56	135	0,2	6900

a) Abhängigkeit der pDNA-Löslichkeit vom PEG-Molekulargewicht

Abbildung 4.16 zeigt die pDNA Löslichkeit als Funktion vom PEG_{MW} bei 325 und 500 mM K⁺. Für 325 mM K⁺ wurde zwischen PEG 900 und PEG 1000 eine Reduktion der pDNA Löslichkeit von fast 100% auf unter 20% festgestellt. Bei 500 mM K⁺ trat diese Abnahme der Löslichkeit bereits zwischen den PEG Mischungen 650 und 750 auf. Vergleicht man die hier beschriebenen Löslichkeiten mit der Verteilung von pDNA in Abbildung 4.10, so liegt eine qualitative Übereinstimmung der Löslichkeitsänderung bei 500 mM K⁺ zwischen PEG 650 und PEG 700 mit dem ebenfalls dort eintretenden Phasenwechsel von pDNA vor.

b) Abhängigkeit der pDNA-Löslichkeit von der PEG-Konzentration

Eine Erhöhung der PEG-Konzentration bei unterschiedlichen K⁺-Konzentrationen (Abbildung 4.17) bewirkte eine deutliche Abnahme der Löslichkeit, die mit steigender K⁺-Konzentration stärker ausgeprägt war. Durch weitere Erhöhung der PEG Konzentration konnte diese Abnahme umgekehrt werden und der Anteil von pDNA in Lösung nahm wieder zu. Dabei war der Bereich des Löslichkeitsminiums bei 0,5 mM K⁺ am größten ausgeprägt, während die Löslichkeit bei 0,3 mM K⁺ nur geringfügig vermindert wurde. Das hier gefundene Löslichkeitsverhalten spiegelt sich in den Verteilungsversuchen mit steigenden PEG Konzentrationen wider (Abbildung 4.11). Eine sehr geringe Löslichkeit für die Zusammensetzung der Oberphase (31 % PEG, 470 mM K⁺) führte zu einer pDNA Verteilung in die Unterphase, wie im System mit 10 % PEG 800, 20 % Phosphat gemessen wurde. Bei einer Erhöhung des PEG- Anteils in der Oberphase auf 41 %, wie im System 15 % PEG 800, 20 % Phosphat vorzufinden ist, lag die pDNA Löslichkeit im Bereich zwischen 60 und 80 % (Abbildung 4.17). Eine weitere Steigerung des PEG- Anteils von 41 auf 51 % PEG in der Oberphase führte zu einer annähernd vollständigen Löslichkeit von pDNA (Abbildung 4.17), was in Abbildung 4.11 wiederum zu einer Verteilung in die Oberphase führte. Dabei ist zu erwarten, dass eine Zunahme der PEG Konzentration in der Oberphase von 31 auf 51 % zu einer gleichzeitigen Abnahme der K⁺- Konzentration von 470 auf 205 mM führt (Tabelle 4.1).

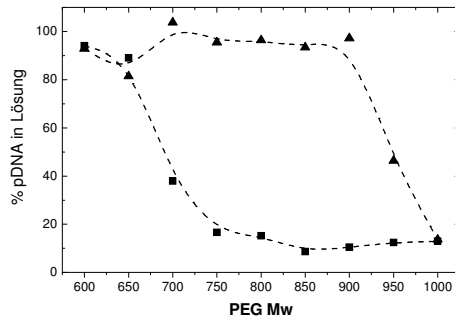


Abbildung 4.16: Einfluss des PEG_{Mw} auf die Präzipitation von pDNA (60 µg/ml); (▲) 41 % PEG; 0,325 M KCl; (■) 41 % PEG; 0,5 M KCl

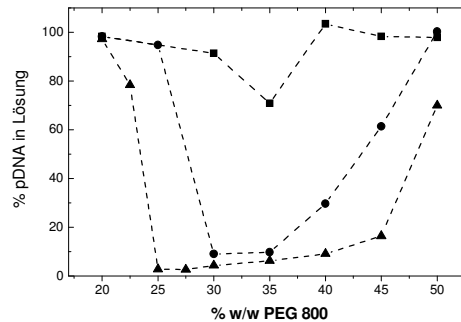


Abbildung 4.17: Einfluß der PEG-Konzentration auf die Präzipitation von pDNA (60 µg/ml); (■) 0,3M KCl, (●) 0,4M KCl; (▲) 0,5 M KCl

c) Abhängigkeit der pDNA-Löslichkeit von der K⁺-Konzentration

Die Löslichkeit von pDNA in Abhängigkeit von der K⁺-Konzentration ist in Abbildung 4.18 für PEG Konzentrationen von 35 und 41 % dargestellt. Bei beiden PEG Konzentrationen wurde eine deutliche Abnahme der Löslichkeit bei einer Steigerung der K⁺-Konzentration von 300 auf 500 mM festgestellt. Diese Zusammensetzung entspricht in etwa der Oberphase in den Verteilungsstudien mit 25 % PEG 800 und 10 bzw. 15 % K-Phosphat Systemen (Abbildung 4.12). In diesen Systemen wurde mit zunehmender K-Phosphatkonzentration eine Änderung der pDNA Verteilung von der Unter- in die Oberphase beobachtet.

Mit einer Zunahme der Gesamtposphatkonzentration im Phasensystem wird aufgrund des Binodalenverlaufes eine Abnahme der K⁺-Konzentration in der Oberphase erwartet. Dieser Zusammenhang wird auch im Phasendiagramm verdeutlicht (Abbildung 1.12) und ist zudem der Tabelle 4.1 zu entnehmen. Darin fällt ebenfalls eine Zunahme des PEG-Anteils mit einer Verringerung der K⁺-Konzentration in der Oberphase zusammen und verstärkt mit der gestiegenen Löslichkeit eine Verteilung von pDNA in diese Phase. Dabei hat die Erhöhung der PEG-Konzentration auf die Löslichkeit der pDNA einen geringeren Effekt als die Steigerung der K⁺-Konzentration, weshalb sich die beiden Kurven für 35 % und 41 % PEG nicht wesentlich unterscheiden (Abbildung 4.17). Innerhalb der in diesem Abschnitt untersuchten Parameter führte eine Zunahme der PEG Konzentration

von 31 auf 51 % außerdem zur Umkehr des Fällungseffektes und wird durch Abnahme der K^+ -Konzentration verstärkt (Abbildung 4.17).

d) Abhängigkeit der pDNA-Löslichkeit von der Temperatur

Zur Ergänzung der in Abbildung 4.15 dargestellten Ergebnisse wurde der Effekt der Temperatur auf die Löslichkeit von pDNA bei unterschiedlichen K^+ -Konzentrationen bestimmt (Abbildung 4.19). Eine deutliche Abnahme der Löslichkeit wurde zwischen 10 und 15 °C bei 500 mM K^+ ermittelt, während unter 25 °C bei 325 mM K^+ kein Einfluß beobachtet wurde, so dass erst bei einer Temperatur von über 30 °C eine Abnahme der Löslichkeit eintritt. Auch diese Ergebnisse spiegeln eine qualitative Übereinstimmung der pDNA Verteilung in Abbildung 4.14 wider.

Die Tatsache, dass bei den durchgeführten Löslichkeitsversuchen allgemein nur eine qualitative Übereinstimmung der PEG und K^+ -Konzentrationen mit den Verteilungsexperimenten vorzufinden war, wird damit begründet, dass jede Parameteränderung (Temperatur, PEGMw, pH, etc.) auch eine Änderung der K^+ - und PEG Konzentration in der Oberphase bedeutet. Für einen exakten Vergleich wäre somit eine Vielzahl von Analysen notwendig gewesen, wie sie für ausgewählte Systeme in der Tabelle 4.1 aufgeführt wurden. Ebenso wäre hierfür eine aufwendige Analyse der individuellen Verteilung der PEG 600 und PEG 1000 Fraktionen aus der gesamt PEG- Mischung erforderlich.

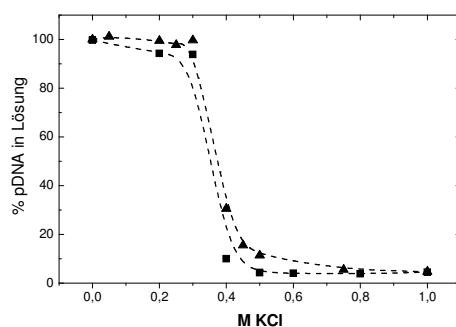


Abbildung 4.18: Einfluss der K^+ -Konzentration auf die Präzipitation von pDNA (60 µg/ml); (■) 35 % PEG 800; (▲) 41 % PEG 800

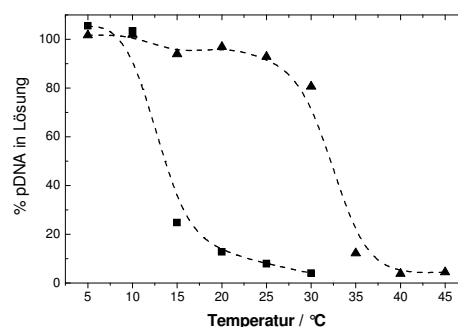


Abbildung 4.19: Einfluss der Temperatur auf die Präzipitation von pDNA (60 µg/ml); (▲) 41 % PEG; 0,325 M KCl; (■) 41 % PEG; 0,5 M KCl

4.2.4 Coil-Globule Transition

Die in 4.2.3 gezeigten Resultate lassen einen konkreten Zusammenhang zwischen der Löslichkeit von pDNA und seinem Verteilungsverhalten erkennen. Zudem wurde deutlich, dass die Löslichkeitseffekte unabhängig von den Zweiphasensystemen auftreten. Da geringe Änderungen der Parameter zu derart signifikanten Veränderungen führen, kann angenommen werden, dass hierfür starke Veränderungen der Oberflächeneigenschaften von pDNA verantwortlich sind (z. B. Ladungsänderungen).

In weiteren Löslichkeitsversuchen wurde KCl als SalzkompONENTEN durch NaCl ersetzt. Dadurch konnten die gewonnenen Ergebnisse aus den Löslichkeitsversuchen mit den Resultaten anderer Veröffentlichungen verglichen werden, die ebenfalls NaCl als SalzkompONENTEN verwendeten (Vasilevskaya et al. 1995; Melnikov et al. 1997; Yoshikawa et al. 1997; Murayama und Yoshikawa 1999; Yoshikawa 2001). Abbildung 4.20 zeigt hierzu die pDNA Löslichkeit als Funktion der Na^+ Konzentration für PEG 800 und PEG 8000. Dabei wurde eine signifikante Abnahme der pDNA-Löslichkeit ab einer Na^+ Konzentration von 80 und 200 mM für PEG 800 und PEG 8000 festgestellt. Die kritische Na^+ Konzentration ist bei identischer PEG Konzentration demnach 220 mM niedriger als für K^+ .

Die in der Abbildung 4.20b ermittelten Ergebnisse können nun mit einer Coil-Globule Untersuchung von Vasilevskaya et. al. (1995) verglichen werden. Die Abbildung 4.21 zeigt hierzu die kritische Konzentration für das Auftreten der Coil-Globule Transition von DNA als Funktion der NaCl und PEG Konzentration. Die Messung erfolgte dabei mit fluoreszenzmarkierter T4-Phagen DNA, deren Kontraktion in den globulären Zustand mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und ausgewertet werden konnte. Im Vergleich mit Abbildung 4.20b erkennt man, dass ab einer Konzentration von 100 mg/ml PEG 8000 und 200 mM NaCl die Löslichkeit von pDNA verringert wird und diese Zusammensetzung auch die kritische Konzentration für die Coil-Globule Transition der DNA ist. Demnach könnte dies ein Hinweis dafür sein, dass die verringerte pDNA Löslichkeit ebenfalls auf Coil-Globule Transition zurückgeführt werden kann und damit auch Ursache für das Verteilungsverhalten von pDNA sein könnte.

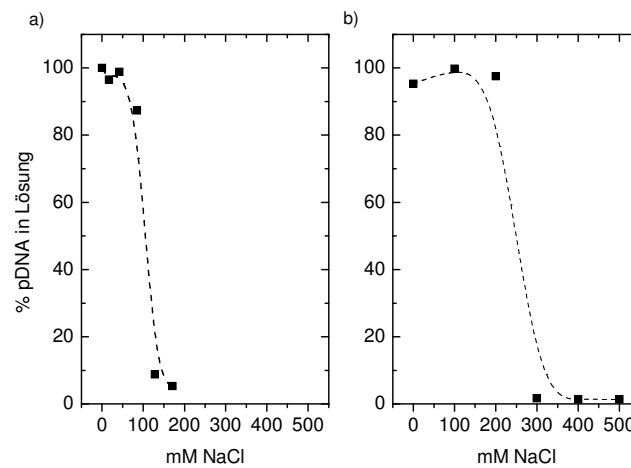


Abbildung 4.20: Abhängigkeit der pDNA Löslichkeit in PEG Lösungen von der NaCl Konzentration; a) 90 µg/ml pDNA gelöst in 41 % w/w PEG 800 und 0 - 170 mM NaCl; b) 90 µg/ml pDNA gelöst in 100 mg/ml PEG 8000 und 0 - 500 mM NaCl

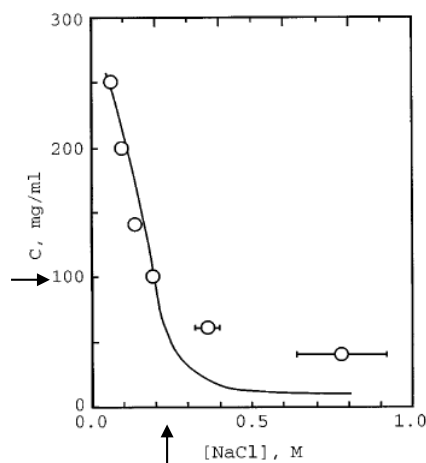


Abbildung 4.21: Abhängigkeit der kritischen Konzentration⁷ von der PEG 8000 (c) und der NaCl Konzentration; (O) experimentelle Daten; (—) Modell; (entnommen aus Vasilevskaya *et al.* 1995)

⁷ Kritische Konzentration: Zusammensetzung, die zur coli globule Transition der DNA führt (hier T4-DNA, 166 kbp)

Da die Coil-Globule Transition mit einer starken Kontraktion der DNA verbunden ist, sollten nachfolgende Versuche mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS; siehe 2.7) zeigen, ob auch in dem hier beschriebenen Fall eine Größenänderung von pDNA vollzogen wird. Eine direkte Messung der pDNA Konformation im Zweiphasensystem ist jedoch dadurch eingeschränkt, dass DLS extrem empfindlich gegenüber großen Partikeln (Staub) oder geringsten Trübungen reagiert. Diese Trübung in den separierten Phasen ist auf das Vorhandensein von Mikroemulsionen der anderen Phase zurückzuführen, die bereits bei geringen Temperaturveränderungen auftreten können. Demnach wurden die Messungen wiederum in Systemen mit PEG und NaCl durchgeführt, die nicht zur Phasenausbildung führen. Hierzu zeigt Abbildung 4.22 die gemessenen Größenverteilungen von pDNA als Funktion der NaCl Konzentration bei einer pDNA Konzentration von 100 µg/ml und 41 % PEG 800. Für NaCl Konzentrationen unter 50 mM wurde ein durchschnittlicher hydrodynamischer Radius im Bereich von 60-70 nm ermittelt, wohingegen bei 85 mM eine Zunahme auf etwa 100 nm erfolgte. Höhere NaCl Konzentrationen ergaben signifikant größere Radien >500 nm mit einer extrem breiten Größenverteilung. Diese NaCl Konzentrationen von >85 mM entsprechen denen aus Abbildung 4.20a, die zur Präzipitation von pDNA führen.

Die Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius von der pDNA Konzentration ist der Abbildung 4.23 zu entnehmen. Mit einer Abnahme der pDNA Konzentration von 50 auf 0,25 µg/ml konnte eine deutliche Verringerung der mittleren hydrodynamischen Radien von 700 auf 60 nm gezeigt werden. Ebenso verringerte sich die Breite der Größenverteilung.

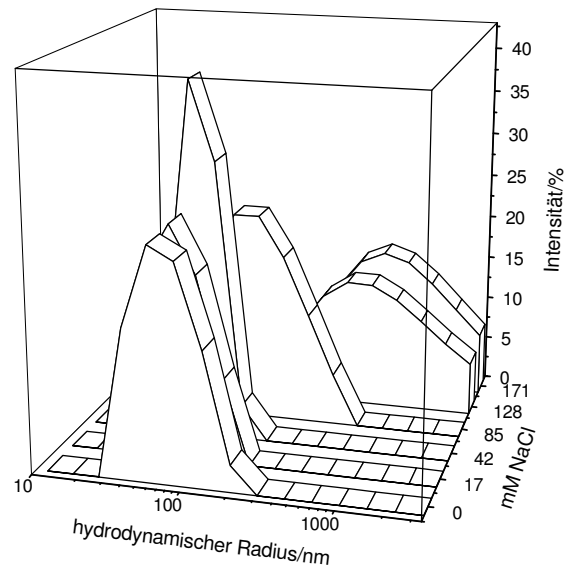


Abbildung 4.22: Partikelgrößenverteilung von pDNA und seinen Agglomeraten als Funktion der NaCl Konzentration; gemessen mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS); Probenzusammensetzung: 41 % PEG 800, 100 µg/ml pDNA und 0 - 0.5 M NaCl

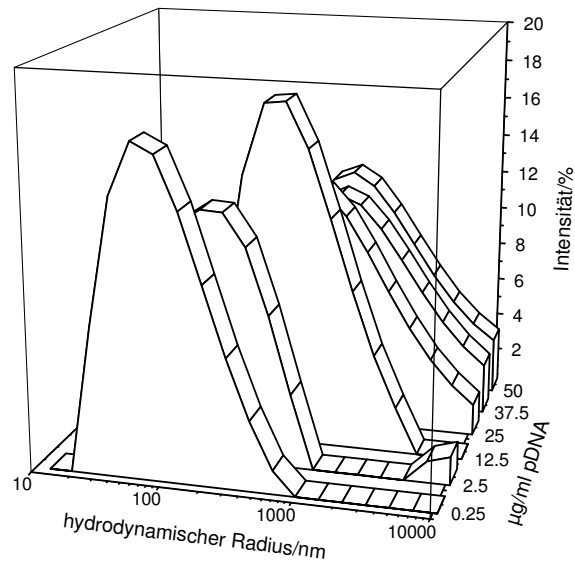


Abbildung 4.23: Plot der Partikelgrößenverteilung von pDNA Agglomeraten im globule state als Funktion der pDNA Konzentration; Zusammensetzung: 41 % PEG 800; 140 mM NaCl; 0,25- 50 µg /ml pDNA

4.2.5 Diskussion

Zusammenhang Löslichkeit und Coil-Globule Transition

Die im vorigen Abschnitt durchgeführten Versuche zeigen einen Zusammenhang zwischen der pDNA- Verteilung und der Coil-Globule Transition (Abbildung 4.24), die auch als psi- Kondensation verstanden wird. Letztere wird, wie bereits unter 4.2.4 beschrieben, auf den thermodynamisch ungünstigen Kontakt zwischen der „steifen“ DNA und dem „flexiblen“ PEG zurückgeführt. Bei kritischen Werten der PEG und Salz- Konzentration, der Temperatur und des pH- Wertes hat dieser Kontakt ein Zusammenziehen der DNA in die globuläre Konformation zur Folge. In Studien konnte gezeigt werden, dass die kritischen Werte, die zur DNA Kontraktion führen, mit der minimal freien Energie der DNA und der umgebenden Lösung beschrieben werden können (Vasilevskaya et al. 1995; Kleideiter und Nordmeier 1999). In diesem Ansatz wird die freie Energie der Mischung durch die klassische Flory-Huggins Theorie beschrieben, die auch gleichzeitig als Basis für die theoretischen Beschreibungen der Ausbildung und Verteilung in wässrigen Zweiphasensystem dient (Johansson *et al.* 1998).

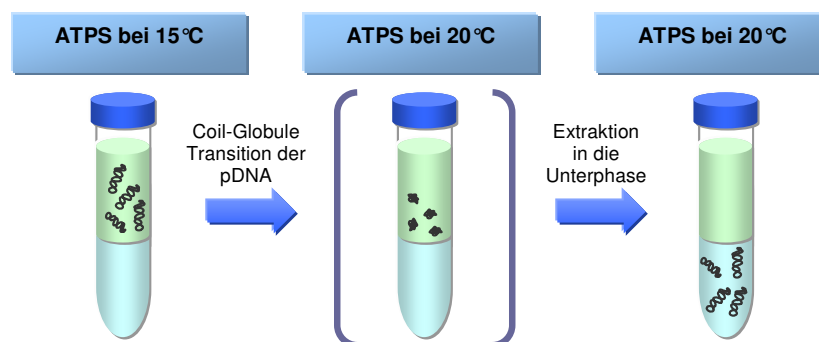


Abbildung 4.24: Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Coil-Globule Transition und Verteilung im ATPS

Aufgrund der hohen biologischen Bedeutung für die Zelle und auch für technische Anwendungen (Kompaktierung für späteren Gentransfer), wird das Phänomen der Coil-Globule Transition intensiv von mehreren Forschungsgruppen untersucht (Minagawa et al. 1994; Vasilevskaya et al. 1995; Yoshikawa et al. 1997; Murayama

und Yoshikawa 1999; Yoshikawa 2001). Hierzu wird DAPI markierte T4-DNA (166 kbp) mit einem Fluoreszenzmikroskop direkt visualisiert, so dass Größenänderungen unmittelbar zu beobachten sind. Die Auflösung dieser Methode reicht jedoch bei weitem nicht aus, um das in dieser Arbeit eingesetzte Plasmid pCMV β (6.7 kpb) ebenfalls zu visualisieren und damit zu untersuchen. So erstaunt es um so mehr, dass trotz der massiven Größenunterschiede und unterschiedlichen Strukturen die Fällung der pCMV β pDNA und die Coil-Globule Transition der T4 DNA in der gleichen Zusammensetzung (100 mg/ml PEG 8000, 200 mM NaCl, siehe Abbildung 4.20 und Abbildung 4.21) auftreten.

Die Messungen der hydrodynamischen Radien zeigen jedoch keine Kontraktion, sondern eine deutliche Größenzunahme, welche auf die Präzipitation von pDNA zurückzuführen ist. Diese Zusammenlagerung von pDNA im globulären Zustand führt zu einer weiteren Reduktion der effektiven Kontaktfläche zwischen der DNA und dem Lösungsmittel, weshalb bei der hier durchgeführten Messung keine Verkleinerung der Radien festgestellt wurde. Um eine Kontraktion von pDNA im globulären Zustand zu messen, müßte die Anziehung und damit die Agglomeration der pDNA Moleküle durch eine starke Verdünnung vermindert werden. Dass eine Verdünnung zu einer Abnahme der gemessenen Durchmesser führt, konnte in der Abbildung 4.23 gezeigt werden. Der gemessene hydrodynamische Radius ist jedoch bei geringer pDNA und hoher NaCl Konzentration signifikant höher als bei den Messungen mit geringer NaCl Konzentration (Abbildung 4.22). Eine tatsächliche Kontraktion und damit die Coil-Globule Transition konnte so nicht gemessen werden, da hierfür eine deutlich höhere Verdünnung wie bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen notwendig gewesen wäre. Für diese Anwendung reicht die Meßempfindlichkeit der DLS jedoch nicht aus. Dennoch ist der Zusammenhang zwischen Coil-Globule Transition und Präzipitation in der Literatur lange bekannt. Niedrige DNA Konzentrationen und relativ niedrige Konzentrationen kondensierender Agenzien führen zu einer Bildung einer löslichen, kolloidalen DNA Struktur im globulären Zustand, die nicht zur Aggregation neigt. Mit steigender Konzentration kondensierender Agenzien wird der kolloidale Zustand der kompaktierten DNA geschwächt, so dass DNA Partikel nach Kollision aneinander adsorbieren, Aggregate bilden und präzipitieren (Yoshikawa 2001; Makita und Yoshikawa 2002). Sedimentationsstudien mit PEO und Salz zeigen hierzu, dass in verdünnten DNA Lösungen die Kontraktion in

einem mehr oder weniger kompakten Zustand erfolgt (Lerman 1971), während eine Konzentrationssteigerung zur Kollision und Koaleszenz von Partikeln führt (Jordan et al. 1972). Dies bestätigt das Ergebnis, dass die Größe der auftretenden Aggregate eine Funktion der pDNA Konzentration ist (Abbildung 4.23).

Aggregierte DNA im globulären Zustand kann somit leicht durch Zentrifugation abgetrennt werden (Kleideiter und Nordmeier 1999), was schnelle Messungen von Konformationszuständen durch einfache Löslichkeitsversuche ermöglicht. Die Versuche unter 4.2.3 konnten zeigen, dass die Steigerung des PEG-Molekulargewichtes, der PEG und K^+ -Konzentration sowie der Temperatur jeweils den globulären Zustand begünstigen. Während die Lösung mit zunehmendem PEG Molekulargewicht oder Konzentration hydrophober wird, führt eine Erhöhung der K^+ -Konzentration zu einer verstärkten Neutralisation der sich gegenseitig abstoßenden, negativen Ladungen der DNA. Eine Verstärkung der Coil-Globule Transition durch Erhöhung der Temperatur wurde ebenfalls von Murayama und Yoshikawa (Murayama und Yoshikawa 1999) berichtet, die Ursache ist hingegen nicht vollständig geklärt.

Zusammenhang Löslichkeit und ATPS Verteilung

Die unterschiedliche Verteilung von Anionen und Kationen in Zweiphasensystemen führt zur Ausbildung einer elektrostatischen Potentialdifferenz an der Phasengrenzfläche (Albertsson 1985). In PEG/ Phosphat Systemen ist diese Potentialdifferenz positiv (siehe auch Tabelle 4.1), weshalb netto negativ geladene Biopolymere eine Verteilung in die PEG reiche Oberphase zeigen (Johansson et al. 1998). Darüber hinaus weist die Oberphase aufgrund des hohen PEG-Anteils eine relativ hydrophobe Umgebung auf. Infolge der Coil-Globule Transition werden Oberflächeneigenschaften der DNA signifikant verändert, was zum Beispiel für T4 DNA eine Verkleinerung des effektiven Volumens um den Faktor 10^4 bis 10^5 bewirkt (Yoshikawa 2001). Dies führt dazu, dass die effektive negative Ladung auf der Oberfläche um mehrere Zehnerpotenzen verringert wird.

Im Zweiphasensystem ist der Zustand von globulärer DNA in der Oberphase jedoch nicht faßbar. Es kommt statt dessen zu einer Verteilung in die Unterphase, in der die DNA den thermodynamisch günstigeren Coil-Zustand ausbilden kann. Die Faktoren, die zur Änderung der Löslichkeiten von pDNA führen, sind demnach

die gleichen, die die Verteilung im Zweiphasensystem beeinflussen und beruhen vermutlich auf Coil-Globule Transition. Damit könnten die Einflüsse von PEG_{Mw} und Temperatur auf das Verteilungsverhalten begründet werden, der Einfluß des pH Wertes ist jedoch noch nicht eindeutig bekannt. Da mit steigendem pH Wert im Phosphatpuffer das Verhältnis vom dibasischen Salz zum Monobasischen zunimmt, liegt auch eine höhere K⁺-Konzentration vor. Diese ist als Ursache für den Phasenwechsel eher anzunehmen, als Einflüsse infolge des höheren pH Wertes.

Der Zusammenhang zwischen Coil-Globule Transition und der pDNA Verteilung im Zweiphasensystem erklärt darüber hinaus die Abtrennung der RNA. Letztere tritt vorwiegend einzelsträngig auf und zeigt aus diesem Grund eine höhere Hydrophobizität⁸ (Diogo *et al.* 2001). Dies zeigt sich in der Retentionszeit im HIC Chromatogramm (Abbildung 2.4) und auch in seinem Verteilungsverhalten. Aufgrund der höheren Hydrophobizität nimmt RNA im Vergleich zur DNA erst bei höheren PEG_{Mw} bzw. PEG-Konzentrationen den globulären Zustand ein. Somit kann hierdurch eine Trennung zwischen RNA in der Oberphase und pDNA in der Unterphase erfolgen. Während nun der Phasenwechsel der pDNA von der Ober- in die Unterphase aufgrund Erhöhung von PEG_{Mw}, Temperatur und pH Wert damit beschrieben wurde, kann der Phasenwechsel für die Variation der PEG und Salzkonzentration hiermit nicht erklärt werden. Bei letzteren tritt ein Phasenwechsel der pDNA von der Unter- in die Oberphase auf. Hydrophobe Wechselwirkungen der pDNA mit PEG in der Oberphase können vernachlässigt werden, da sich die für die Wechselwirkung verantwortlichen kosmotropen Salze hauptsächlich in die Unterphase verteilen. Die Ursache spiegelt sich jedoch in den Löslichkeitsversuchen wider, in denen bei steigender PEG-Konzentration eine Erhöhung der pDNA Löslichkeit gemessen wurde, was als Globule-Coil Transition zu verstehen wäre. Demnach nimmt die Löslichkeit von pDNA in der Oberphase bei sehr hohen PEG-Konzentrationen wieder zu, wodurch eine Verteilung von der Unter- in die Oberphase erfolgt. Eine erneute Relaxation der DNA bei sehr hohen PEG-Konzentrationen wurde in der Arbeit von Vasilevskaya *et. al.* (1995) bestätigt, eine Begründung für diesen Vorgang ist jedoch nicht bekannt.

⁸ Der Zusammenhang wird in 4.3 näher erläutert

4.3 Entsalzung durch Membranadsorption

4.3.1 Einleitung

Der Prozeßschritt, der nach der Extraktion von pDNA in die Unterphase anschließt, hat in erster Linie die Aufgabe, eine Umpufferung bzw. Entsalzung zu leisten. Die Unterphase hat einen Anteil von etwa 30 % w/w Kaliumphosphat, was etwa einer 2 molaren Lösung entspricht. Standardverfahren zur Entsalzung sind

- Präzipitation
- Ultrafiltration/ Diafiltration (UF/DF)
- Gelfiltration

Ein Einsatz von Isopropanol, wie er gewöhnlich zur Fällung von DNA aus Hochsalzlösungen verwendet wird, kann hierbei nicht erfolgen. Hohe Konzentrationen kosmotroper Salze zusammen mit Isopropanol oder Ethanol sind nicht miteinander mischbar, was die erneute Ausbildung eines Zweiphasensystems zur Folge hat (Greve und Kula 1991). In dem resultierenden System liegt ein Teil der DNA präzipitiert in der Interphase vor, der übrige Rest befindet sich hauptsächlich in der unteren Salzphase.

Eine Entsalzung mittels UF/DF ist grundsätzlich möglich, aufgrund der relativ hohen Viskosität der Unterphase jedoch recht langwierig und technisch vergleichsweise aufwendig. Gelfiltration würde ebenfalls einen relativ großen technischen Aufwand bedeuten und führt in der Regel zu einer unerwünschten Verdünnung.

Eine Kombination der Zweiphasenextraktion von pDNA mit anschließender hydrophober Interaktionschromatographie wurde von Trindade et. al.(2005) beschrieben. Der dabei genutzte chromatographische Schritt führt zwar zu einem weiteren Aufreinigungseffekt von pDNA, eine Entsalzung war hingegen nicht möglich, da die pDNA unter Hochsalzbedingungen in 1,5 M Ammoniumsulfat eluierte.

Der nun folgende Abschnitt beschäftigt sich mit einem alternativen Entsalzungsverfahren, das auf reversibler Membranadsorption von pDNA basiert und sowohl im kleinen als auch im großen Maßstab durchführbar ist.

Die Tatsache, dass denaturierte DNA und Komplexe aus DNA und RNA an Nitrocellulose- und Nylonmembranen adsorbieren, wurde von Nygaard und Hall (1963) erstmals beschrieben und findet im analytischen Bereich in Form von Blottingtechniken breite Anwendung (Southern 1975).

Ein präparativer Nutzen dieser Eigenschaft wurde durch Levy et al. (2000) gezeigt. Bei Filtration einer Plasmidlösung durch einen Nitrocellulosefilter kann durch selektive Adsorption einzelsträngiger DNA der Gehalt an denaturierter gDNA von 27 auf unter 1 % gesenkt werden. Der zugrunde liegende Bindungsmechanismus ist nicht vollständig verstanden (Lui *et al.* 1996), vermutlich handelt es aber um hydrophobe Interaktion (Popovic und Wintzerith 1983; Dubitsky und Perreault 2004). Verglichen mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) zeigen einzelsträngige DNA (ssDNA) und RNA eine hydrophobere Oberfläche, die auf der Exposition hydrophober Basen zurückzuführen ist und damit eine höhere Retention auf der Membran bewirkt.

4.3.2 Ergebnisse

a) Adsorptionsversuche

Die in der Abbildung 4.25 gezeigten Filtrationsversuche ergaben, dass ab einer Konzentration von 28 % w/w Kaliumphosphat in der Filtrationslösung mehr als 95 % der eingesetzten pDNA adsorbiert wurden. Eine leichte Verringerung der Salzkonzentration auf 25 % führte zu einer Abnahme auf 70 % Adsorption, womit 30 % der pDNA im Filtrat vorlagen. Die Abhängigkeit der pDNA Adsorption vom Salz ist in der Abbildung 4.26 dargestellt. Hierzu wurden Filtrationsversuche mit unterschiedlichen Salzen in einer Konzentration von 2,3 M durchgeführt, die zum Kaliumphosphatpuffer in etwa äquimolar waren. Während das Filtrat der NaCl-Lösung fast 95 % der eingesetzten pDNA enthielt, wurden in den Filtraten mit Kaliumphosphat und Ammoniumsulfat keine pDNA gemessen. Diese konnten durch weitere Filtration von 5 ml TE Puffer zu >98 % von der Membran eluiert werden.

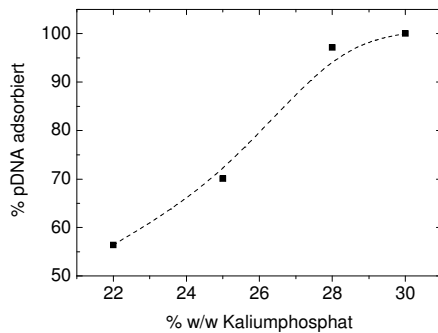


Abbildung 4.25: Adsorption von pDNA bei Filtration durch 0.2 µm Nylonmembranscheiben (25mm); je Probe wurden 4 ml mit 20 µg/ml pDNA filtriert und das Filtrat analysiert

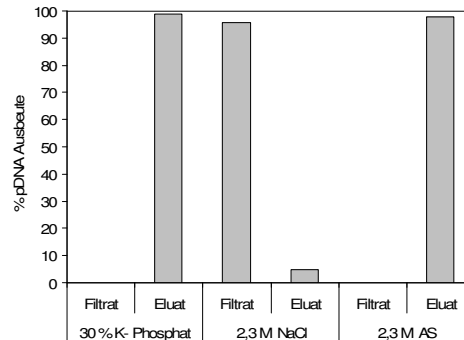


Abbildung 4.26: Einfluß der Salze auf pDNA Adsorption; je Ansatz 20 ml mit 9 µg/ml pDNA durch Nylonmembran (4,5 cm) filtriert, Elution adsorbierter pDNA durch anschließende Filtration von 5 ml TE-Puffer; AS= Ammoniumsulfat

b) Bestimmung dynamischer Kapazitäten

Ebenso wie bei der chromatographischen Verfahrensentwicklung, sind auch bei der Membranadsorption dynamische Kapazitäten ein wichtiges Kriterium für die Auslegung und Beurteilung von Verfahren. Die Bestimmung erfolgte mit sogenannten Durchbruchkurven, bei denen eine pDNA haltige Lösung (20 µg/ml) mit einer Salzkonzentration von 30 % w/w K-Phosphat (entspricht etwa der Salzkonzentration der Unterphase) durch hydrophobe Membranen filtriert wurden. Die pDNA Konzentrationen in den Filtratfraktionen (2 ml) wurden bis zur Erschöpfung der Bindungskapazität der Membran quantifiziert (Abbildung 4.27). Bei allen untersuchten hydrophoben Membranen wurden unter den gewählten Bedingungen pDNA Adsorption festgestellt, die resultierenden Kapazitäten variierten jedoch beträchtlich. Die niedrigste Kapazität wurde mit der GHP-Membran ermittelt, bei der es sich um hydrophilisiertes Polypropylen handelt. Die bestimmte dynamische Kapazität betrug hierbei 28 µg/cm² (Tabelle 4.2). Während eine mittlere Kapazität von 68 µg/cm² bei PVDF gemessen wurde, zeigten Nylon und Nitrocellulose mit etwa 85 µg/cm² die stärkste Adsorption. Um die Reversibilität der Adsorption zu untersuchen, wurde die membrangebundene

pDNA anschließend durch Filtration von TE Puffer eluiert und quantifiziert. Hierbei konnten 86 % Ausbeute für Nylon- und Nitrocellulosemembranen ermittelt werden. Die Ausbeuten bei PVDF und GHP lagen mit 14 und 26 % wesentlich niedriger.

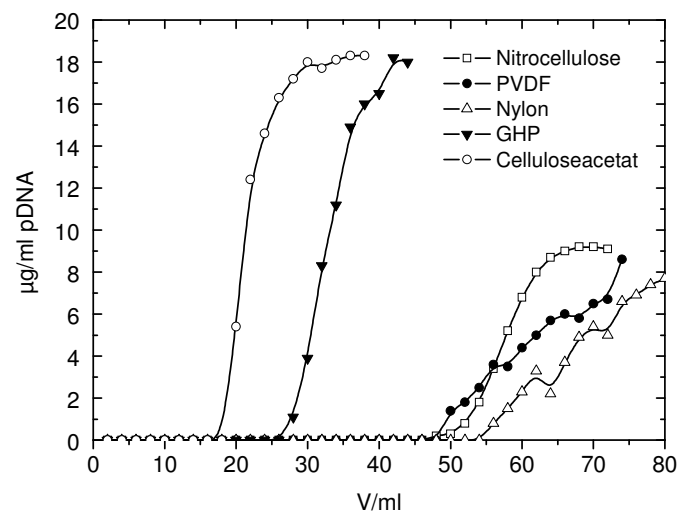


Abbildung 4.27: Durchbruchkurve von pDNA (20 µg/ml) in 30 % w/w Kaliumphosphat (pH 7,4) mit 12,5 cm² Scheibenmembranen

Tabelle 4.2: Dynamische Kapazitäten von pDNA auf hydrophoben Membranen, ermittelt aus Durchbruchkurven

Membran	q_{dyn} [µg/cm²]	Ausbeute nach Elution mit TE
Nylon	82	86 %
Nitrocellulose	86	86 %
PVDF	68	14 %
GHP	28	26 %
Celluloseacetat	33	81 %

c) Filtrationsversuche mit Unterphase

Für Versuche mit extrahierter pDNA wurde eine integrierte Zweiphasenextraktion mit Biomasse vorgenommen. Ein Teil der resultierenden Unterphase wurde dann für die Filtrationsversuche eingesetzt. Die HPLC-Chromatogramme (Abbildung

4.28) zeigen hierzu die Zusammensetzung des geklärten Lysates (a) sowie die der Unterphase (b). 10 ml dieser Unterphase wurden durch eine 0,2 μm Nitrocellulosemembran filtriert, anschließend wurde die Membran durch weitere Filtration von 5 ml TE Puffer gewaschen und die beiden Filtrate chromatographisch analysiert. Wie das Chromatogramm vom ersten Filtrat erkennen läßt (Abbildung 4.28 c), adsorbierte die pDNA fast vollständig an die Membran, während der Großteil der RNA und der Proteine nicht gebunden wurde. Wurden die Hochsalzbedingungen durch Filtration von TE Puffer entfernt, konnten etwa 95 % der pDNA im Eluat gemessen werden, wobei der RNA Gehalt im Vergleich zur Unterphase um ca. 86 % verringert wurde (Abbildung 4.28 d; Tabelle 4.3).

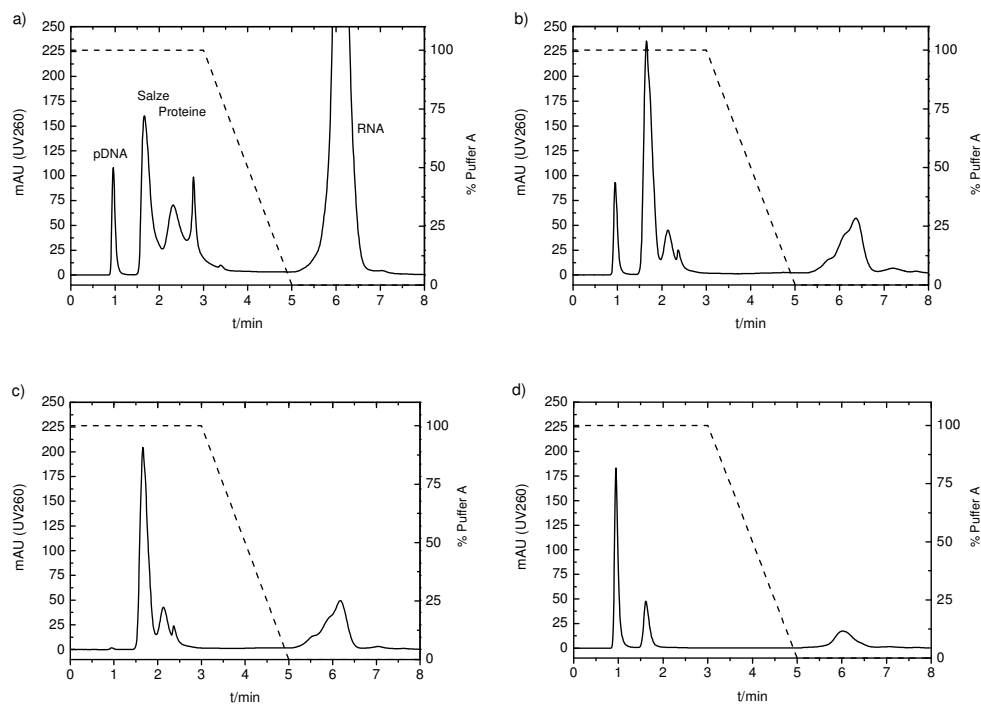


Abbildung 4.28: HPLC Chromatogramme (HIC) der pDNA Adsorption aus der Unterphase an Nitrocellulosemembranen (12,5 cm² Scheibenmembran); a) geklärtes Lysat; b) Unterphase nach Extraktion; c) Filtrat der Unterphase; d) Eluat nach Filtration von TE-Puffer

Tabelle 4.3: Ergebnisse der HPLC-Analyse (siehe Abbildung 4.28)

	V/ml	m(pDNA)/ μ g	m(RNA)/ μ g	pDNA Ausbeute	RNA Ausbeute
Unterphase	10	265	575	100 %	100 %
Filtrat	10	5	500	2 %	87 %
Eluat	5	250,5	82	95 %	14 %

d) Durchbruchkurven

Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten wurden in Durchbruchkurven untersucht, bei denen eine Unterphase, die pDNA und RNA enthielt, durch eine Nitrocellulosemembran filtriert wurde. Die resultierenden Filtratfraktionen wurden anschließend mittels HPLC analysiert. Die ermittelten Kurven (Abbildung 4.29) zeigen einen schnellen Durchbruch der RNA zu über 75 % in der ersten gemessenen Fraktion und einen fast vollständigen Durchbruch nach 10 ml (entspricht ca. 73 μ g RNA). Bei der pDNA wurde ein Durchbrechen erst nach der Filtration von 25 ml Unterphase (entspricht 600 μ g pDNA) verzeichnet. Dazu wurde ein Q_{dyn} Wert von 48 μ g/cm² ermittelt. Ähnliche Adsorptionscharakteristika wurden bei einem analogen Versuch mit einer 96 well Nylonfilterplatte gefunden. Dabei wurden nacheinander 100 μ l Fraktionen der Unterphase in ein und demselben Well filtriert und die Filtrate anschließend per HPLC analysiert. Abbildung 4.30 zeigt die erhaltene Durchbruchkurve, in der bis zu einem Filtrationsvolumen von 500 μ l (entspricht 13,5 μ g pDNA) keine pDNA gefunden wurde, wohingegen RNA bereits in den ersten 100 μ l zu etwa 65 % durchbrach. Die hierbei ermittelte dynamische Kapazität betrug 54 μ g/cm² und lag somit etwas höher als die für Nitrocellulose.

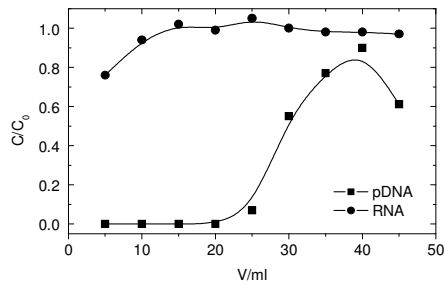


Abbildung 4.29: Unterphasen Durchbruchkurve mit 0,45 µm Nitrocellulosemembran (12,5cm²); HPLC- Analytik; $Q_{dyn} = 48$ µg/cm²; Unterphase enthielt 24 µg/ml pDNA und 26 µg/ml RNA

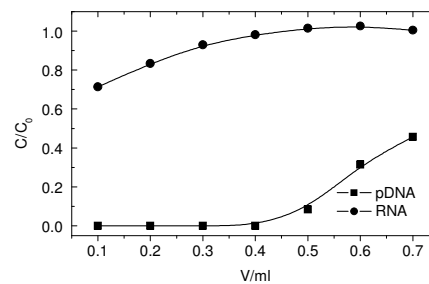


Abbildung 4.30: Unterphasen Durchbruchkurve mit 96 well Nylonfilterplatte; 0,25cm² (Acroprep, PALL); HPLC- Analytik; $Q_{dyn} = 54$ µg/cm²; Unterphase enthielt 27 µg/ml pDNA und 46 µg/ml RNA

e) Entfernung von Salzresten

Nach der Filtration der Unterphase durch Nylon oder Nitrocellulose ist die Membran noch befeuchtet und enthält somit Reste von Kaliumphosphatsalzen. Zur Entfernung dieser Salzreste, die in nachfolgenden Applikationen unerwünscht sein können, wurden Waschschrte mit Isopropanol/ Wasser Gemischen getestet. Hierzu wurden Versuche im 96 well Maßstab mit einer Nylonfilterplatte durchgeführt, bei denen nach der Filtration der Unterphase ein Waschschrte mit einem Isopropanol/ Wasser Gemisch durchgeführt und anschließend mit TE eluiert (Abbildung 4.31) wurde. Ohne Waschen ergaben diese eine pDNA Ausbeute von 96 % mit einer RNA Reduktion von etwa 70 %. Bei Isopropanolkonzentrationen in der Waschlösung unter 55 % v/v wurden nur sehr geringe Mengen pDNA und RNA im Eluat gemessen, was bedeutet, dass diese bereits beim Waschen von der Membran eluiert wurden. Bei Isopropanolkonzentrationen von 75 % v/v und höher konnten 90 % der pDNA im Eluat wiedergefunden werden, wobei der RNA-Gehalt im Vergleich zur Zusammensetzung der Unterphase um etwa 85 % reduziert wurde. Demnach wurden etwa 15 % der RNA durch den Waschschrte entfernt.

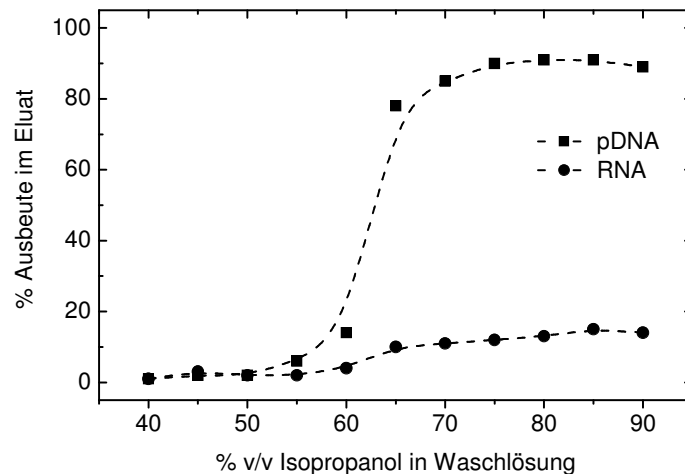


Abbildung 4.31: Abhängigkeit der pDNA und RNA Ausbeute im Eluat von der Isopropanolkonzentration im Waschschrift vor der Elution in 96 well Nylonfilterplatten. Die Unterphase enthielt 22 µg/ml pDNA und 77 µg/ml RNA, Ausbeuten ohne Isopropanolwaschschrift: 96 % pDNA, 32 % RNA

f) Gelelektrophoretische Darstellung und Bilanzierung

Zur Beurteilung der DNA Qualität vor und nach der Entsalzung mittels Membranadsorption (analog Abbildung 4.32) wurde eine gelelektrophoretische Analytik (Abbildung 4.32) durchgeführt, während die quantifizierende Analytik mittels HPLC erfolgte (Tabelle 4.4). Zwischen dem geklärten Lysat (Spur 1) und der Probe aus der Unterphase (Spur 2) ist eine deutliche Reduktion der RNA erkennbar. Bei der Extraktion wurde eine pDNA Ausbeute von etwa 86 % erzielt, während der RNA Gehalt um fast 82 % reduziert wurde. Im Filtrat nach Nylonmembranadsorption (0,45 µm, 12,5cm²) der Unterphase war keine pDNA im Gel erkennbar (Spur 3), was auch in der HPLC-Analyse bestätigt wurde. Nach dem Waschschrift und erfolgter Elution wurden annähernd 95 % der zur Filtration eingesetzten pDNA im Eluat wiedergefunden und etwa 85 % der verbliebenen RNA abgereichert. Dem läßt sich entnehmen, dass ungefähr 23 % der RNA durch den Waschschrift entfernt wurden. Das konzentrierte Eluat wurde in Spur 4 aufgetragen, wobei hier geringfügige gDNA Reste und auch niedermolekulare RNA erkennbar wurden. Insgesamt wurde durch Kombination von ATPS mit

Membranadsorption eine Gesamtausbeute von fast 82 % pDNA und eine Reduktion von über 97 % RNA im Vergleich mit dem geklärten Lysat erreicht.

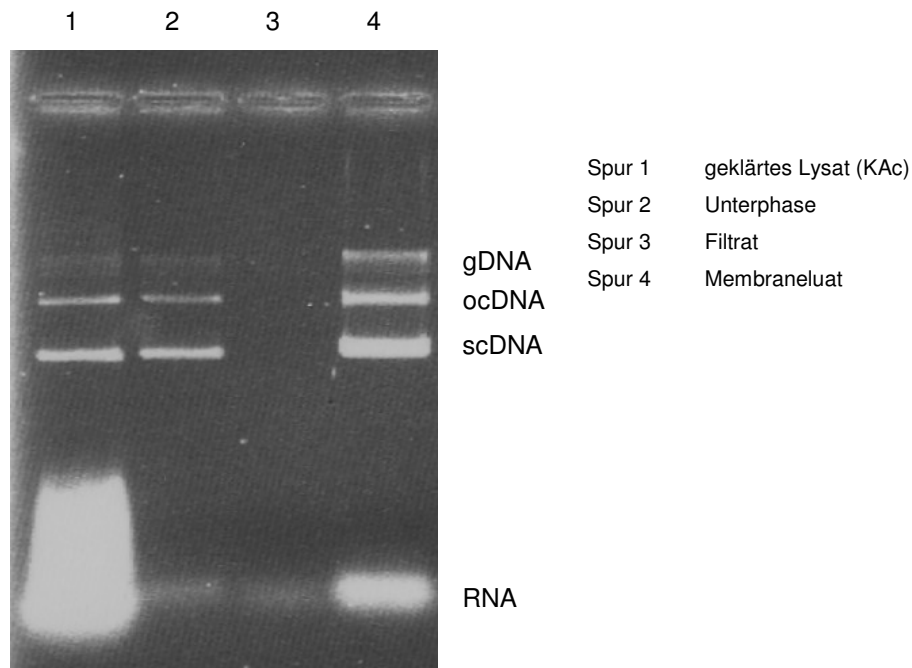


Abbildung 4.32: Agarosegelanalyse vom Membranadsorptions- und Entsalzungsprozeß mit Waschschrift (80 % v/v Isopropanol); siehe Tabelle 4.4; (Proben 1-3 wurden durch Isopropanolfällung entsalzt)

Tabelle 4.4: Resultate der HPLC Analyse zur Membranadsorption (siehe Abbildung 4.32); ATPS: 15 % PEG 800, 18 % Kaliumphosphat

	V/ml	m(pDNA)/ μ g	m(RNA)/ μ g	pDNA Stufen- ausbeute	RNA Stufen- ausbeute	pDNA Gesamt- ausbeute	RNA Gesamt- ausbeute
1g Biomasse	-	567	8500	100 %	100 %	100 %	100 %
Unterphase	25	489	1575	86.4 %	18.5 %	86.4 %	18.5 %
Filtrat	23	<0.1	978	<0.1 %	62 %	<0.1 %	11.5 %
Eluat	10	462	230	94.5 %	14.6 %	81.5 %	2.7 %

4.3.3 Diskussion

Die prinzipielle Durchführung zur Entsalzung mittels Membranadsorption zeigt Abbildung 4.33. Der Ablauf besteht analog der Chromatographie aus drei Schritten: der Beladung, dem Waschen und der Elution. Ein Equilibrieren der Membran hingegen ist nicht erforderlich, falls sich die Membran ursprünglich im trockenen Zustand befindet.

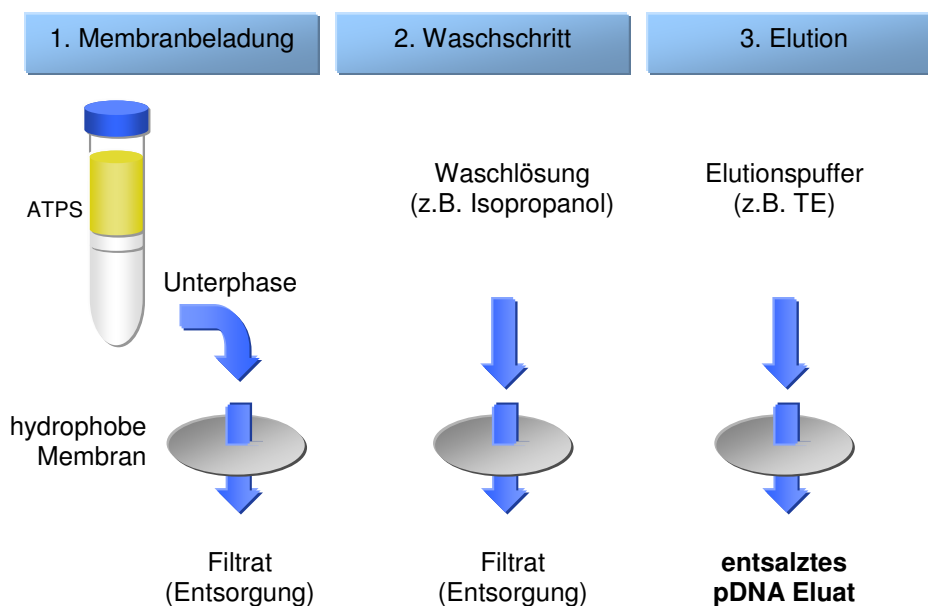


Abbildung 4.33: Prinzipieller Ablauf der Entsalzung mittels Membranadsorption

Während beim analytischen Blotting je nach Membran nur ein Bruchteil der eingesetzten DNA tatsächlich an die Membran bindet (Dubitsky und Perreault 2004), wurden für die präparative Anwendung Bedingungen gefunden, die zur vollständigen Adsorption der eingesetzten pDNA führen. Die Versuche zeigen, dass die Konzentration kosmotroper Salze in der Unterphase genau für diese Adsorption geeignet ist. Eine Interpretation der dabei zugrunde liegenden Bindungsart erweist sich als schwierig. Der Zusammenhang zwischen steigender Salzkonzentration und zunehmendem Adsorptionsverhalten deutet auf hydrophobe

Interaktion beim Bindungsprinzip hin (Abbildung 4.26). Demnach wird eine Membranadsorption nur in Gegenwart hoher Konzentrationen kosmotroper Salze (Kaliumphosphat, Ammoniumsulfat) festgestellt, was auf hydrophobe Interaktion als Bindungsmechanismus schließen läßt. Bei dem geringen Anteil adsorbierter pDNA in NaCl-Lösung könnte es sich um denaturierte DNA handeln, die aufgrund ihrer relativ hohen Hydrophobizität auch unter Niedrigsalzbedingungen adsorbiert (Levy *et al.* 2000). Zu einem anderen Ergebnis kommt folgende Schlußfolgerung: Betrachtet man die Elutionsreihenfolge im HIC Chromatogramm (Abbildung 4.28), so zeigt diese eine höhere Hydrophobizität der RNA im Vergleich zur pDNA. Hingegen weist pDNA im Vergleich mit Proteinen und vor allem RNA die stärkste Membranadsorption auf, obwohl diese im Chromatogramm die geringste Hydrophobizität erkennen läßt. Demnach zeigt die RNA eine geringere Bindungsaffinität zur Membran als pDNA, woraus der Abreicherungseffekt resultiert. Zwar können beide Systeme (HIC Chromatographie und Membranadsorption) aufgrund unterschiedlicher Salze und Matrix nicht direkt miteinander verglichen werden, der zur Adsorption führende Mechanismus ist jedoch nicht zwangsläufig reine hydrophobe Interaktion. Möglicherweise ist der durch kosmotrope Salze bewirkte Bindungsmechanismus eine Kombination von zwei Effekten: Stärkung der hydrophoben Interaktion und Abschirmung elektrostatischer Effekte der DNA.

Der Waschschrift führt zu einer Entfernung der für die Adsorption verantwortlichen kosmotropen Salze (Abbildung 1.1). Die daraufhin resultierende Bindung von pDNA an der Membran beruht somit auf Präzipitation. Da mit Isopropanol ein vergleichsweise unpolares Lösungsmittel eingesetzt wurde, kann hierbei gleichzeitig eine Entfernung hydrophober Verunreinigungen erfolgen, falls diese nicht kopräzipitieren. Letzteres führte jedoch dazu, dass eine vollständige Abtrennung der RNA hierbei jedoch nicht möglich war. Während bei Fällungen von Nukleinsäuren gewöhnlich 0,7 Volumen Isopropanol zugesetzt werden, was etwa 40 % v/v entspricht, reicht diese Konzentration zum Waschen nicht aus. Vermutlich sind wesentlich höhere Konzentrationen notwendig, da die Präzipitation von pDNA bei der kurzen Verweilzeit sehr schnell erfolgen muß und sie sonst bereits von der Membran gespült wird. In Vorversuchen wurden weitere Waschlösungen getestet, die eine selektive Fällung der pDNA bewirken sollten, während RNA in Lösung

bleibt und eluiert. Wie im Kapitel 3.3 beschrieben, bewirken bestimmte PEG-Salz Gemische unterschiedliche Löslichkeiten von pDNA und RNA, die auch zur Trennung im Zweiphasensystem führen. So wurden in Versuchen analog zu Kapitel 3.3.3 Bedingungen gefunden, in denen mit PEG und NaCl eine selektive Fällung der pDNA erreicht werden konnte. Als Waschlösung verwendet, war hingegen keine selektive Fällung der pDNA nachweisbar. Ebenso wie beim Isopropanol waren wesentlich höhere Konzentrationen von PEG erforderlich, die dann allerdings auch zur Fällung der RNA führten. Analoge Versuche mit CTAB (siehe auch 1.4.5) führten zu einem ähnlichen Ergebnis. Für die weitere Suche nach geeigneten Waschlösungen kann aufgrund der einfachen Durchführung der Filtrationsversuche der Einsatz von HTS-Methoden (High Throughput Screening) mit Pipettierrobotern hilfreich sein.

Hinsichtlich der dynamischen Kapazitäten und der Elutionsbedingungen schneiden Nitrocellulose- und Nylonmembranen mit $86 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ am besten ab (Abbildung 4.27). Abhängig von der restlichen RNA Konzentration kann sich dieser Wert jedoch verringern (Abbildung 4.29 und Abbildung 4.30). Die anderen getesteten Membranen zeigen bei den Versuchen vor allem den Nachteil der unvollständigen Elution (Tabelle 4.2), die auf höhere Bindungskräfte zwischen der DNA und der hydrophoben Membran schließen läßt. In diesem Fall sind Elutionsmittel mit geringer Polarität notwendig (z.B. verdünnte Isopropanollösungen), was für den Prozeß jedoch unerwünscht ist. Aufgrund der höheren chemischen und physikalischen Stabilität sind Nylonmembranen aus prozeßtechnischer Sicht die bessere Wahl. Die Verfügbarkeit in vielen unterschiedlichen Modifikationen (z.B. 96 well Filterplatten, Membranscheiben, Spritzenvorsatzfilter, Filterkapsulen und –kartuschen) ermöglicht darüber hinaus Flexibilität in der Anwendung und ein breites Einsatzspektrum (Abbildung 4.34).

Als Alternative zu den Membranen und zur Kapazitätssteigerung wurde in weiteren Vorversuchen der Einsatz von Nitrocellulosewatte und Polyamidharzen zur Adsorption der pDNA aus der Unterphase getestet. Diese wurden jedoch nicht weiter verfolgt,

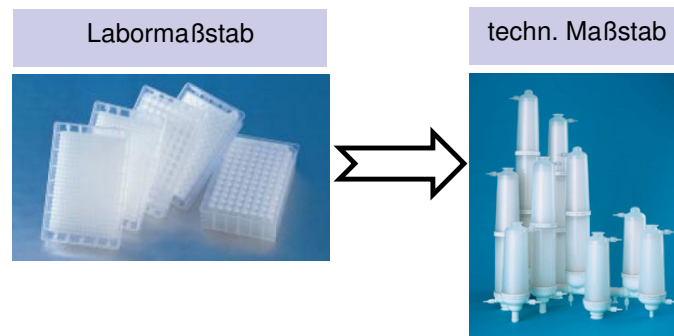


Abbildung 4.34: Verfügbarkeit von Nylonmembranen für Kit- Applikationen (96 well Filterplatten) und Produktion (Filterkapsulen)

da der Zugewinn an Bindungskapazität verhältnismäßig klein und eine Elution der pDNA von der relativ hydrophoben Oberfläche der Polyamidharze nicht möglich war.

Insgesamt zeichnet sich das beschriebene membranchromatographische Verfahren dadurch aus, dass die Entsalzung zusammen mit einem Aufreinigungs- und Konzentrierungseffekt erfolgen kann. Was die fluiddynamischen Eigenschaften der Membranadsorption betrifft, hat diese zahlreiche Vorteile gegenüber der klassischen Säulenchromatographie (Ghosh 2002). Der Druckverlust bei der Chromatographie im gepackten Bett ist je nach Kompressibilität der stationären Phase relativ hoch und nimmt aufgrund der weiteren Verdichtung des Bettes im Laufe des Prozesses zu. Eine weitere erhebliche Limitierung ist die Abhängigkeit von der intra-partikulären Diffusion für den Stofftransport der Substanzen zur Bindungsstelle (Ligand). Diese führt zu einer erheblichen Verlängerung der Prozeßzeit, da dieser Transport vor allem bei sehr großen Makromolekülen wie Plasmide sehr langsam ist. Dies hat unter anderem eine Vergrößerung des Elutionsvolumens zur Folge. Kanalbildung und Verteilungsprobleme bei der Maßstabsvergrößerung sind weitere Probleme, die im großtechnischen Maßstab auftreten.

Viele dieser Limitierungen existieren für die Membranchromatographie nicht. Bei diesen Prozessen basiert der Stofftransport hauptsächlich auf Konvektion, wodurch Prozeßzeiten und Elutionsvolumina vermindert werden. Der schnelle

Stofftransport, der geringe Druckverlust und die Tatsache, dass die Kapazität über einen großen Bereich unabhängig von der Flußrate ist, erlauben somit hohe Durchsätze (Zhang et al. 2003). Zudem sind membranbasierte Trennverfahren relativ leicht zu skalieren, und können in dem hier vorliegenden Fall sowohl großtechnisch in Form von Kapsulen (siehe 4.5) als auch im kleinen Maßstab als Filterplatten (siehe 4.6) eingesetzt werden. Da für den Adsorptionsprozeß Membranen verwendet werden, die eigentlich zur Partikelrückhaltung entwickelt wurden, erscheint eine weitere Steigerung der Kapazität und der Selektivität durch Optimierung der Membraneigenschaften und der Oberflächenchemie durchaus möglich. Darüber hinaus erscheint die Kombination aus Zweiphasenextraktion mit anschließender Membranadsorption aus der Unterphase auch für andere Aufreinigungsverfahren (Proteine, Antikörper) möglich und sinnvoll.

4.4 Feinreinigung mittels wässriger Zweiphasenextraktion

4.4.1 Einleitung

Die Extraktion von pDNA im ATPS mit anschließender Entsalzung über Membranadsorption führt zu einer deutlichen Reduktion der Kontaminanten wie RNA und Proteine, für eine humantherapeutische Anwendung ist die Reinheit und Qualität allerdings noch nicht ausreichend (siehe auch 1.4.6). Wie Abbildung 4.32 zeigt, enthält das konzentrierte Eluat (Spur 4) neben der scDNA auch ocDNA, gDNA und niedermolekulare RNA. Insbesondere die Abtrennung der ocDNA und gDNA von der scDNA stellt im Downstream Processing die größte Herausforderung dar, die in der hohen Ähnlichkeit der unterschiedlichen DNA-Spezies begründet liegt. Einige Verfahren aus dem Stand der Technik, die zur Abtrennung von gDNA und ocDNA dienen, wurden bereits unter 1.4.5 vorgestellt. Diese basieren zumeist auf chromatographischen Methoden (HIC), die relativ aufwendig und teuer sind (rel. geringe Kapazität, hohe Verluste, hoher Salzbedarf). In diesem Kapitel wird ein alternatives Verfahren vorgestellt, das die reversible Denaturierung mit einer anschließenden Zweiphasenextraktion kombiniert und in diesem Zusammenhang Feinreinigung mittels ATPS verstanden wird. Das Prinzip dieser Trennung ist auf der reversiblen Denaturierung von scDNA nach Einwirkung alkalischer Bedingungen und anschließender Neutralisation begründet, während gDNA und ocDNA größtenteils irreversibel denaturiert werden. Durch anschließende Zweiphasenextraktion im PEG/ Kaliumphosphatsystem wird die denaturiert DNA von der nativen scDNA abgetrennt.

Diese Methode beruht auf der bekannten reversiblen Denaturierung der scDNA (Rush und Warner 1970), die ebenso die Grundlage der nach Birnboim und Doly (1979) beschriebenen alkalischen Lyse ist. Während dieser alkalischen Denaturierung kommt es zur Entwindung der scDNA Struktur und in einigen Segmenten zu einer Schwächung der Wasserstoffbrückenbindung des Doppelstrangs, die zur Trennung in Einzelsträngen führt. Bei pH Werten unter 12,5 verbleiben einige Segmente (vor allem GC-reiche Regionen) doppelsträngig (anchor base pairs) und verhindern zusammen mit der sterischen Stabilisierung

infolge des Supercoilings eine vollständige Trennung der komplementären Basen. Die Trennung der Doppelstränge wird hierbei durch die abstoßende Wirkung der negativ geladenen Phosphatgruppen beider Stränge verstärkt. Bei der nachfolgenden Neutralisation (hier durch Zugabe des Kaliumphosphatpuffers) dienen verbliebene doppelsträngige Bereiche als Ursprung für eine vollständige Renaturierung der scDNA. Im Gegensatz hierzu werden andere doppelsträngige DNA, wie lineare chromosomale Fragmente, gDNA und ocDNA, irreversibel denaturiert und verbleiben auch unter nativen Bedingungen zumindest partiell einzelsträngig. Das Ergebnis dieser selektiven Denaturierung ist, dass sich nun ocDNA und gDNA in Form von ssDNA erheblich in den Oberflächeneigenschaften von nativer doppelsträngiger scDNA unterscheiden. Während bei doppelsträngigen Nukleinsäuren die hydrophoben aromatischen Basen durch den komplementären Strang abgeschirmt werden, sind diese bei einzelsträngigen (denaturierte DNA und RNA) freiliegend. Daraus resultieren erhebliche Unterschiede in der Hydrophobizität, die für eine nachfolgende Trennung z.B. mittels hydrophober Interaktionschromatographie (Diogo *et al.* 1999) genutzt werden können. Die unterschiedliche Verteilung nativer und denaturierter DNA in PEG Dextran Systemen wurde zudem von Pettijohn *et. al.* (1967) und Ohlsson *et. al.* (1978) untersucht, ein präparative Anwendung wurde allerdings nicht beschrieben.

4.4.2 Ergebnisse

a) Einfluß der NaOH- Konzentration auf die Denaturierung

Zunächst wurde mittels Zweiphasenextraktion und Membranadsorption eine entsalzte Plasmidpräparation angefertigt, die in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt wurde (Abbildung 4.35, Spur 1). Während diese Plasmidpräparation noch gDNA, ocDNA und RNA enthielt, konnte die RNA in der nachfolgenden Extraktion bereits ohne Denaturierung abgetrennt werden (Spur2). Eine Abtrennung der gDNA und ocDNA wurde erst bei einer NaOH Konzentration von 100 mM im Denaturierungsansatz erzielt (Spur 4). gDNA war daraufhin nicht mehr im Gel detektierbar, während der oc Anteil von etwa 15 % auf 5 % reduziert werden konnte (Abbildung 4.36). Eine weitere Steigerung der NaOH Konzentration machte sich erst bei 300 mM bemerkbar, wobei die scDNA Bandenintensität deutlich nachließ und eine schwache Bande unterhalb der scDNA erkennbar wurde.

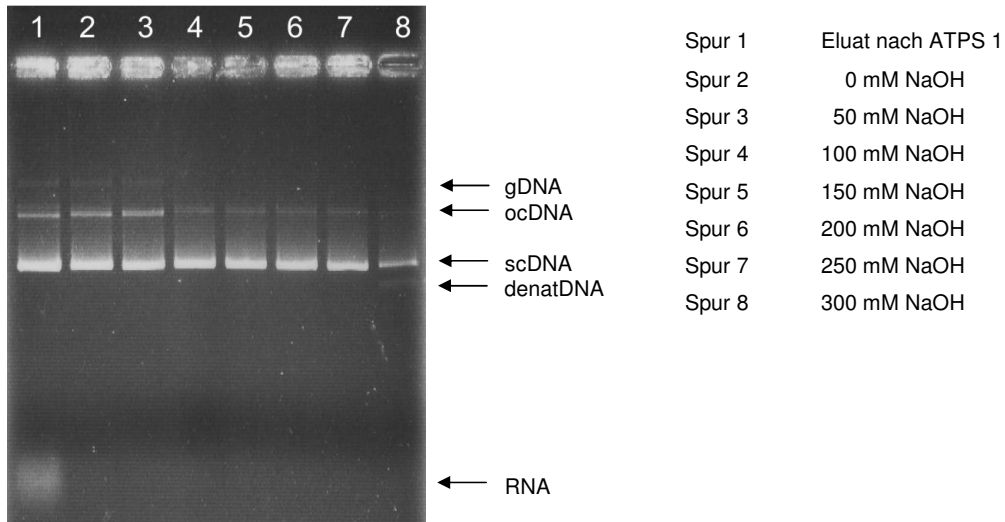


Abbildung 4.35: Einfluß der NaOH Konzentration während der alkalischen Denaturierung auf den ocDNA Gehalt nach der Extraktion; Proben 2- 8 wurden 5 min bei angegebener NaOH-Konzentration denaturiert und anschließend im ATPS 2 (15 % PEG 800, 18 % K- Phosphat) extrahiert. Die Unterphasen wurden mittels Membranadsorption entsalzt und auf das Gel aufgetragen.

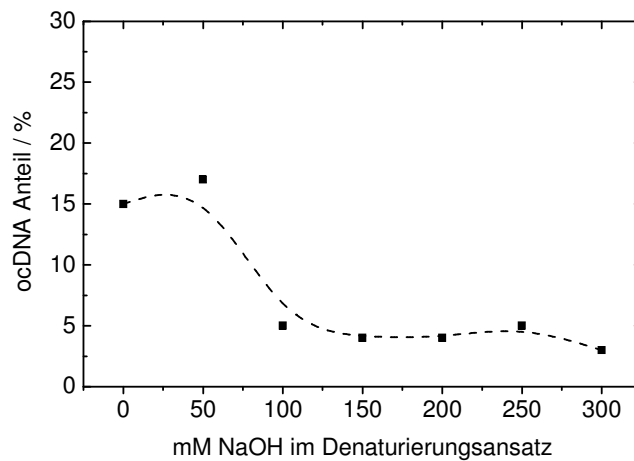


Abbildung 4.36: Abhängigkeit ocDNA Anteil bei der Feinreinigung mittels ATPS von der NaOH Konzentration bei der alkalischen Denaturierung; Densitometrische Auswertung der Abbildung 4.35

b) Denaturierungsdauer

Den Einfluß der Denaturierungsdauer zeigt Abbildung 4.37. Auch hierbei wurde durch die zweite Extraktion ohne Denaturierung eine Abreicherung der restlichen RNA erzielt, der Anteil an gDNA und ocDNA hingegen wurde nicht verändert (Vergleich Spur 1 mit 2). Dem entgegen führte bereits eine alkalische Inkubationsdauer von etwa 5 Sekunden zu einer deutlichen Reduktion der gDNA (Spur 3). Der Anteil der ocDNA wurde dabei von etwa 28 % auf unter 10 % gesenkt (Abbildung 4.38). Eine weitere Verlängerung der Inkubation bis zur Neutralisation mit dem Phosphatpuffer führte erst nach 10 min zu einer leichten Verringerung der scDNA Bandenintensität.

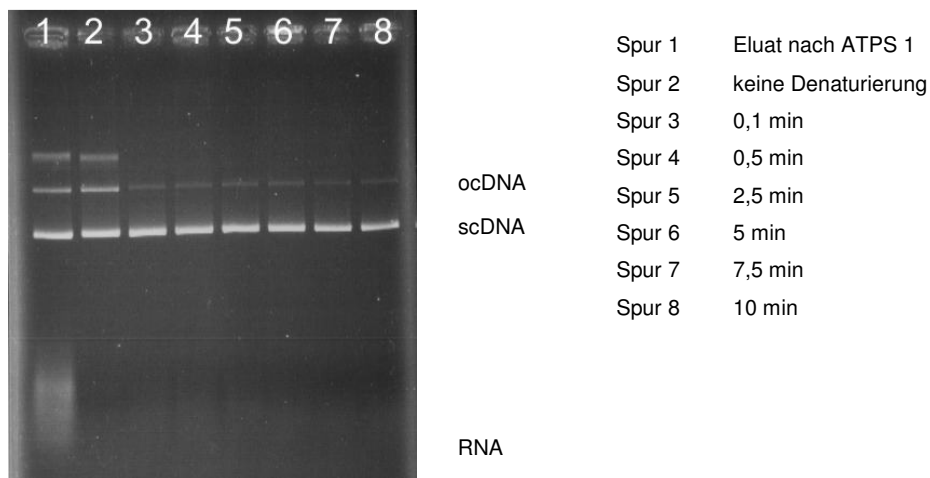


Abbildung 4.37: Einfluß der Inkubationsdauer während der alkalischen Denaturierung auf den ocDNA Gehalt nach der Extraktion; Proben 3- 8 in einem Ansatz mit 100 mM NaOH bei angegebener Zeit inkubiert und anschließend im ATPS 2 (15 % PEG 800, 18 % K-Phosphat) extrahiert. Die Unterphasen wurden mittels Membranadsorption entsalzt und auf das Gel aufgetragen.

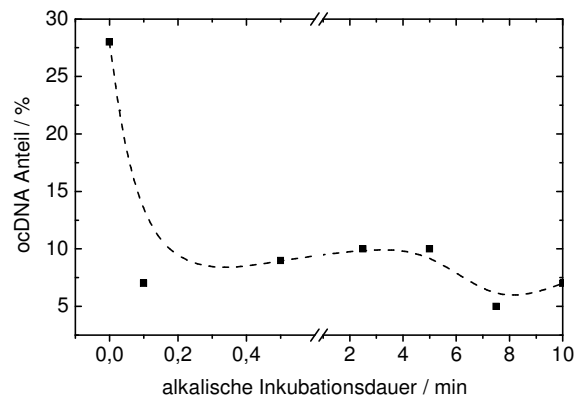


Abbildung 4.38: Abhängigkeit ocDNA Anteil bei Feinreinigung mittels ATPS von der Inkubationsdauer bei der alkalischen Denaturierung; Densitometrische Auswertung der Abbildung 4.37

c) Bestätigung der Ergebnisse mit SYBR GREEN2 Farbstoff

Alternativ zu Ethidiumbromid wurde ein Agarosegel exemplarisch mit SYBR GREEN 2 gefärbt (Abbildung 4.39). Dieses Gel zeigt eindeutig die Abnahme der Bandenintensität oberhalb der scDNA zwischen den Proben vor (Spur 2-4) und nach der Feinreinigung mittels ATPS (Spur 5-7). Ob es sich bei der betreffenden Bande um gDNA oder ocDNA handelt, ist nicht klar. Aufgrund der schlechten Trennung im hochmolekularen Bereich (siehe 1 kb Leiter in Spur 1) laufen gDNA und ocDNA möglicherweise zusammen.

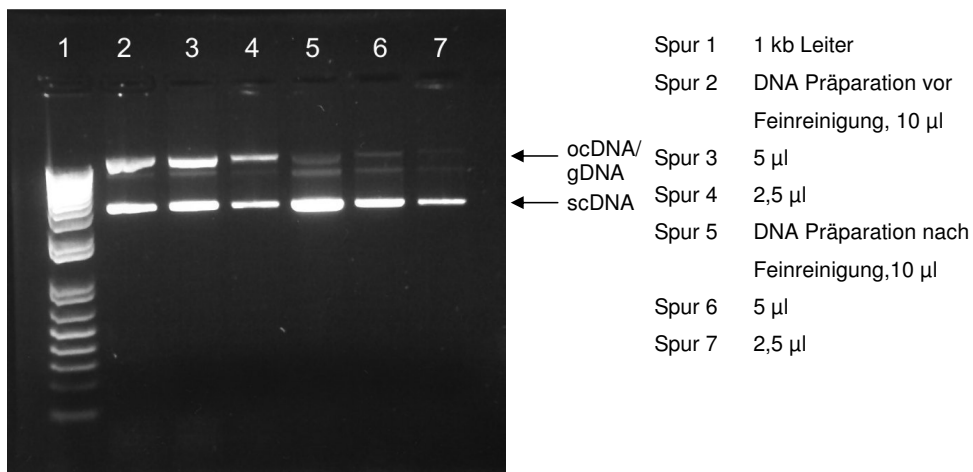


Abbildung 4.39: Nachweis der ssDNA Abreicherung mittels SYBR GREEN 2 Färbung; Bedingungen: 100 mM NaOH, 5 min Inkubation; Extraktion in 15 % PEG 800, 18 % K-Phosphat; Entsalzung durch Membranadsorption; SYBR GREEN® 2 Färbung, prestainin

d) Thermische Denaturierung

Der Einfluß einer thermischen Denaturierung wurde in zusammengesetzten Systemen (bestehend aus ocDNA, scDNA und gDNA) bei unterschiedlichen Temperaturen mit anschließender Extraktion im Zweiphasensystem untersucht (Abbildung 4.40). Während Temperaturen zwischen 22 und 75 °C (Spur 2-4) keinen Einfluß auf die Zusammensetzung erkennen ließen, führte eine weitere Steigerung der Temperatur auf über 80 °C (Spur 5) zu einer Abnahme des ocDNA Anteils von etwa 25 % auf 5 – 10 % (Abbildung 4.41). Dabei wurde ebenfalls der gDNA Anteil unterhalb der Nachweisgrenze durch Ethidiumbromidfärbung verringert. Die Intensität der scDNA Bande wurde bis zu einer Temperatur von 90 °C nicht signifikant verändert, während eine weitere Erhitzung zu einer leichten Abnahme führte. Bei der Extraktion der Proben 5-8 fiel eine deutliche Interphase auf, die auf abgetrennte denaturierte DNA schließen ließ.

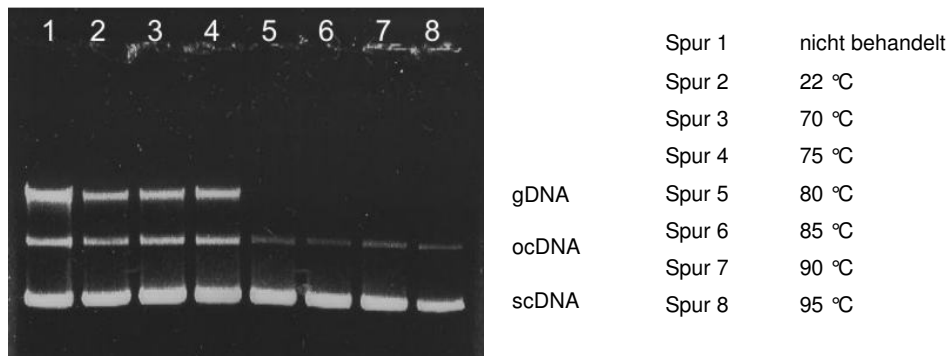


Abbildung 4.40: Einfluß der Denaturierungstemperatur auf den oc und gDNA Gehalt nach der Extraktion; 5 min Inkubation, dann auf Eis abgekühlt; gespiktes System (100 µg/ml pDNA, 50 µg/ml gDNA in TE); Die Unterphasen wurde mittels Membranadsorption entsalzt und auf das Gel aufgetragen.

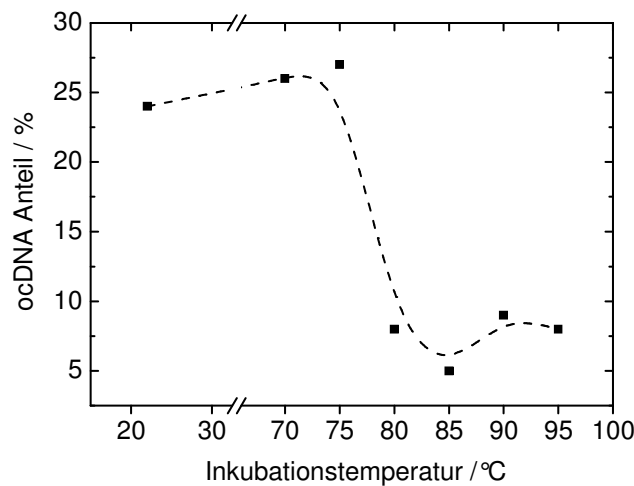


Abbildung 4.41: Abhängigkeit ocDNA Anteil bei Feinreinigung mittels ATPS von der Inkubationstemperatur; densitometrische Auswertung der Abbildung 4.40

e) Feinreinigung mittels ATPS im Labormaßstab

Zusammen mit den unter 4.4.2 ermittelten Parametern wurde die Aufreinigung von scDNA im kleinen Maßstab erprobt. Hierzu zeigt Abbildung 4.42 das zugehörige Agarosegel mit Proben vor und nach der Feinreinigung mittels ATPS. Die entsalzte plasmidhaltige Ausgangslösung (Spur 2+3) wurde durch die oben beschriebene Grobreinigung mittels ATPS gewonnen, wobei durch eine Verlängerung der Neutralisationsdauer absichtlich ein hoher oc Anteil von etwa 25 % generiert wurde (siehe Abbildung 4.3). Für die alkalische Denaturierung wurden Bedingungen mit 100 mM NaOH und 2 Minuten Inkubationszeiten gewählt und eine anschließende Extraktion in einem ATPS bestehend aus 15 % PEG 800, 18 % K- Phosphat durchgeführt. Da die Denaturierung nicht wie gewöhnlich mit 0,5 vol. 200 mM NaOH sondern mit 0,33 vol. 400 mM NaOH durchgeführt wurde, konnte das Volumen des Gesamtansatzes um ein Drittel vermindert werden.

Wie Spur 5 und 6 zeigen, enthielt die entsalzte Unterphase nach der Feinreinigung mittels ATPS einen ocDNA Anteil von lediglich 4 % und konnte somit deutlich reduziert werden. Die Auftragung der resuspendierten Interphase in Spur 6 bestätigt die Abtrennung denaturierter DNA, die als Taschenkontamination sichtbar wurde, sowie die Abreicherung von RNA an der Phasengrenzfläche. Bei dieser

Feinreinigung mittels ATPS wurde nach der Entsalzung eine scDNA Ausbeute von etwa 95 % ermittelt (Tabelle 4.5).

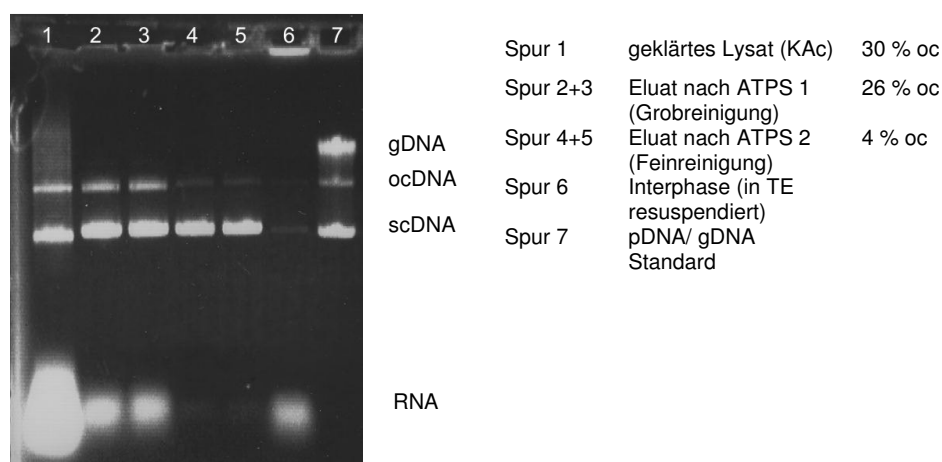


Abbildung 4.42: Feinreinigung mittels ATPS

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Plasmidanalytik zur Feinreinigung mittels ATPS

	V / ml	c(pDNA) / (µg/ml)	m(pDNA) / [µg]	% oc	m(ocDNA)/ µg	m(scDNA)/ µg
vor Feinreinigung	9	36	324	26	84	240
nach Feinreinigung	8,5	28	238	4	10	228

4.4.3 Diskussion

Der prinzipielle Ablauf des zuvor beschriebenen Verfahrens zur Feinreinigung mittels ATPS ist in Abbildung 4.43 dargestellt. Als Feedstock kann prinzipiell jede Plasmidpräparation verwendet werden. Voraussetzung ist, dass die Lösung eine geringe Salzkonzentration aufweist (<50 mM). Der Entsalzung kommt eine besondere Aufgabe zu: Enthält die Plasmidpräparation zu große Mengen an Kaliumphosphatsalzen, so bewirkt die Pufferwirkung eine Absenkung des pH-Wertes und wirkt somit der alkalischen Denaturierung entgegen. Gleiches bewirkt die Abschirmung der negativen Phosphatladungen durch Salzreste, die die treibenden Kräfte für die Doppelstrangtrennung vermindern.

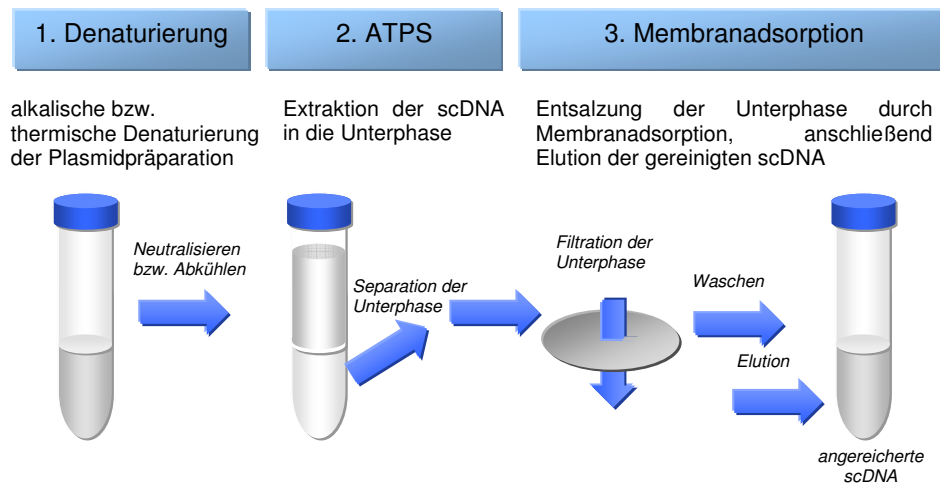


Abbildung 4.43: Prinzipieller Ablauf der Feinreinigung mittels ATPS

Die Versuche zeigen die effektive Abreicherung von gDNA und ocDNA mittels Feinreinigung. Der verwendete Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert jedoch hauptsächlich in doppelsträngiger DNA, wodurch denaturierte, einzelsträngige DNA schwächer angefärbt wird. Dennoch konnte die Abreicherung einzelsträngiger DNA mit dem SYBR GREEN 2 Farbstoff nachgewiesen werden, der spezifisch einzelsträngige Nukleinsäuren anfärbt (Abbildung 4.39).

Wie bereits unter 4.1 im Zusammenhang mit der alkalischen Lyse beschrieben, sind auch für die alkalische Denaturierung die Parameter NaOH-Konzentration und die Inkubationsdauer von entscheidender Bedeutung. Die Untersuchung der Parameter während der Denaturierung hat ergeben, dass die Endkonzentration von 100 mM im Denaturierungsansatz wie bei der alkalischen Lyse mit Biomasse ausreicht⁹ (Abbildung 4.35 und Abbildung 4.36). Eine weitere Erhöhung führt nicht zur Verbesserung des Aufreinigungseffektes, sondern kann zur irreversiblen Denaturierung von pDNA führen. Insofern stimmen diese Ergebnisse mit der Untersuchung der alkalischen Lysebedingungen überein (Abbildung 4.1). Der Zeitraum für die alkalische Inkubation von wenigen Sekunden bis zu mehreren

⁹ Die NaOH Konzentrationen in Abbildung 4.1 beziehen sich auf den P2 Puffer und müssen für einen Vergleich mit dem Denaturierungsansatz mit $\frac{1}{2}$ multipliziert werden.

Minuten (Abbildung 4.37) ermöglicht einen breiten Spielraum, der aus prozeßtechnischer Sicht vorteilhaft ist. Um unerwünschte Nebenreaktionen der DNA (z.B. Deadenylierung) unter alkalischen Bedingungen zu vermindern, ist hingegen eine eher kurze Inkubation von Interesse.

Zum Vergleich wurde bei der alkalischen Lyse mit Biomasse eine längere Inkubationsdauer ermittelt, die 5-7 Minuten beträgt (Abbildung 4.2), die hauptsächlich auf die Denaturierung der gDNA zurückzuführen war. So erfolgt die Denaturierung der gDNA in vorgereinigten Präparationen wesentlich schneller als im Biomasselysat. Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, dass die Abreicherung nicht bereits bei der ersten Extraktion erfolgt. Möglicherweise verhindern Bestandteile aus der Biomasse eine ausreichende Denaturierung der gDNA und ocDNA. So ist bekannt, dass zweiwertige Ionen (z.B. Mg^{2+}) den Schmelzpunkt der DNA erhöhen. Ebenso enthält die Biomasse Polykationen, die eine Kompaktierung der DNA bewirken und die Denaturierungseigenschaften verändern (Hackl *et al.* 2004). Durch die Grobreinigung mittels ATPS werden diese Bestandteile größtenteils von der DNA abgetrennt und ermöglicht dadurch eine ausreichende Denaturierung während der Feinreinigung mittels ATPS.

Neben den alkalischen Bedingungen führen auch hohe Temperaturen zur Schwächung der Wasserstoffbrückenbindungen im DNA Doppelstrang und bewirken damit auch eine Denaturierung zu Einzelsträngen. Das Erhitzen erweist sich daher als Alternative zur alkalischen Denaturierung und hat den Vorteil, dass chemische Nebenreaktionen wie Deadenylierungen nicht auftreten. Die thermische Denaturierung der DNA ist ein lange bekanntes Phänomen, das z.B. bei der PCR zur Trennung der Doppelstränge eingesetzt wird. Der Einfluß der Temperatur auf die Denaturierung der DNA ist sequenzabhängig und kann in Schmelzkurven ermittelt werden. Der Schmelzpunkt nimmt mit zunehmenden GC Anteil der DNA zu, da GC Basenpaare drei Wasserstoffbrückenbindungen aufweisen, AT-Basenpaare hingegen nur zwei. Somit bewirkt eine Erhöhung der Temperatur zu einem gewissen Punkt zunächst eine Trennung der Doppelstränge in AT reichen Regionen, wodurch es zur Bildung von kugelförmigen Gebilden (Globules) in der DNA kommt (Yan und Iwasaki 2002). Die Anzahl und die Größe dieser Globules nehmen mit weiter steigender Temperatur zu, so dass sich ein großer Teil der DNA in einzelsträngiger Konformation befindet. Wie auch bei der alkalischen

Denaturierung führt eine Erhöhung der Ionenstärke in der Lösung zu einer Zunahme der Schmelztemperatur, so dass die pDNA auch hier in Niedrigsalzpuffern wie TE vorliegen sollte. Aufgrund des relativ langsamen Reannealings der komplementären einzelsträngigen Regionen nach dem schnellen Abkühlen auf Eis, wird die vollständige Renaturierung der DNA verhindert, so dass diese größtenteils denaturiert vorliegt. scDNA hingegen weist aufgrund des Supercoilings eine höhere sterische Stabilisierung auf, so dass im bestimmten Temperaturbereich die Doppelstrangtrennung unterbleibt und/oder das Reannealing erleichtert wird. Anschließend erfolgt dann die Trennung der nativen scDNA von den hydrophoberen denaturierten DNA Spezies durch Extraktion im PEG-Phosphat System, wobei scDNA in die Unterphase abgetrennt wird.

Die Berechnung des T_M - Wertes für die pCMV β Sequenz ergab einen Schmelzpunkt von 86 °C und liegt etwa 5 °C höher als für ocDNA in Abbildung 4.40 ermittelt. Berücksichtigt man die Tatsache, dass beim Schmelzpunkt die Hälfte der DNA denaturiert vorliegt¹⁰, so bedeutet dies, dass auch Denaturierung von weniger als 50 % der DNA zu einer vorwiegenden Verteilung in die Oberphase führt. Dies würde auch erklären, warum ocDNA nicht vollständig abgetrennt wurde, da hierfür vermutlich eine vollständige Denaturierung der ocDNA notwendig wäre, wie es bei der gDNA der Fall zu sein scheint. In Versuchen mit thermisch denaturierter DNA in PEG- Dextran Systemen hingegen wurde ein anderes Verhalten festgestellt (Pettijohn 1967; Ohlsson *et al.* 1978). Diese ergaben, dass sich helicale DNA größtenteils in die PEG- reiche Oberphase verteilt, wohingegen denaturierte DNA fast vollständig in die dextranreiche Unterphase nachgewiesen wurde. Da sich die Verteilungsprinzipien in Polymer/ Polymer und in Polymer/ Salz Systemen grundlegend unterscheiden, ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse jedoch nicht möglich.

¹⁰ Der T_m Wert ist die Temperatur beim Schmelzen der DNA, bei der die Hälfte der Basenpaare einzelsträngig vorliegen.

4.5 Versuch zur Maßstabsvergrößerung

4.5.1 Einleitung

Nach der Untersuchung der Grobreinigung mittels ATPS, der Entsalzung über reversible Membranadsorption und der Feinreinigung mittels ATPS in den vorigen Kapiteln, wurde die entwickelten Verfahrensschritte kombiniert (Durchführung siehe 2.4) und mit dem QIAGEN Prozeß (1.4.4) als Referenz verglichen. Zur Veranschaulichung wurde die Durchführung in der Abbildung 4.44 dargestellt.

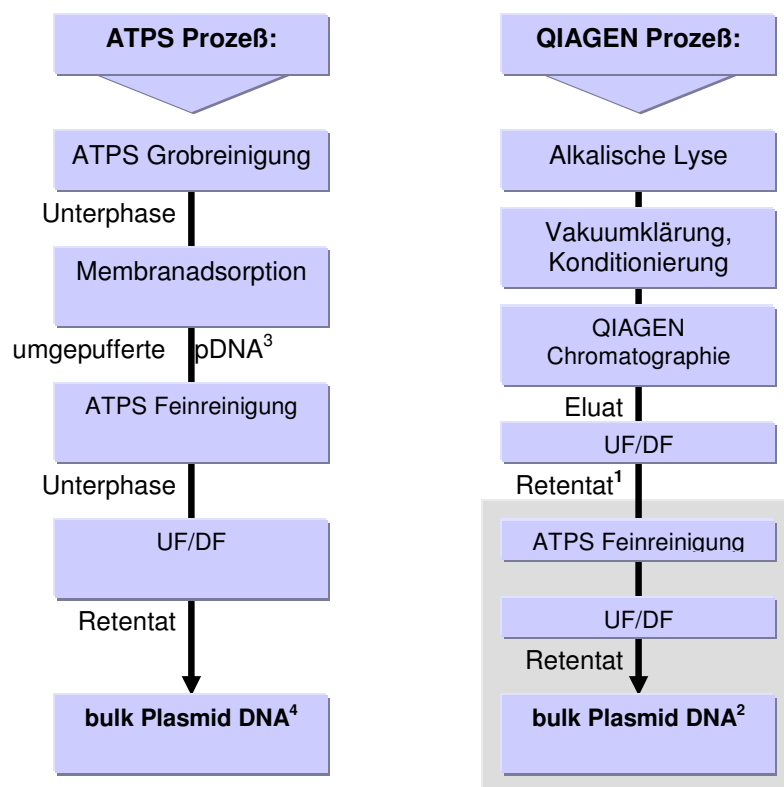


Abbildung 4.44: Schematische Darstellung vom ATPS- und QIAGEN Prozeß; die Exponenten 1-4 kennzeichnen die untersuchten Proben

Die finale Umpufferung erfolgte hierbei durch eine Ultra/ Diafiltration mit einem Hohlfasermodule mit einer Ausschlußgrenze von 100 kDa. Zusätzlich zum eigentlichen QIAGEN Prozeß wurde die nach der Chromatographie mit einer Ultrapure 100 Säule aufgereinigte pDNA umgepuffert und anschließend mittels ATPS Feinreinigung weiterverarbeitet (Abbildung 4.44, grau unterlegt). In beiden Prozessen wurde der Maßstab für die Aufreinigung von Plasmid DNA so ausgelegt, dass 100 g Biomasse verarbeitet werden konnten.

4.5.2 Ergebnisse

Die Proben, die während beider Prozesse genommen wurden, sind als gelelektrophoretische Darstellung in Abbildung 4.45 abgebildet. Das Referenzverfahren von QIAGEN lieferte insgesamt 37,5 mg pDNA und wurde als Bezugsgröße zu 100 % Ausbeute gesetzt (Tabelle 4.6). Die im Anschluß durchgeführte ATPS Feinreinigung von dieser pDNA bewirkte eine Verringerung des oc Anteils von 16 auf 4 %, während gDNA im Gel nicht erkennbar war. Die Ausbeute wurde hierbei durch die Extraktion und der anschließenden UF/DF auf 71 % reduziert. Mit dem ATPS Verfahren wurde eine Ausbeute von 176 % ermittelt. Diese hohe Ausbeute ist auf eine RNA Kontamination in der Probe 3 zurückzuführen, die bei Überbelichtung des Agarosegels festgestellt werden konnte und damit die UV Bestimmung zur Quantifizierung von DNA verfälschte. Abweichend von dem QIAGEN Verfahren konnte die aufgereinigte pDNA nicht sequenziert werden. Das ermittelte A 260/280 Verhältnis war mit 2,01 relativ hoch, was auf Proteinkontaminationen deutet. Durch die Feinreinigung mittels ATPS wurde dieses Verhältnis auf etwa 1,9 reduziert. Zugleich konnte der oc Anteil von 16 auf 3 % verringert werden und die finale pDNA war zudem sequenzierbar. Im Vergleich mit der QIAGEN Referenz wurde eine pDNA Ausbeute von 95 % erreicht, wobei keine RNA Kontamination im Gel erkennbar war.

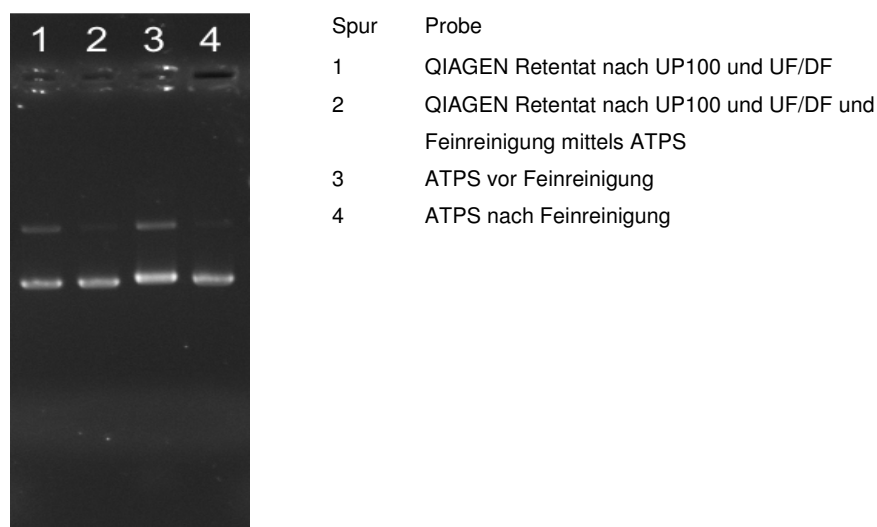


Abbildung 4.45: Agarosegel zum Vergleich ATPS- mit QIAGEN Prozeß; die Proben 1-4 sind auch in der Abbildung 4.44 als Exponent eingetragen

Tabelle 4.6: Analytische Auswertung zur Abbildung 4.45 (Bem: Die Quantifizierung der Ausbeute erfolgte durch Adsorptionsmessung bei 260 nm, die Sequenzierung wurde von QIAGEN durchgeführt.)

Probe	m(DNA)/ mg	Ausbeute/ %	A 260/280	oc Anteil/ %	gDNA/ %	Sequenzier- barkeit
1. QIAGEN Standard	37,5	100	1,89	16	<1	++
2. QIAGEN Standard +ATPS Feinreinigung	26,5	71	1,89	4	<1	++
3. ATPS vor Feinreinigung	66	176	2,01	16	<1	---
4. ATPS nach Feinreinigung	35,7	95	1,89	3	<1	+++

4.5.3 Diskussion

Der Versuch hat gezeigt, dass der generierte ATPS Prozeß eine Plasmidqualität liefert, die zumindest im Rahmen der untersuchten Parameter eine vergleichbare oder sogar bessere Qualität als das Referenzverfahren liefert. Zum Erreichen dieser Reinheit trägt vor allem das ATPS Feinreinigungsverfahren bei, welches eine zusätzliche Abreicherung von Proteinen, RNA und ocDNA bewirkt. Die Sequenzierbarkeit der pDNA ist darüber hinaus ein Hinweis dafür, dass das ATPS Verfahren die Struktur und damit die biologische Aktivität der pDNA nicht negativ beeinflusst. Bezüglich der ermittelten RNA, ocDNA und gDNA Konzentrationen kann mit dem Extraktionsverfahren eine Reinheit erreicht werden, die der Spezifikation von QIAGEN entspricht (siehe Tabelle 1.2).

Eine weitere Erkenntnis von diesem Versuch ist die Tatsache, dass die Feinreinigung mittels ATPS auch als ergänzender Aufreinigungsschritt für den QIAGEN Prozeß interessant ist. In diesem Fall wurde der oc Anteil auf einen Wert innerhalb der Spezifikationen abgereichert (Tabelle 4.6). Nach Abzug des oc Anteils sind durch dieses Verfahren etwa 20 % scDNA Ausbeuteverlust festzustellen, wobei jedoch nicht nachzuvollziehen ist, wieviel pDNA bereits durch die Umpufferung und Konzentrierung mittels UF/DF verlorengegangen ist. Neben der erreichten Plasmidqualität ist die relativ kurze Prozeßzeit des ATPS Verfahrens hervorzuheben. Für das gesamte Verfahren wurde etwa ein Arbeitstag benötigt, während das QIAGEN Verfahren ungefähr anderthalb Tage benötigte.

Eine weitere Maßstabsvergrößerung des Extraktionsverfahrens ist aufgrund zweier Prozeßschritte limitiert. Zum einen ist die alkalische Lyse im Produktionsmaßstab aus wirtschaftlicher Sicht in niedrigvolumigen Batchverfahren nicht praktikabel. Ein großtechnisches Batchverfahren zur scherungsarmen Mischung dieser hochviskosen Lösungen ist derzeit nicht realisiert (die Skalierungsprobleme der alkalischen Lyse im Batchverfahren wurden unter 1.4.3 und 4.1.1 besprochen). Eine mögliche Lösung hierfür könnte ein Zumischverfahren anbieten, bei dem z.B. durch Einsatz von statischen Mixern eine kontinuierliche Zumischung von Lysepuffer zur resuspendierten Biomasse und anschließend von K-Phosphatpuffer sowie PEG-Lösung erfolgen kann (Abbildung 4.46). Dieses Verfahren hätte volumenunabhängig konstante Bedingungen im Bezug auf Mischzeit,

Scherwirkung und Flockenbildung zum Vorteil. Der Einsatz setzt allerdings voraus, dass nachfolgende Verfahrensschritte ebenfalls kontinuierlich oder zumindest semikontinuierlich durchgeführt werden können. Vorversuche mit dem in der Abbildung 4.46 dargestellten Versuchsaufbau zeigten mit der Zeit aufkommende Verstopfungsprobleme durch das Biomassepräzipitat, die bei den kleinen verwendeten statischen Mischern auftraten aber durch die Verwendung größerer Mischer umgangen werden können. Eine prinzipielle funktionsweise konnte für den Versuchsaufbau festgestellt werden, auch wenn die weitere Verwendung aufgrund der komplexen Dosierung der Zumischung nicht weiter verfolgt wurde.

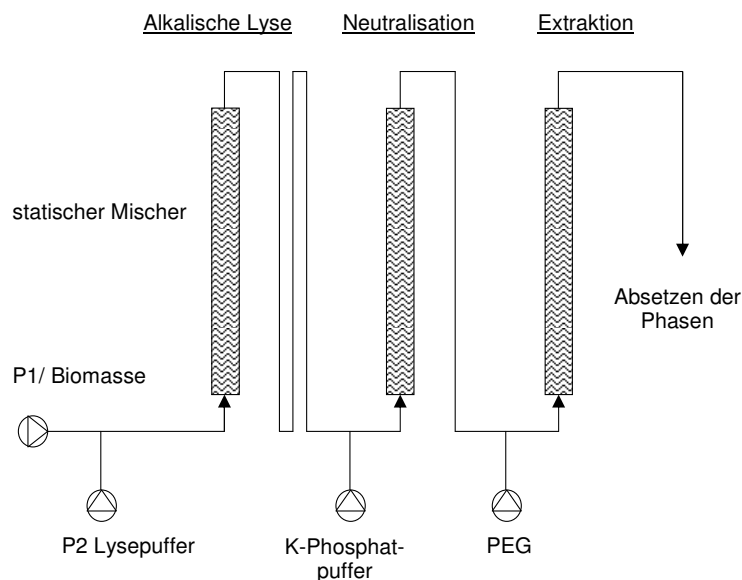


Abbildung 4.46: Möglicher Prozeß zur kontinuierlichen ATPS Grobreinigung mittels statischer Mischer

Eine weitere Limitierung des Extraktionsprozesses ist die Abtrennung der Unterphase. Während beim Referenzverfahren die Beladung und das Waschen der Chromatographiesäule die meiste Zeit benötigen, ist beim ATPS Prozeß das Absetzen der Phasen durch Batchzentrifugation und die anschließende Abnahme der Unterphase am aufwendigsten. Eine weitere Maßstabsvergrößerung des ATPS- Verfahrens ist daher zunächst aufgrund der Batchzentrifugation limitiert, weshalb kontinuierliche Prozesse zur Abtrennung der Unterphase wünschenswert

sind. Für Prozesse mit wässrigen Zweiphasensystemen eignen sich hierzu Tellerseparatoren und scherarme Lamellenabscheider (Banik *et al.* 2003). In Vorversuchen wurde jedoch festgestellt, dass das Biomassepräzipitat zum Verstopfen des Lamellenabscheiders führt, da sich dieser Feststoff aufgrund seiner mittleren Dichte zwischen Unter- und Oberphase im Abscheider ansammelt (Abbildung 4.47).

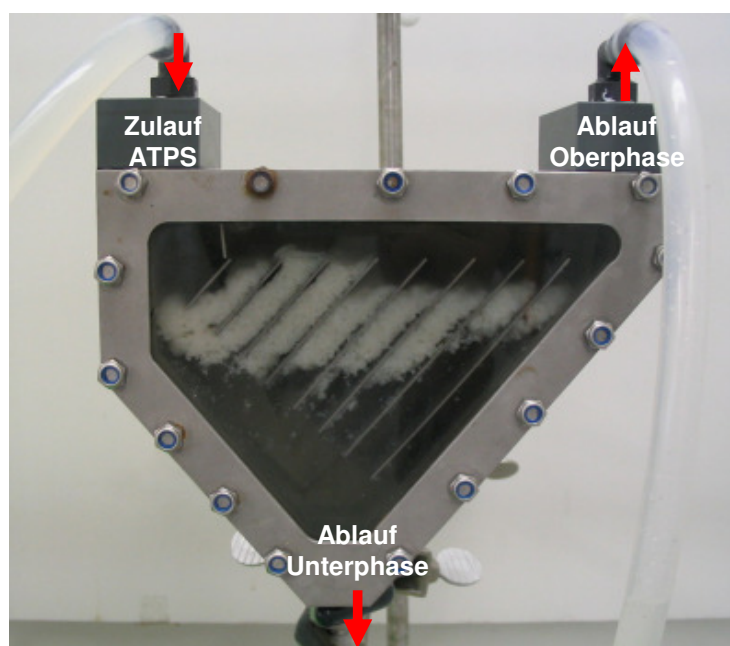


Abbildung 4.47: Lamellenabscheider im Betrieb mit Standardsystem (15 % PEG 800, 20 % K-Phosphat) und Biomasselyse (Grobreinigung mittels ATPS)

Neben der zwangsläufigen Verstopfung wird die Trennleistung des Abscheiders verschlechtert, da die Strömung zwischen den Lamellen erheblich behindert wird. Analog würde auch ein Tellerseparator verstopfen, da hierbei das Präzipitat weder mit der leichten noch mit der schweren Phase aus der Zentrifuge ausgetragen werden kann. Dennoch ist vorstellbar, dass eine gleichzeitige Feststoffabtrennung durch die spezielle Auslegung eines Lamellenabscheiders bzw. Tellerseparators möglich ist. Versuche ohne Biomassepräzipitat zeigten, dass mit dem verwendeten Lamellenabscheider ein kontinuierliches Absetzen der Phasen möglich ist. So wäre zumindest bei einer vorherigen Abtrennung des Biomassepräzipitates z.B. durch Filtration oder Flotation der Einsatz von Lamellenabscheidern möglich.

4.6 Plasmidpräparation im Mikrogramm-Maßstab

4.6.1 Einleitung

Die Aufreinigung von Plasmid DNA im Labormaßstab bis etwa 20 µg wird auch als Minipräparation bezeichnet (Abbildung 4.48) und in erster Linie für molekularbiologische Anwendungen durchgeführt.

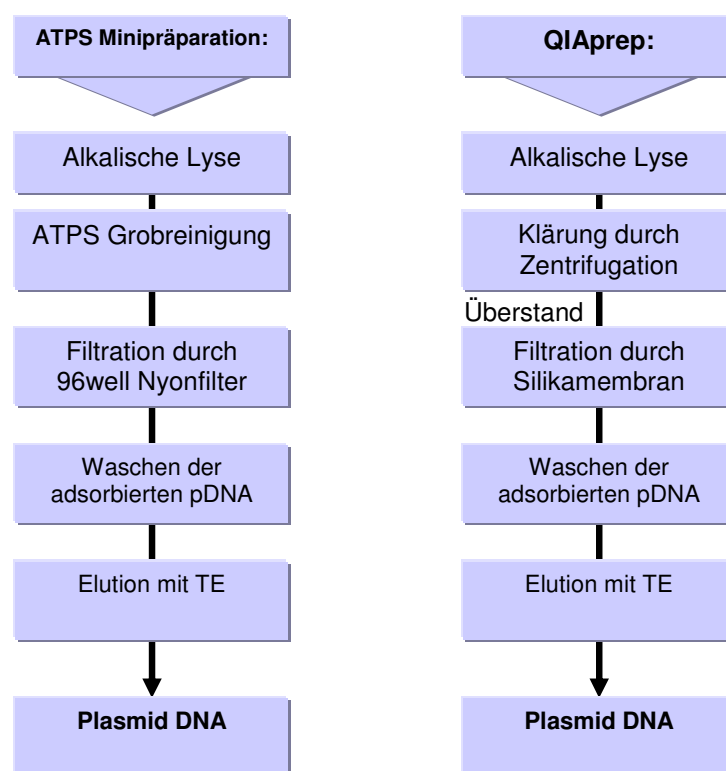


Abbildung 4.48: Schematische Darstellung der Minipräparation von pDNA mittels ATPS und QIAprep

Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Aufreinigung (siehe 4.5) spielt die Ausbeute bei der Plasmidpräparation für molekularbiologische Anwendung eine geringere Rolle. Von größerer Bedeutung sind hier die Präparationsgeschwindigkeit, die Praktikabilität und die Präparationskosten. Die Anforderungen an die Reinheit sind abhängig von den weiteren Einsatzgebieten der pDNA. So sind für Restriktionsverdaus, Transformationen und

gelelektrophoretische Darstellungen meist geringere Reinheiten ausreichend als z.B. für Transfektionen oder Sequenzierungen. Ebenso spielt der oc Anteil eine eher untergeordnete Rolle.

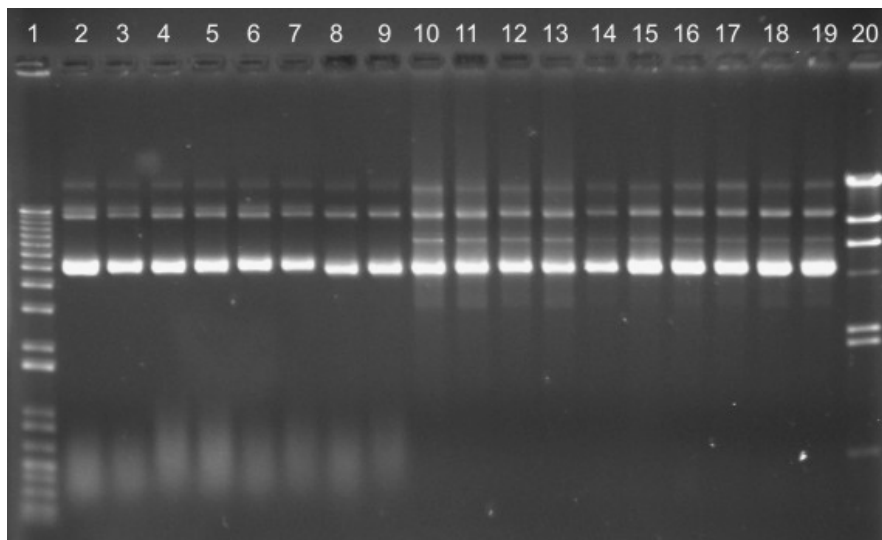
Eine wichtige Voraussetzung für Plasmidpräparationsverfahren ist die Tatsache, dass die aufgereinigte Plasmid DNA für die meisten molekularbiologischen Anwendungen zunächst in Niedrigsalzpuffern (z.B. TE) vorliegen muß. Dies wird z.B. durch Methoden erreicht, die auf Silikaadsorption basieren (Boom *et al.* 1989), während mittels Anionenaustauscherharze aufgereinigte DNA über eine zusätzliche Isopropanolfällung umgepuffert werden muß.

Wie im Kapitel 4.3 beschrieben, bietet auch die reversible Membranadsorption die Möglichkeit, aufgereinigte pDNA schnell und einfach in annähernd beliebigen Puffern zu eluieren. Folglich wurden für die Minipräparation die Grobreinigung mittels ATPS mit der reversiblen Membranadsorption kombiniert (Durchführung siehe 2.9) und mit der gängigen Minipräparation von QIAGEN (QIAprep, Durchführung laut Handbuch) verglichen.

4.6.2 Ergebnisse

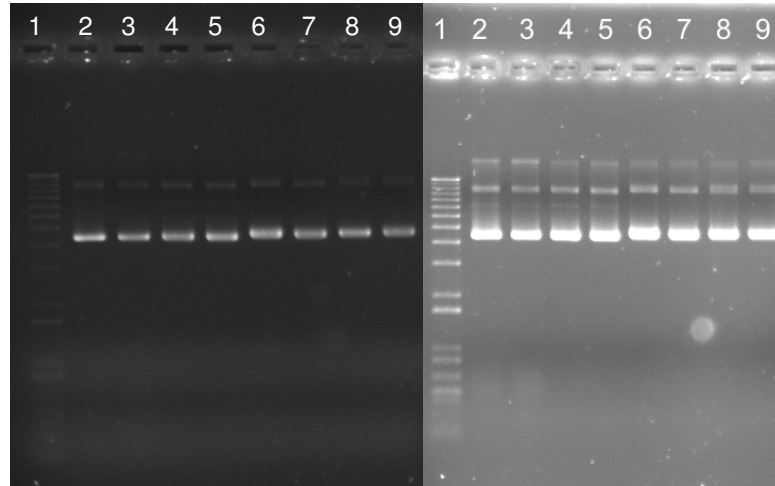
Die mittels der ATPS Methode und QIAprep aufgereinigten pDNA-Proben wurde gelelektrophoretisch untersucht (Abbildung 4.49). Die zugehörigen Daten der UV Bestimmungen zeigt die angehängte Tabelle. Die Proben 2-9, die mit der ATPS Methode aufgereinigt wurden, enthielten niedermolekulare RNA-Reste, während die mittels QIAprep präparierten Plasmide keine RNA Kontaminationen aufwiesen. Somit sind die mittels UV bestimmten pDNA Ausbeuten bei den Proben 2-9 verfälscht, was sich in den relativ hohen Werten von 22-25 µg widerspiegelt. Im Vergleich wurden mit gleicher Biomassemenge durch QIAprep etwa 18 µg pDNA aufgereinigt. Andererseits zeigt das Agarosegel, dass die mit QIAprep aufgereinigte DNA plasmiduntypische Banden sowie relativ starke Schmierbanden aufweist, die in den ATPS Proben nicht vorkommen. Alle getesteten Plasmide zeigten darüber hinaus eine gute Sequenzierbarkeit.

Zur Beseitigung der RNA Reste bei der Minipräparation wurde in weiteren Versuchen der RNase-haltige P1 Puffer vom QIAprep Kit verwendet. Zudem wurde getestet, ob alternativ zu Nylonmembranen auch die Silikamembran vom QIAprep Kit zur Membranadsorption verwendet werden kann (Abbildung 4.50). Im entsprechenden Agarosegel sind RNA Reste der Proben 2-3 bzw. 6-7 nur bei Überbelichtung zu erkennen, während in den Ansätzen mit RNase-Verdau keine RNA erkennbar ist. Der Abbau der RNA wird auch in den mittels UV ermittelten Ausbeuten deutlich, die für die Proben mit RNase (Spuren 4-5 und 8-9) etwa 13-14 µg betrugen, ohne RNase hingegen etwa 21 µg (Spuren 2-3 und 6-7).



Spur	Probe	Ausbeute/µg	A260/280	Sequenzierbarkeit
1	1 kb Leiter	22-25	2,10	++
2-9	ATPS Nylon, 400 µl BM	22-25	2,10	++
10-13	QIAprep minispin	n.b.	n.b.	n.b.
14-15	QIAprep, 100 µl BM	3,5	1,88-1,90	++
16-17	QIAprep, 200 µl BM	9	1,88-1,90	++
18-19	QIAprep, 400 µl BM	18	1,88-1,90	++
20	Lambda hind digest	18	1,88-1,90	++

Abbildung 4.49: Agarosegel und zugehörige Daten zum Vergleich ATPS mit QIAprep (Bem: Die Quantifizierung der Ausbeute erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm; die Sequenzierung wurde von QIAGEN durchgeführt, n.b. = nicht bestimmt)



Spur	Probe	Ausbeute/ μ g	A260/280	Sequenzierbarkeit
1	1 kb Leiter			
2-3	ATPS Silica	21,6	1,92	+
4-5	ATPS Silica + RNase	13,8	1,87	++
6-7	ATPS Nylon	20	1,94	++
8-9	ATPS Nylon + RNase	13,5	1,92	++

Abbildung 4.50: Agarosegel (rechts überbelichtet) und Daten zur ATPS Minipräparation (400 μ l BM) mit und ohne RNase (Bem: Die Quantifizierung der Ausbeute erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm)

Neben der bekannten Tatsache, dass in der Unterphase gelöste pDNA an Nylon adsorbiert, wurde in den Versuchen festgestellt, dass unter diesen Bedingungen auch eine Adsorption an Silikamembranen erfolgt. Die ermittelten Ausbeuten zwischen Nylon und Silikamembran unterschieden sich dabei kaum. Auffällig ist bei den Proben mit der Silikamembran eine zusätzliche Bande kurz unterhalb der oc Bande, die nur in den Spuren 2-5 auftritt. Diese ist auch in der Abbildung 4.49 in den Spuren 10-19 deutlich zu erkennen.

4.6.3 Diskussion

Ein ähnlicher wie der hier gezeigte Einsatz von ATPS zur Plasmidpräparation wurde bereits in einer Arbeit von Cole et al. (1991) beschrieben, eine praktikable Methode zur Umpufferung der plasmidhaltigen Phase wurde allerdings nicht gegeben. Hierfür eignet sich die reversible Membranadsorption, die aufgrund ihrer einfachen Durchführung automatisierbar und auch im 96 well Maßstab durchführbar ist. Die Filtration kann sowohl durch Anlegen eines Vakuums als auch durch Zentrifugation erfolgen. Wie auch in vorigen Kapiteln beschrieben (4.3 und

4.4), reicht eine einfache Extraktion jedoch nicht aus, um niedermolekulare RNA vollständig abzureichern. Da die Durchführung einer zweiten Extraktion für eine routinemäßige Plasmidpräparation zu aufwendig ist, besteht die Möglichkeit, die RNA während der alkalischen Lyse zu verdauen (Abbildung 4.50). Dies ist auch das Prinzip, das zum Abbau der RNA bei der silikabasierten Aufreinigung mittels QIAprep angewendet wird. Eine RNase freie Plasmidpräparation erscheint möglich, falls die RNA durch einen selektiven Waschschriff von der Nylonmembran gewaschen werden kann.

Interessant ist die Tatsache, dass pDNA in der Unterphase auch an Silikamembranen adsorbiert. Lange galt die Erkenntnis, dass die Bindung lediglich unter chaotropen Bedingungen erfolgt (Vogelstein und Gillespie 1979; Boom et al. 1990; Melzak et al. 1996). Jedoch wurde berichtet, dass Plasmide auch in 1 M Kaliumacetat (im geklärten Lysat) direkt an Silikamembranen adsorbieren (Neudecker und Grimm 2000). Publikationen über Bindung unter kosmotropen Bedingungen sind hingegen nicht bekannt.

Bei der zusätzlichen Bande bei der mit QIAprep aufgereinigten pDNA, die sich kurz unterhalb der oc Bande befindet, handelt sich wahrscheinlich um die als „ghost band“ beschriebene (Sayers *et al.* 1996) denaturierte pDNA Form. Diese tritt auch in den ATPS Proben mit Silikaadsorption auf, nicht jedoch bei der Nylonadsorption. Demnach wird diese pDNA Form durch die Nylonmembranadsorption entfernt und nicht bereits durch die Zweiphasenextraktion.

Insgesamt zeigen die Agarosegele, dass die eingesetzte ATPS Methode zusammen mit der Membranadsorption eine interessante Möglichkeit bietet, Plasmidpräparationen durchzuführen. Wie die Ergebnisse zeigen, würde je nach Reinheitsanforderung (z.B. zur Sequenzierung) hierfür auch ein RNase-freier Ansatz ausreichen. Als Vorteil gegenüber der QIAprep Methode ist eine leicht bessere pDNA Qualität und der Verzicht auf zu entsorgende Gefahrstoffe (chaotrope Salze) zu festzuhalten. Unbekannt ist, ob die Plasmidpräparation mittels ATPS auch kostengünstiger ist (die Chemikalienkosten für ATPS liegen etwa bei 0,3 Cent/ Minipräparation). Was die Dauer einer Präparation betrifft, ist kein Vorteil zu sehen. Die Abnahme der Unterphase, die durch Anstechen des Reaktionsgefäßes erfolgt, ist relativ aufwendig und ein wesentlicher Nachteil. Die Entwicklung einer effektiven Phasenseparation ist daher wünschenswert und wäre vor allem für den automatisierten Einsatz (High throughput screening) notwendig.

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Prozeß beschrieben, der eine Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion ermöglicht. Zwar konnte aufgrund fehlender analytischer Verfahren (Transfektion, Endotoxinabreicherung) eine einwandfreie Plasmidqualität abschließend nicht bestätigt werden, die bislang erhaltenen Ergebnisse sind dennoch vielversprechend. Falls die Reinheit für einen humantherapeutischen Einsatz nicht ausreicht, ist dennoch der Einsatz für veterinärmedizinische und molekularbiologische Anwendungen denkbar (M. Müller persönliche Kommunikation). Die Frage, ob dieses Verfahren ökonomisch oder technisch gegenüber etablierten Prozessen bestehen kann, steht schlußendlich noch offen. Die Limitierungen der Skalierbarkeit, die in erster Linie auf mangelnde großtechnische Verfahren zum Absetzen der Unterphase zurückzuführen sind, sind in diesem Zusammenhang noch ein ungelöstes Problem. Als technischer Prozeßbaustein erscheint die Feinreinigung mittels ATPS beim jetzigen Stand noch am ehesten tauglich und könnte aufgrund mangelnder kostengünstiger Alternativverfahren zur gDNA und ocDNA Abreicherung auf reges Interesse stoßen. Die vorher genannten Limitierungen gelten für das Feinreinigungsverfahren nicht oder nur eingeschränkt, da einerseits durch die Verwendung vorgereinigter und konzentrierter pDNA eine sehr hohe Beladung eingesetzt werden kann und andererseits aufgrund des fehlenden Biomassepräzipitates auch der Einsatz von Lamellenabscheidern möglich erscheint. Mithilfe eines Wärmetauschers könnte zudem eine kontinuierliche Hitzedenaturierung erfolgen.

Eine weitere Überlegung nutzt die sehr hohe Kapazität der wässrigen Zweiphasenextraktion aus: Durch PEG-Präzipitation im geklärten Lysat könnte ein Großteil der Kontaminanten abgetrennt und pDNA erheblich konzentriert werden. Im Anschluß durchgeführte Zweiphasenextraktionen würden zur Abtrennung von RNA und im Fall der Feinreinigung mittels ATPS zur gDNA und ocDNA Abreicherung führen, wobei mit der konzentrierten pDNA hohe Beladungen erreicht werden könnten. Aufgrund des bereits abgetrennten Biomassepräzipitates wäre so auch hier der Einsatz von Lamellenabscheidern denkbar.

Im Rahmen der Minipräparation mittels ATPS konnte ebenfalls eine Methode aufgezeigt werden, die zumindest für ausgewählte Anwendungen (Sequenzierung) eine ausreichende Plasmidqualität bietet. Ein großes Potential zur weiteren Verbesserung der Plasmidqualität bietet die weitere Untersuchung der Membranadsorption. Durch die Wahl geeigneter Waschpuffer könnten z.B. eine selektive Präzipitation der pDNA erfolgen und restliche Kontaminanten entfernt werden. Während die Zentrifugation der Eppendorfer Reaktionsgefäße (2 ml) routinemäßig erledigt werden kann, ist die Praktikabilität der Minipräparation derzeit noch durch die aufwendige Abnahme der plasmidhaltigen Unterphase sowohl manuell als auch mittels kommerzieller HTS (High Throughput Screening) Plattformen eingeschränkt.

Neben der Plasmidaufreinigung erscheint auch die Präparation von RNA oder genomischer DNA aus Blut oder Gewebe mittels Extraktion interessant. Aufgrund der sehr guten Feststoffabtrennung während der Extraktion bietet sich ATPS auch für komplexe Matrices wie z.B. Stuhl oder Knochen an. Da sich pDNA und native gDNA ähnlich verteilen, ist bei der Wahl geeigneter proteolytischer Lysebedingungen eine Aufreinigung chromosomaler DNA möglicherweise bereits mit geringfügigen Modifikationen des hier beschriebenen Extraktionsverfahrens möglich.

Abgesehen von der Nukleinsäureaufreinigung könnte das Membranadsorptionsverfahren auch in der Proteinaufreinigung interessant sein. Hier könnte das Adsorptionsverfahren als Methode zur schnellen Umpufferung und Konzentrierung des Zielproteins in der Unterphase dienen.

6 Zusammenfassung

Plasmide sind doppelsträngige und zirkuläre DNA Moleküle, die vor allem als Vektor zur Übertragung von Genen bekannt sind. Aus diesem Grund haben sie eine große Bedeutung in der Molekularbiologie bzw. in der Gentechnik. Zur Zeit gibt es ein großes Interesse, diese Eigenschaft der Plasmide auch zur Übertragung von therapeutischen Genen im Rahmen der Gentherapie und zur DNA Vakzinierung einzusetzen. Im gentherapeutischen Ansatz ist der Einsatz von Plasmid DNA im Vergleich mit virusbasiertem Gentransfer mit weniger Risiken verbunden, die erreichte Transfektionseffizienz und die Expressionsdauer sind jedoch vergleichsweise gering. Dies erfordert eine hohe Dosis für eine Behandlung, so dass effektive Verfahren notwendig sind, um große Mengen Plasmid DNA in pharmazeutischer Qualität zu produzieren. Die Herstellung der Plasmid DNA erfolgt biotechnologisch durch Kultivierung optimierter E. coli Stämme. Die daran anschließende Aufreinigung der Plasmid DNA ist vergleichsweise aufwendig, weshalb hierfür ein Bedarf an neuen Verfahren besteht. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines alternativen und vor allem kostengünstigen Aufreinigungsverfahrens, das auf wässriger Zweiphasenextraktion basiert. Der generierte Prozeß besteht aus drei Verfahrensschritten. Er beginnt mit einem alkalischen Aufschluß der Bakterienzellen und einer ersten Abtrennung grober Verunreinigungen durch eine Zweiphasenextraktion. Hierzu wurde ein System bestehend aus 15 % PEG 800 und 20 % Kaliumphosphat eingesetzt, welches in der zuvor durchgeführten Diplomarbeit entwickelt wurde. Dabei wurden Bedingungen gefunden, die zu einer Extraktion von etwa 90 % der Plasmide in die Unterphase führen, während der Großteil der Kontaminanten zusammen mit Feststoffen (Zellpräzipitate) in die Oberphase abgetrennt werden. Die durchgeführten Versuche zeigten für den Aufschluß der Zellen, dass die Bedingungen der vielfach beschriebenen alkalischen Lyse übernommen werden konnten. Eine Verkürzung der Neutralisationsdauer durch direktes Einleiten der Extraktion wirkte sich hierbei durch Abtrennung von Nukleasen als stabilisierend auf die Plasmid DNA aus. Durch Erhöhung der Extraktionstemperatur konnten zudem die Plasmidausbeuten gesteigert werden, allerdings auf Kosten der Reinheit.

Verteilungsexperimente mit Plasmid DNA und RNA, die in Abhängigkeit von der Temperatur, pH Wert und vom PEG- Molekulargewicht durchgeführt wurden, zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen den gewählten Bedingungen und der Verteilung der Plasmid DNA. So wurde festgestellt, dass im untersuchten Phasensystem eine Temperaturänderung von 15 auf 20 °C zu einer vollständigen Änderung der Plasmidverteilung von Ober- in die Unterphase führt. Dies konnte auf die Löslichkeit der Plasmid DNA in der Oberphase zurückgeführt werden, die sich durch Veränderung vom PEG Molekulargewicht bzw. von der Temperatur drastisch verändert. Zudem wurde die Vermutung aufgestellt, dass diese Löslichkeitsänderung im Zusammenhang mit einer Strukturänderung der DNA steht, die als Coil-Globule Transition bekannt ist.

Nachdem die Plasmid DNA im ersten Verfahrensschritt (Grobreinigung mittels ATPS) unter den genannten Bedingungen vom Großteil der Verunreinigung abgetrennt und in die Unterphase extrahiert wurde, war die Aufgabe des folgenden Schrittes die Isolierung der Plasmid DNA aus der Unterphase. Dazu wurde eine Methode entwickelt, die die hohe Kaliumphosphatkonzentration in der Unterphase (ca. 30 % w/w) ausnutzt, um Plasmid DNA durch vermutlich hydrophobe Interaktion an Nylonmembranen zu adsorbieren und durch anschließende Filtration von TE- Puffer die Plasmid DNA zu eluieren. Für diesen Entsalzungs- und Konzentrierungsschritt wurde eine Stufenausbeute von etwa 95 % Plasmid DNA ermittelt, während sich der RNA Gehalt um 85 % verringerte.

Zur gezielten Abreicherung chromosomaler DNA und unerwünschter offen zirkulärer Plasmid DNA wurde ein dritter Verfahrensschritt entwickelt. Dieser basiert auf der selektiven Renaturierung von supercoiled Plasmid DNA nach der Einwirkung alkalischer Bedingungen und anschließender Neutralisation. Chromosomale DNA und offen zirkuläre Plasmid DNA hingegen werden dabei irreversibel denaturiert. Eine weitere wässrige Zweiphasenextraktion wurde genutzt, um die denaturierte DNA von der in die Unterphase extrahierte supercoiled Plasmid DNA zu trennen. Durch dieses Verfahren konnte der Anteil offen zirkulärer DNA auf etwa 4-6 % und von chromosomaler DNA auf <1 % reduziert werden, wobei eine Ausbeute von 90-95 % supercoiled Plasmid DNA erreicht wurde.

Der vollständige Prozeß zur Aufreinigung von Plasmid DNA besteht aus der Kombination der ersten Extraktion zur Abtrennung grober Verunreinigungen, der

Entsalzung durch reversible Membranadsorption und der Feinreinigung zur Abtrennung von chromosomaler DNA und offen zirkulärer Plasmide. Dieser Prozeß wurde zur Verarbeitung von 100 g Biomasse durchgeführt und mit dem auf Chromatographie basierten Verfahren von QIAGEN verglichen. Hierbei konnten vergleichbare Ausbeuten erzielt werden, während der Anteil an supercoiled Plasmid DNA beim Extraktionsverfahren etwas höher war. Hinsichtlich des Anteils an chromosomaler DNA, offen zirkulärer Plasmide und RNA konnten mit dem Extraktionsverfahren die gesetzten Spezifikationen erreicht werden. Eine weitere Maßstabsvergrößerung des Extraktionsprozesses ist zur Zeit aufgrund von Limitierungen der Phasenseparation eingeschränkt. Extraktionsversuche im kleinen Maßstab zeigten darüber hinaus, dass die Kombination aus Extraktion mit der Entsalzung durch Membranadsorption eine interessante Alternative zur Minipräparation von Plasmid DNA bieten kann.

7 Summary

Plasmids are double stranded circular DNA molecules, mainly known as vectors for transferring genes. Therefore, plasmids have a high importance for molecular biology and gene technology respectively. Presently, there is a high interest to utilize plasmids in gene therapy and DNA vaccination due to their ability to replace or supplement genes. Compared with viral based gene transfer, the use of plasmid for gene therapy is less risky, however, efficiency of transfection and duration of expression are relatively low. Thus, high doses per application are necessary, making effective processes for the manufacture of large quantities of plasmids in pharmaceutical quality essential. The manufacturing of plasmid DNA is performed using biotechnological processes by cultivation of optimized *E. coli* strains. Since current downstream processing is comparatively elaborate, there is a high demand for new approaches. This thesis deals with the development of an alternative and cost-effective purification process based on aqueous two phase extraction (ATPS). The developed three step process begins with an alkaline lysis of bacterial cells and separation of crude impurities and cell debris using two phase extraction. In this study, a systematic screening led to an optimal system comprising 15 % PEG 800 and 20 % potassium phosphate. This system resulted in a plasmid DNA recovery of about 90 % plasmid recovery in the bottom phase, while most of contaminants together with solids (cell precipitate) are separated into the top phase. It was found that conditions of the standard alkaline lysis can be adopted. Reducing the duration of neutralization by immediate extraction after lysis stabilizes plasmid DNA due to separation of nucleases to the opposite phase. By increasing the temperature of extraction, plasmid DNA yields could be optimized, however, to the expense of purity. Partitioning experiments of plasmid DNA and RNA, performed as a function of temperature, pH and PEG molecular weight, showed a close relation between system conditions and partitioning of plasmid DNA. In the investigated two phase system it was found that changing the temperature from 15 to 20 °C leads to a partitioning of plasmid DNA from top to bottom phase. This could be attributed to the plasmid solubility in the top phase, which is drastically affected by variation of PEG molecular weight and temperature

respectively. The assumption is, that differences of solubility are associated with a structural change of plasmid DNA, known as coil-globule transition.

After separation of the main contaminants (capturing) and extraction of plasmid DNA into the bottom phase, the plasmid DNA is isolated from the bottom phase using an adsorptive membrane step. The high potassium phosphate concentrations in the bottom phase were exploited in order to facilitate hydrophobic interaction for the adsorption of plasmid DNA on a nylon membrane followed by a subsequent elution using TE-buffer.

During this desalting and concentration process, a step recovery of 95 % plasmid DNA and an 85 % reduction of the RNA content could be determined.

For a specific depletion of chromosomal DNA and open circular plasmid DNA a third process step was developed, which is based on a sequence comprising denaturation of the nucleic acids present and selective renaturation of supercoiled plasmid DNA followed by selective partitioning in an ATPS. During this procedure, chromosomal and open circular DNA are irreversibly denatured. The drastic change of hydrophobicity enabled the separation from native supercoiled plasmid DNA using the second aqueous two phase system. With this procedure, the fraction of open circular DNA is reduced to 4-6% and of chromosomal DNA to <1 % together with a supercoiled DNA yield of 90-95%. The complete process for purification of plasmid DNA is thus a combination of a first extraction for the separation of main impurities (capture), followed by desalting step using reversible membrane adsorption and polish step for the removal of chromosomal DNA and open circular plasmids. Consequently, this procedure was applied for the processing of 100 g biomass and compared to the chromatography based purification method established and commercialized by QIAGEN. As a result, comparable recoveries were achieved, whereas the fraction of supercoiled plasmids was slightly higher for the extraction procedure. Regarding the fraction of chromosomal DNA, open circular plasmids and RNA, the targeted specifications were met. A further scale up of the process seems feasible after solving limitations connected with the mechanical process of phase separation. In addition, extraction in small scale by combining extraction with membrane adsorption shows an interesting alternative for mini-preparation of plasmid DNA.

8 Publikationen

8.1 Poster

“Scalable plasmid DNA purification based on aqueous two- phase separation“, European Symposium on Biochemical Engineering Science (ESBES), 08.-11.09.2004, Stuttgart

“From capture to polish - Exploiting structural behaviour of nucleic acids - Integrated capture process for purification of plasmid DNA based on aqueous two phase separation“, Recovery of biological Products XII, 02.-07.04.2006, Litchfield, USA (vorgetragen durch Prof. Kula)

8.2 Vorträge

“Integrated capture process for purification of plasmid DNA based on aqueous two phase separation“, Cap’05 conference, 22.-25.05.2005, Phoenix, USA

“New process design for pDNA isolation using aqueous two-phase systems“, 229th ACS National Meeting, 13.-17. 03.2005, San Diego, USA (vorgetragen durch Prof. Kula)

“Scaleable recovery of plasmid DNA based on aqueous two phase separation“, 13th International Conference on Biopartitioning and Purification (BPP 2005), 20-24.06.2005, Niederlande

Integrated capture process for purification of plasmid DNA based on aqueous two phase separation; GVC/DECHEMA-Tagung "Industrielle Biotechnologie und Gewinnung von Produkten", 22.-24.05.06; Würzburg (vorgetragen durch Dr. Hubbuch)

8.3 Manuskripte

Frerix, A., Müller, M., Kula, MR., Hubbuch, J., 2005.

“Scalable recovery of plasmid DNA based on aqueous two-phase separation”.
Biotechnology and Applied Biochemistry 42:57-66.

Frerix, A., Schönewald, M., Geilenkirchen, P., Müller, M., Kula MR, Hubbuch J.,
2006

“Exploitation of coil-globule pDNA transition induced by small changes in
temperature, pH salt and PEG compositions for directed partitioning in aqueous
two phase systems” Langmuir 22 (9), 4282 -4290.

Frerix, A., Geilenkirchen, P., Müller, M., Kula MR, Hubbuch J.

“Separation of genomic DNA, RNA and open circular plasmid DNA from
supercoiled plasmid DNA by combining denaturation, selective renaturation and
aqueous two phase extraction”, eingereicht

8.4 Patentanmeldungen

Frerix, A.; Müller, M.; Hubbuch, J.; Kula, M.-R.

„Verfahren zur Gewinnung von Plasmid- DNA mittels eines wässrigen 2-
Phasensystems“
DE 103 24 511.1

Frerix, A.; Müller, M.; Hubbuch, J.; Schönewald, M.

„Verfahren zur selektiven, reversiblen Adsorption von einer Nukleinsäure oder
mehreren Nukleinsäuren an ein Trägermaterial“
EP: 05 024 207.2

Frerix, A.; Müller, M.; Hubbuch, J.; Kula, M.-R.

„Verfahren zur selektiven Anreicherung von doppelsträngiger DNA aus
Nukleinsäuregemischen“
EP: 050 199 14.0

9 Referenzen

- Aiuti, A., S. Slavin, M. Aker, F. Ficara, S. Deola, A. Mortellaro, S. Morecki, G. Andolfi, A. Tabucchi, F. Carlucci, E. Marinello, F. Cattaneo, S. Vai, P. Servida, R. Miniero, M. G. Roncarolo und C. Bordignon (2002). "Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning." *Science* 296(5577): 2410-2413.
- Albertsson, P.-A. (1956). "Chromatography and partition of cells and cell fragments." *Nature* 177: 771-774.
- Albertsson, P.-A. (1985). *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Wiley, NY.
- Arscott, P. G., C. L. Ma, J. R. Wenner und V. A. Bloomfield (1995). "DNA Condensation by Cobalt Hexaammine(III) in Alcohol-Water Mixtures - Dielectric-Constant and Other Solvent Effects." *Biopolymers* 36(3): 345-364.
- Asenjo, J. A., S. L. Mistry, B. A. Andrews und J. C. Merchuk (2002). "Phase separation rates of aqueous two-phase systems: Correlation with system properties." *Biotechnol Bioeng* 79(2): 217-23.
- Bamberger, S., D. E. Brooks, K. A. Sharp, J. M. Van Alstine und T. J. Webber (1985). *Preparation of Phase Systems and Measurement of Their Physicochemical Properties. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems*. H. Walter, D. E. Brooks und D. Fisher.
- Banik, R. M., A. Santhiagu, B. Kanari, C. Sabarinath und S. N. Upadhyay (2003). "Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19(4): 337-348.
- Beijerinck, M. W. (1896). "Über eine Eigentümlichkeit der löslichen Stärke." *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* 2: 698-699.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). "Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA." *Nucleic Acids Research* 7(6): 1513-1523.
- Bloomfield, V. A. (1997). "DNA condensation by multivalent cations." *Biopolymers* 44(3): 269-282.
- Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheimvanden und J. Vandernoordaa (1990). "Rapid and Simple

- Method for Purification of Nucleic-Acids." *Journal of Clinical Microbiology* 28(3): 495-503.
- Boom, W., H. M. A. Adriaanse, K. T. und P. F. Lens (1989). Process for isolating nucleic acid. United States Patent 5,234,809.
- Briggs, J. und P. R. Panfili (1991). "Quantitation of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals." *Anal Chem* 63(9): 850-9.
- Brooks, D. E., K. A. Sharp und D. Fisher (1985). Theoretical Aspects of Partitioning. Partitioning in Aqueous Two- Phase Systems. H. Walter, D. E. Brooks und D. Fisher.
- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bousso, F. L. Deist und A. Fischer (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." *Science* 288(5466): 669-72.
- Cavazzana-Calvo, M., A. Thrasher und F. Mavilio (2004). "The future of gene therapy." *Nature* 427(6977): 779-81.
- Chamsart, S., H. Patel, J. A. J. Hanak, A. G. Hitchcock und A. W. Nienow (2001). "The impact of fluid-dynamic-generated stresses on chDNA and pDNA stability during alkaline cell lysis for gene therapy products." *Biotechnology and Bioengineering* 75(4): 387-392.
- Ciccolini, L. A. S., P. A. Shamlou, N. J. Titchener-Hooker, J. M. Ward und P. Dunnill (1998). "Time course of SDS-alkaline lysis of recombinant bacterial cells for plasmid release." *Biotechnology and Bioengineering* 60(6): 768-770.
- Ciccolini, L. A. S., P. A. Shamlou, N. J. Titchener-Hooker, J. M. Ward und P. Dunnill (1999). "Rheological properties of chromosomal and plasmid DNA during alkaline lysis reaction." *Bioprocess Engineering* 21(3): 231-237.
- Clemson, M. und W. J. Kelly (2003). "Optimizing alkaline lysis for DNA plasmid recovery." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37: 235-244.
- Cole, K. D. (1991). "Purification of Plasmid and High Molecular Mass DNA Using Peg- Salt 2-Phase Extraction." *Biotechniques* 11(1): 18-24.
- Diogo, M. M., J. A. Queiroz, G. A. Monteiro, S. A. M. Martins, G. N. M. Ferreira und D. M. F. Prazeres (2000). "Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography." *Biotechnology and Bioengineering* 68(5): 576-583.

- Diogo, M. M., J. A. Queiroz, G. A. Monteiro und D. M. F. Prazeres (1999). "Separation and analysis of plasmid denatured forms using hydrophobic interaction chromatography." *Analytical Biochemistry* 275(1): 122-124.
- Diogo, M. M., J. A. Queiroz und D. M. Prazeres (2003). "Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography." *J Chromatogr A* 998(1-2): 109-117.
- Diogo, M. M., J. A. Queiroz und D. M. F. Prazeres (2001). "Studies on the retention of plasmid DNA and Escherichia coli nucleic acids by hydrophobic interaction chromatography." *Bioseparation* 10(4-5): 211-220.
- Diogo, M. M., J. A. Queiroz und D. M. F. Prazeres (2005). "Chromatography of plasmid DNA." *Journal of Chromatography A* 1069(1): 3-22.
- Diogo, M. M., S. Ribeiro, J. A. Queiroz, G. A. Monteiro, P. Perrin, N. Tordo und D. M. F. Prazeres (2000). "Scale-up of hydrophobic interaction chromatography for the purification of a DNA vaccine against rabies." *Biotechnology Letters* 22(17): 1397-1400.
- Dubitsky, A. und S. Perreault (2004). A Model for Binding of DNA and Proteins to Transfer Membranes. Port Washington, NY, Pall Corporation.
- FDA (1991). Guideline on the preparation of investigational new drug products (human and animal). Rockville, MD, US Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research.
- FDA (1996). Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Center for Biologics Evaluation and Research, Office of Vaccine Research and Review.
- Ferreira, G. N. M. (2005). "Chromatographic approaches in the purification of plasmid DNA for therapy and vaccination." *Chemical Engineering & Technology* 28(11): 1285-1294.
- Ferreira, G. N. M., J. M. S. Cabral und D. M. F. Prazeres (2000). "Anion exchange purification of plasmid DNA using expanded bed adsorption." *Bioseparation* 9(1): 1-6.
- Ferreira, G. N. M., G. A. Monteiro, D. M. F. Prazeres und J. M. S. Cabral (2000). "Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications." *Trends in Biotechnology* 18(9): 380-388.

- Frerix, A. (2002). Trennung und Isolierung von Nukleinsaeuren aus biologischen Materialien mittels waessriger Zwei- Phasensysteme. Fachhochschule Aachen, Abteilung Juelich. Juelich.
- Frerix, A., M. Muller, M. R. Kula und J. Hubbuch (2005). "Scalable recovery of plasmid DNA based on aqueous two-phase separation." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 42: 57-66.
- Ghosh, R. (2002). "Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges." *Journal of Chromatography A* 952(1-2): 13-27.
- Greve, A. und M.-R. Kula (1991). "Phase diagrams of new aqueous phase systems composed of aliphatic alcohols, salts and water." *Fluid Phase Equilibria* 62: 53-63.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer und M. Cavazzana-Calvo (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." *Science* 302(5644): 415-419.
- Hackl, E. V., V. L. Galkin und Y. P. Blagoi (2004). "DNA interaction with biologically active divalent metal ions: binding constants calculation." *International Journal of Biological Macromolecules* 34(5): 303-308.
- Hoechst (1992). Polyethylenglykole. M. Chemicals. Frankfurt a.M.
- Holmes, D. S. und M. Quigley (1981). "A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids." *Analytical Biochemistry* 114(1): 193-197.
- Hustedt, H., K. H. Kroner und M.-R. Kula (1985). Applications of Phase Partitioning in Biotechnology. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology. H. Walter, D. E. Brooks und D. Fisher. NY, Academic Press: 529-587.
- Johansson, H. O., G. Karlstrom, F. Tjerneld und C. A. Haynes (1998). "Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems." *Journal of Chromatography B* 711(1-2): 3-17.

- Jordan, C. F., J. H. Venable und L. S. Lerman (1972). "Structure and Circular-Dichroism of DNA in Concentrated Polymer-Solutions." *Nature-New Biology* 236(64): 67-72.
- Kendall, D., A. J. Booth, M. S. Levy und G. J. Lye (2001). "Separation of supercoiled and open-circular plasmid DNA by liquid-liquid counter-current chromatography." *Biotechnology Letters* 23(8): 613-619.
- Kepka, C., J. Rhodin, R. Lemmens, F. Tjerneld und P.-E. Gustavsson (2004). "Extraction of plasmid DNA from Escherichia coli cell lysate in a thermoseparating aqueous two-phase system*1." *Journal of Chromatography A* 1024(1-2): 95-104.
- Kleideiter, G. und E. Nordmeier (1999). "Poly(ethylene glycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing low-molecular-weight electrolyte solutions Part I. Theoretical considerations." *Polymer* 40(14): 4013-4023.
- Kleideiter, G. und E. Nordmeier (1999). "Poly(ethylene glycol)-induced DNA condensation in aqueous/methanol containing low-molecular-weight electrolyte solutions Part II. Comparison between experiment and theory." *Polymer* 40(14): 4025-4033.
- Kula, M.-R. (1985). Liquid-Liquid Extraction of Biopolymers. Comprehensive Biotechnology. A. Humphrey und C. L. Cooney. NY, Pergamon Press. 2: 451-471.
- Kula, M. R. und K. Selber (1999). Protein Purification by Aqueous Liquid-Liquid Extraction. Enzyclopaedia of Bioprocess Technology. M. C. Flickinger und S. W. Drew. NY, John Wiley & Sons, Ltd: 2179-2191.
- Lander, R. J., M. A. Winters, F. J. Meacle, B. C. Buckland und A. L. Lee (2002). "Fractional Precipitation of Plasmid DNA from Lysate by CTAB." *Biotechnol Bioeng* 79(7): 776-784.
- Leitner, W. W., H. Ying und N. P. Restifo (1999). "DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects." *Vaccine* 18(9-10): 765-77.
- Lemmens, R., U. Olsson, T. Nyhammar und J. Stadler (2003). "Supercoiled plasmid DNA: selective purification by thiophilic/aromatic adsorption." *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 784(2): 291-300.

- Lerman, L. S. (1971). "Transition to a Compact Form of DNA in Polymer Solutions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68(8): 1886-1893.
- Levy, M. S., L. A. S. Ciccolini, S. S. S. Yim, J. T. Tsai, N. Titchener-Hooker, P. A. Shamlou und P. Dunnill (1999). "The effects of material properties and fluid flow intensity on plasmid DNA recovery during cell lysis." *Chemical Engineering Science* 54(15-16): 3171-3178.
- Levy, M. S., I. J. Collins, J. T. Tsai, P. A. Shamlou, J. M. Ward und P. Dunnill (2000). "Removal of contaminant nucleic acids by nitrocellulose filtration during pharmaceutical-grade plasmid DNA processing." *Journal of Biotechnology* 76(2-3): 197-205.
- Levy, M. S., I. J. Collins, S. S. Yim, J. M. Ward, N. Titchener-Hooker, P. A. Shamlou und P. Dunnill (1999). "Effect of shear on plasmid DNA in solution." *Bioprocess Engineering* 20(1): 7-13.
- Lightfoot, E. N. und J. S. Moscariello (2004). "Bioseparations." *Biotechnology and Bioengineering* 87(3): 259-273.
- Ljunglof, A., P. Bergvall, R. Bhikhabhai und R. Hjorth (1999). "Direct visualisation of plasmid DNA in individual chromatography adsorbent particles by confocal scanning laser microscopy." *Journal of Chromatography A* 844(1-2): 129-135.
- Lui, M., P. Tempst und H. Erdjument-Bromage (1996). "Methodical analysis of protein-nitrocellulose interactions to design a refined digestion protocol." *Analytical Biochemistry* 241(2): 156-166.
- Lyddiatt, A. und D. A. O'Sullivan (1998). "Biochemical recovery and purification of gene therapy vectors." *Current Opinion in Biotechnology* 9(2): 177-185.
- Makita, N. und K. Yoshikawa (2002). "Proton concentration (pH) switches the higher-order structure of DNA in the presence of spermine." *Biophysical Chemistry* 99(1): 43-53.
- Marquet, M., N. C. Horn und J. A. Meek (1997). "Characterization of Plasmid DNA Vectors for Use in Human Gene Therapy." *BioPharm* May: 42-50.
- Meacle, F. J., R. Lander, P. A. Shamlou und N. J. Titchener-Hooker (2004). "Impact of engineering flow conditions on plasmid DNA yield and purity in chemical cell lysis operations." *Biotechnology and Bioengineering* 87(3): 293-302.

- Melnikov, S. M., V. G. Sergeyev, K. Yoshikawa, H. Takahashi und I. Hatta (1997). "Cooperativity or phase transition? Unfolding transition of DNA cationic surfactant complex." *Journal of Chemical Physics* 107(17): 6917-6924.
- Melzak, K. A., C. S. Sherwood, R. F. B. Turner und C. A. Haynes (1996). "Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions." *Journal of Colloid and Interface Science* 181(2): 635-644.
- Minagawa, K., Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa, A. R. Khokhlov und M. Doi (1994). "Direct Observation of the Coil-Globule Transition in DNA-Molecules." *Biopolymers* 34(4): 555-558.
- Monteiro, G. A., G. N. Ferreira, J. M. Cabral und D. M. Prazeres (1999). "Analysis and use of endogenous nuclease activities in Escherichia coli lysates during the primary isolation of plasmids for gene therapy." *Biotechnol Bioeng* 66(3): 189-94.
- Mountain, A. (2000). "Gene therapy: the first decade." *Trends Biotechnol* 18(3): 119-28.
- Murayama, H. und K. Yoshikawa (1999). "Thermodynamics of the collapsing phase transition in a single duplex DNA molecule." *Journal of Physical Chemistry B* 103(47): 10517-10523.
- Neudecker, F. und S. Grimm (2000). "High-throughput method for isolating plasmid DNA with reduced lipopolysaccharide content." *Biotechniques* 28(1): 107-109.
- Nygaard, A. P. und B. D. Hall (1963). "A Method for Detection of RNA-DNA Complexes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 12(2): 98-107.
- O'Kennedy, R. D., C. Baldwin und E. Keshavarz-Moore (2000). "Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps." *J. Biotechnol.* 76: 175-183.
- Ohlsson, R., C. C. Hentschel und J. G. Williams (1978). "A rapid method for the isolation of circular DNA using an aqueous two-phase partition system." *Nucleic Acids Res* 5(2): 583-590.
- Pettijohn, D. (1967). "A Study of DNA Partially Denatured DNA and Protein-DNA Complexes in Polyethyleneglycol-Dextran Phase System." *European Journal of Biochemistry* 3(1): 25-32.

- Popovic, D. A. und M. Wintzerith (1983). "Hydrophobic Interaction of Ribosomal Ribonucleic-Acids on a Nitrocellulose Column." *Journal of Chromatography* 268(2): 285-290.
- Prather, K. J., S. Sagar, J. Murphy und M. Chartrain (2003). "Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification." *Enzyme and Microbial Technology* 33(7): 865-883.
- Prazeres, D. M. F., G. N. M. Ferreira, G. A. Monteiro, C. L. Cooney und J. M. S. Cabral (1999). "Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks." *Trends in Biotechnology* 17(4): 169-174.
- Prazeres, D. M. F., T. Schluep und C. Cooney (1998). "Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography." *Journal of Chromatography A* 806(1): 31-45.
- Przybycien, T. M., N. S. Pujar und L. M. Steele (2004). "Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography." *Current Opinion in Biotechnology* 15(5): 469-478.
- Ribeiro, S. C., G. A. Monteiro, J. M. S. Cabral und D. M. F. Prazeres (2002). "Isolation of plasmid DNA from cell lysates by aqueous two-phase systems." *Biotechnology and Bioengineering* 78(4): 376-384.
- Riggin, A., G. C. Davis und T. L. Copmann (1996). "Reassessing the control of residual DNA in biopharmaceuticals." *Biopharm-the Technology & Business of Biopharmaceuticals* 9(9): 36-41.
- Rush, M. G. und R. C. Warner (1970). "Alkali Denaturation of Covalently Closed Circular Duplex Deoxyribonucleic Acid." *Journal of Biological Chemistry* 245(10): 2704-2712.
- Sayers, J. R., D. Evans und J. B. Thomson (1996). "Identification and eradication of a denatured DNA isolated during alkaline lysis-based plasmid purification procedures." *Analytical Biochemistry* 241(2): 186-189.
- Schleef, M. (1999). Issues of Large- Scale Plasmid DNA Manufacturing. Recombinant proteinsm, monoclonal Antibodies and therapeutic genes, Wiley- VCH. 5a.
- Shamlou, P. (2003). "Scaleable processes for the manufacture of therapeutic quantities of plasmid DNA." *Biotechnol Appl Biochem* 37(Pt 3): 207-218.

- Southern, E. M. (1975). "Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel-Electrophoresis." *Journal of Molecular Biology* 98(3): 503-511.
- Theodossiou, I. (2002). Design of Scale-Flexible Separation Technology for the Recovery of DNA. BioCentrum-DTU. PhD thesis, Technical University of Denmark.
- Trindade, I. P., M. M. Diogo, D. M. F. Prazeres und J. C. Marcos (2005). "Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography." *Journal of Chromatography A* 1082(2): 176-184.
- Urthaler, J., R. Necina, C. Ascher und H. Woehrer (2004). Methods and Devices for producing Biomolecules,, Boehringer Ingelheim AUSTRIA GMBH.
- Varley, D. L., A. G. Hitchcock, A. M. E. Weiss, W. A. Horler, R. Cowell, L. Peddie, G. S. Sharpe, D. R. Thatcher und J. A. J. Hanak (1999). "Production of plasmid DNA for human gene therapy using modified alkaline cell lysis and expanded bed anion exchange chromatography." *Bioseparation* 8: 209-217.
- Vasilevskaya, V. V., A. R. Khokhlov, Y. Matsuzawa und K. Yoshikawa (1995). "Collapse of single DNA molecule in poly(ethylene glycol) solutions." *J. Chem. Phys.* 102(16): 6595-6602.
- Voet, D. und J. Voet (1990). Biochemistry, John Wiley & Sons, USA.
- Vogelstein, B. und D. Gillespie (1979). "Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(2): 615-619.
- Walther, W. und U. Stein (2000). "Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases." *Drugs* 60(2): 249-271.
- Wan, N. C., D. S. McNeilly und C. W. Christopher (1998). Method for lysing cells. US Patent 5.837.529, Genzyme Corporation (Cambridge, MA).
- Wicks, I. P., M. L. Howell, T. Hancock, H. Kohsaka, T. Olee und D. A. Carson (1995). "Bacterial Lipopolysaccharide Copurifies with Plasmid DNA - Implications for Animal-Models and Human Gene-Therapy." *Human Gene Therapy* 6(3): 317-323.
- Yan, L. F. und H. Iwasaki (2002). "Thermal denaturation of plasmid DNA observed by atomic force microscopy." *Japanese Journal of Applied Physics Part 1- Regular Papers Short Notes & Review Papers* 41(12): 7556-7559.

- Yoshikawa, K. (2001). "Controlling the higher-order structure of giant DNA molecules." *Advanced Drug Delivery Reviews* 52(3): 235-244.
- Yoshikawa, K., Y. Yoshikawa, Y. Koyama und T. Kanbe (1997). "Highly effective compaction of long duplex DNA induced by polyethylene glycol with pendant amino groups." *Journal of the American Chemical Society* 119(28): 6473-6477.
- Zhang, S. Y., A. Krivosheyeva und S. Nochumson (2003). "Large-scale capture and partial purification of plasmid DNA using anion-exchange membrane capsules." *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37: 245-249.
- Zhu, K. C., H. L. Jin, Y. J. Ma, Z. H. Ren, C. Xiao, Z. H. He, F. C. Zhang, Q. H. Zhu und B. Wang (2005). "A continuous thermal lysis procedure for the large-scale preparation of plasmid DNA." *Journal of Biotechnology* 118(3): 257-264.
- Zinchenko, A. A., V. G. Sergeyev, K. Yamabe, S. Murata und K. Yoshikawa (2004). "DNA compaction by divalent cations: Structural specificity revealed by the potentiality of designed quaternary diammonium salts." *Chembiochem* 5(3): 360-368.

10 Abkürzungsverzeichnis

ATPS	Aqueous two phase system
BCA	Bichinolinsäure Assay (zur Proteinquantifizierung)
BM	Biomasse (E. coli)
BSA	Bovines Serumalbumin
cccDNA	siehe scDNA
CMV	Cytomegalo-Virus
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAB	Deutsches Arzneimittelbuch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	double stranded DNA (doppelsträngige DNA)
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
FDA	Food and Drug Administration
gDNA	genomische DNA (= chromosomale DNA)
GHP	hydrophilisiertes Polypropylen
GMP	Good Manufacturing Practices
HBC	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSA	Humanes Serum Albumin
KAc	Kaliumacetat
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
LPS	Lipopolysaccharid
MD	Maltodextrin
Mw	Molekulargewicht
ocDNA	open circular pDNA
OP	Oberphase (aus ATPS)
pDNA	Plasmid DNA
PEG	Polyethylenglykol
PEG _{MW}	PEG Molekulargewicht
PEO	Polyethylenoxid
pfu	Plaque forming unit
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Realtime Polymerase Chain Reaction
scDNA	supercoiled pDNA
SDS	Natriumdodecylsulfat

ssDNA	single stranded DNA (einzelssträngige DNA)
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
UP	Unterphase (aus ATPS)
UP 100	Ultrapure 100 (QIAGEN Chromatographiesäule)
vol	Volumenanteil
WHO	World Health Organization

11 Symbolverzeichnis

Formelzeichen	Größe	Einheit
λ	Grenzflächenspannung	N/m
A_i	Oberfläche für Wechselwirkung	m ²
C_{iO}	Konzentration der Substanz i in der Oberphase	g/l
C_{iU}	Konzentration der Substanz i in der Unterphase	g/l
k	Boltzmannkonstante	J/K
k_i	Verteilungskoeffizient der Substanz i	-
Q_{dyn}	dynamische Kapazität	μg/cm ²
T	absolute Temperatur	K

1. **Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD50) zur Einsparung von Tierversuchen**
von W. Halle (1998), 92 Seiten
ISBN: 3-89336-221-5
2. **Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung**
von D. Weuster-Botz (1999), II, 320 Seiten
ISBN: 3-89336-245-2
3. **Cell Culture Models as Alternatives to Animal Experimentation for the Testing of Neuroprotective Compounds in Stroke Research**
Practical Handbook of Methods
edited by A. J. Carter, H. Kettenmann (1999), 144 pages
ISBN: 3-89336-250-9
4. **Action and Visuo-Spatial Attention**
Neurobiological Bases and Disorders
Book of Abstracts
collected by P. H. Weiss (2000), XIV, 56 pages
ISBN: 3-89336-272-X
5. **Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli***
von T. Polen (2003), 100 Seiten
ISBN: 3-89336-337-8
6. **Auslegung des Detektorsystems für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen mit hoher Sensitivität**
von U. Heinrichs (2003), IV, 238 Seiten
ISBN: 3-89336-340-8
7. **Biological Principles Applied to Technical Asymmetric Catalysis**
by A. Liese (2003), VI, 206 pages
ISBN: 3-89336-344-0
8. **Designstudie eines μ CT-Zusatzes für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen: Beispiel für ein multimodales bildgebendes System**
von M. Khodaverdi (2004), III, 162 Seiten
ISBN: 3-89336-360-2
9. **Bioprocess Development for the Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy**
by H.R. Bohnenkamp (2004), XLII, 128 pages
ISBN: 3-89336-364-5

10. **Regulation der *clp*-Genexpression durch ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus *Corynebacterium glutamicum***
von S. Engels (2004), V, 125 Seiten
ISBN: 3-89336-379-3
11. **Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli***
von M. Oldiges (2005), XVI, 181 Seiten
ISBN: 3-89336-380-7
12. **Identifizierung und Charakterisierung eines Transkriptionsregulators der Aconitase von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Krug (2005), VI, 122 Seiten
ISBN: 3-89336-382-3
13. **Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chloroperoxidase**
von S. Lütz (2005), XIV, 178 Seiten
ISBN: 3-89336-387-4
14. **Export von Proteinen mit Zwillingsarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli***
von P. J. Kreutzenbeck (2005), 118 Seiten
ISBN: 3-89336-388-2
15. **Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum***
von E. Radmacher (2005), 130 Seiten
ISBN: 3-89336-389-0
16. **Monomodale und multimodale Registrierung von autoradiographischen und histologischen Bilddaten**
von A. Vieten (2005), 116 Seiten
ISBN: 3-89336-390-4
17. **Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494**
von S. Johnen (2005), 128 Seiten
ISBN: 3-89336-400-5
18. **Ex-vivo Generierung von neutrophilen Zellen zur Prävention und Therapie der Sepsis**
von R. Herbold (2005), 202 Seiten
ISBN: 3-89336-407-2

19. **Entwicklung eines Donor/Akzeptor-Konzeptes für die asymmetrische Synthese unsymmetrischer Benzoine mit Hilfe ThDP-abhängiger Enzyme**
von P. Dünkermann (2005), 222 Seiten
ISBN: 3-89336-408-0
20. **Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifizieller und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen**
von T. T. Tran (2005), 155 Seiten
ISBN: 3-89336-412-9
21. **Modeling Based Process Development of Fed-Batch Bioprocesses: L-Valine Production by *Corynebacterium glutamicum***
by M. Brik Ternbach (2005), 202 pages
ISBN: 3-89336-413-7
22. **Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei *Corynebacterium glutamicum***
von K. C. Stansen (2005), 151 Seiten
ISBN: 3-89336-416-1
23. **Metabolic and Bioprocess Engineering – a Fruitful Symbiosis**
by R. Takors (2005), 399 pages
ISBN: 3-89336-420-X
24. **Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen *de novo* Synthese von GDP- β -L-Fucose und der *in situ* Fucosylierung von Oligosacchariden**
von C. Hoh (2005), 240 Seiten
ISBN: 3-89336-423-4
25. **Humane Primärzellen als Feederzellen für die Kokultur mit hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut**
von A. S. Magin (2006), 206 Seiten
ISBN: 3-89336-424-2
26. **Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen**
von D. Meißner (2006), 140 Seiten
ISBN: 3-89336-427-7
27. **Energie- und Redoxstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Kabus (2006), VI, 115 Seiten
ISBN: 3-89336-439-0
28. **NMR-Lösungsstruktur der humanen Hck SH3-Domäne im Komplex mit einem artifiziellen, hochaffinen Peptid-Liganden**
von H. Schmidt (2006), XII, 115 Seiten
ISBN: 3-89336-441-2

29. **Entwicklung und Untersuchung eines Verfahrens zur integrierten
Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion**
von A. Frerix (2006), VII, 126 Seiten
ISBN: 3-89336-442-0



Dr. Andreas Frerix studierte Bioingenieurwesen an der Fachhochschule Aachen, Abteilung Jülich und fertigte seine Diplomarbeit am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Betreuung von Prof. Kula, Prof. Zeise und Dr. Hubbuch an.

Seine Dissertation mit dem Titel „Entwicklung und Untersuchung eines Verfahrens zur integrierten Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion“, angefertigt am Institut für Biotechnologie 2 im Forschungszentrum Jülich, wurde in Kooperation mit der QIAGEN GmbH (Hilden) durchgeführt.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Band / Volume 29
ISBN 3-89336-442-0

Lebenswissenschaften
Life Sciences