



universität
wien

Masterarbeit

Titel der Masterarbeit

Entwicklung von Methoden zur Trennung und Analytik von Plasmidisoformen und Plasmidtopoisomeren

Verfasserin

Bakk.rer.nat. Parisa Ghazidezfuli

angestrebter akademischer Grad

Master der Naturwissenschaften (Master.rer.nat.)

Wien, 2010

Studienkennzahl lt. Studienblatt

A 066862

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Chemie

Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Michael Lämmerhofer

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2009 bis Dezember 2009 am Institut für Analytische Chemie der Universität Wien unter der Betreuung von Professor M. Lämmerhofer durchgeführt.

Professor Wolfgang Lindner danke ich für die Zurverfügungstellung des interessanten Themas.

Mein besonderer Dank gilt Professor Michael Lämmerhofer für die wertvollen Ratschläge, Hilfsbereitschaft bei Problemen und für die großartige Betreuung während der praktischen Durchführung als auch beim Verfassen dieser Arbeit.

Ich danke

Marek Mahut, der eine sehr große Unterstützung bei der Einführung in die theoretischen Hintergründe als auch während der Laborarbeit für mich war,

allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Atmosphäre,

meinem Gatten Siavash Edrisi, der mich während des Studiums tatkräftig unterstützt hat,

meiner lieben Mutter Parvin Vazirnezami, die mir immer eine gute Freundin ist.

Inhaltsverzeichnis

1	Zielsetzung.....	5
2	Einleitung	6
2.1	Plasmidstrukturen	6
2.1.1	Plasmidisoformen	7
2.1.2	pDNA Topoisomere	8
2.2	Analytik der Plasmiden.....	10
2.2.1	Anionenaustauscherchromatographie AEX.....	10
2.2.2	Größeausschlusschromatographie (SEC)	12
2.2.3	Ionen Ausschluss Chromatographie IEC	12
2.2.4	Agarose Gel Elektrophorese	12
2.2.5	Kapillargelelektrophorese (CGE)	14
3	Der experimentelle Teil	15
3.1	Plasmid-Trennungen durch AEX.....	15
3.1.1	Instrumente	15
3.1.2	Materialien	16
3.1.3	Standard-Methoden nach BI	16
3.1.4	Temperaturstudie mit der Säule <u>GenpakFax DNA-NPR</u> (Lab.Nr. 46) ..	19
3.1.5	Flussrate Studie	21
3.1.5.1	Für Säule <u>GenpakFax DNA-NPR</u> (Lab.Nr. 46) mit Dionex Ultimate 3000 System	21
3.1.5.2	Flußrate-Studie für andere Säule Gen Pak Fax DNA-NPR (Lab.Nr.51) mit HPLC mit Agilent 1100-HPLC.....	22
3.1.6	Studie zur Bestimmung einer Konzentration für isokratische Elution ..	24
3.1.7	Studie zum Bestimmen eines flachen Elution-Gradienten mit dem Agilent 1100 HPLC	26
3.1.8	Temperaturstudie bei ausgewähltem flachen Gradient	29
3.1.8.1	Mit Agilent 1100, Gradient 50-65% B , bei 35°C	29

3.1.8.2	Mit Dionex-HPLC beim Gradient 55-63% B	30
3.1.9	Recovery Bestimmung	32
3.1.10	Additive	34
3.1.10.1	Triethylentetramin im Puffer	34
3.1.10.2	Spermidin im Puffer	41
3.2	Ionenausschluss („Ion Exclusion“) Chromatographie (IEC)	44
3.2.1	Die Evaluierung der gepackten Kieselgel-Säule	44
3.2.2	Herstellung einer Trimethylsilyl-Endcapped 3-Mercaptopropyl- modifizierten Silika Phase	46
3.2.3	Chromatographische Säulentestung von 3-Mercaptopropylkieselgel ..	47
3.2.4	Oxidation von hergestelltem Mercaptopropylkieselgel	47
3.2.5	DPDS-Test	48
3.2.6	Ionenausschluß-Chromatographie mit der Sulfopropylsilikagel-Säule	49
3.2.6.1	Die Flußrate-Studie	49
3.2.6.2	Isokratische Chromatographie bei der Flußrate 100 µl/min	50
3.2.6.3	Ionenstärke Studie	52
3.2.6.4	Elution mit Wasser bei 100 µl/min	54
3.3	Optimierung der Trennung mittels Size Exclusion-Chromatographie und 2D- LC Vorversuche	55
3.3.1	SEC Vorversuche: Optimierung der Trennung der 1.Dimension	56
3.3.2	Salz-Effekt	59
3.3.3	Chromatographie von RNA-Probe auf SEC-Säule	63
3.3.4	Vorversuch für zweidimensionale Chromatographie	65
3.3.5	Zweidimensionale Chromatografie (SEC-AEX)	65
3.4	Bestimmung der Verwindungszahl der Topoisomeren von ccc-Plasmiden mittels Agarosegelelektrophorese	71
3.4.1	Instrumente und Materialien	72
3.4.2	Die erste Gelelektrophorese für 3 Plasmidgrößen	72

3.4.3	Elektrophorese für Topoisomerase behandelte pDNA1 (4892 bp)- Proben	74
3.4.3.1	Gel 1, Agarose 1,4%, EthBr 20 µg/l	76
3.4.3.2	Gel 2 , Agarose 1,4%, kein EthBr.....	78
3.4.3.3	Gel 3 , Agarose 1,4% , kein EthBr.....	79
3.4.3.4	Das Gel 4, Agarose 1,4%, EthBr 10 µg/l	79
3.4.3.5	Gel 5 , Agarose 1,4% , EthBr 5 µg/l	80
3.4.3.6	Auswertung	81
3.4.4	Die Anzahl der Supercoils bei der pDNA2 (9900 bp) ccc-Form.....	85
3.4.4.1	Das Gel 1 , Agarose 0,8% , kein EthBr	85
3.4.4.2	Das Gel 2 , Agarose 0,8% , EtBr 5µg/l.....	86
3.4.4.3	Das Gel 3 , Agarose 0,6% , 10 µg/l.....	87
3.4.4.4	Das Gel 4, Agarose 0,6% , EthBr 13µg/l.....	88
3.4.4.5	Das Gel 5, Agarose 0,8%, EthBr 3 µg/l.....	89
3.4.4.6	Die Auswertungen	90
	Zusammenfassung.....	95

1 Zielsetzung

Plasmide sind meist zirkulare doppelsträngige DNA Moleküle aus Bakterien, welche autonom replizierend sind. Plasmid-DNAs (pDNA) haben insbesondere als Vektoren zum Gen-Transfer in der Biotechnologie große Bedeutung erlangt. Von zunehmendem Interesse ist auch deren Einsatz als moderne Biopharmazeutika wegen deren potentiellen Anwendungen in der Gentherapie und Gen-Vaccinierung. .

Für die Produktion von pharmazeutisch geeigneten Plasmid-DNAs, gibt es drei Anforderungen:

Erstens müssen diese Biopharmazeutika in hoher Qualität und frei von bakteriellen Kontaminationen pyrogen-frei produziert werden.

Zweitens muss der Prozess eine gute Produktivität für die pDNA aufweisen.

Drittens muss der gesamte Prozess mit den definierten EU-Gesetzen in Einklang stehen [1].

Um die entsprechenden pharmazeutischen Qualitäten für diese Zwecke zu erzielen, sind effektive Herstellungs- und Reinigungsverfahren sowie geeignete analytische Methoden zur Qualitätskontrolle der Plasmide unterschiedlicher Größen unerlässlich.

Da die bioaktive Form der Plasmide die ccc-Form („covalently closed circular“ Form) ist, müssen die Plasmid-Endprodukte eine hohe Reinheit bzw. Homogenität hinsichtlich ccc-Form (>90%) besitzen [1]. Deshalb sind analytische Aspekte von großer Bedeutung, insbesondere für die Qualitätskontrolle, welche eine effektive Trennung der unterschiedlichen Plasmid-Isoformen unabhängig von der Größe des jeweiligen Plasmids ermöglichen und auch eine quantitative Bestimmung mit hoher Recovery ermöglichen muss [2].

In einem Teil dieser Diplomarbeit handelt es sich darum, eine generische Methode zu entwickeln, die die Trennung und analytische Bestimmung der Plasmid-Isoformen erlaubt. Die Plasmidstrukturen sind linear-, open circular- und supercoiled Isoformen, die in dem nachfolgenden Kapitel vorgestellt werden. Die ideale Methode ist jene, die die bessere Auflösung und Recovery (Wiederfindung) liefert und unabhängig von der Plasmidgröße durchführbar ist. Dazu kommt eine weitere wichtige Eigenschaft, die Robustheit der Methode. Verschiedene chromatographische Methoden basierend auf Anionenaustausch-Mechanismen wurden evaluiert.

Ebenso wurden Versuche zur Plasmid-Trennung durch Ionenausschluß Chromatographie unternommen und evaluiert, um mögliche Selektivitäten zwischen Plasmidisoformen mittels dieser neuen Methode zu erreichen.

In einem weiteren wesentlichen Teil der Diplomarbeit werden Arbeiten zur Entwicklung einer Agarosegelelektrophorese Methode für die Trennung von Plasmid-Topoisomeren beschrieben, um die Verwindungszahl der ccc-Form für zwei Plasmidgrößen zu bestimmen.

2 Einleitung

2.1 Plasmidstrukturen

Plasmide, das heißt extrachromosomale, häufig zirkuläre doppelsträngige DNA, kommen in Mikroorganismen oft natürlich vor. Plasmide können eine Größe zwischen 2 und mehr als 200 kbp (kilo-Basenpaare) besitzen und verschiedene genetische Funktionen erfüllen. Im Laboralltag versteht man jedoch unter Plasmiden ausschließlich die aus verschiedenen genetischen Elementen, wie Replikationsursprung und Resistenzgenen, zusammengesetzten Plasmidvektoren, die für viele Anwendungen (biologische Forschung, biotechnologische Produktion oder pharmazeutische Ziele) essentiell sind. Plasmide können in Bakterien durch Antibiotikaselektion vermehrt werden, weil die Plasmide ein Antibiotikaresistenzgen tragen, das die Bakterien befähigt, in einem Selektionsmedium zu wachsen. Die Plasmide enthalten einen bakteriellen Replikationsursprung, der eine autonome Replikation des Plasmids in der Bakterienzelle ermöglicht [3].

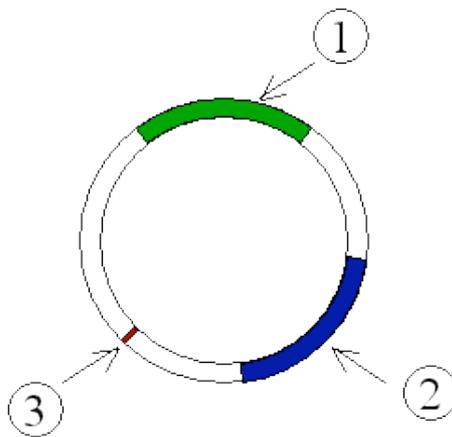


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Plasmids mit Antibiotikaresistenzgenen (1,2) und Replikationsursprung 3

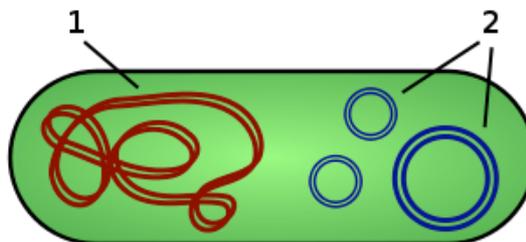


Abbildung 2: Die chromosomale DNA (1) und die Plasmid-DNA (2) in einer Bakterienzelle

Früher hat das Nomenklatur-System der Bakterien auf einem bekannten Phenotyp beruht, deren codierendes Gen in dem Plasmid vorhanden ist. Aber es konnte verwirrend sein. Im neuen System fängt der Plasmid-Name mit einem kleinen „p“ für Plasmid an, gefolgt von Großbuchstaben, die entweder auf einen Phenotyp oder, auf den Ort, wo es entdeckt wurde, bzw. auf die Person, die es erforscht hat, hinweist. Zum Beispiel steht pUC19 für „University of California“.

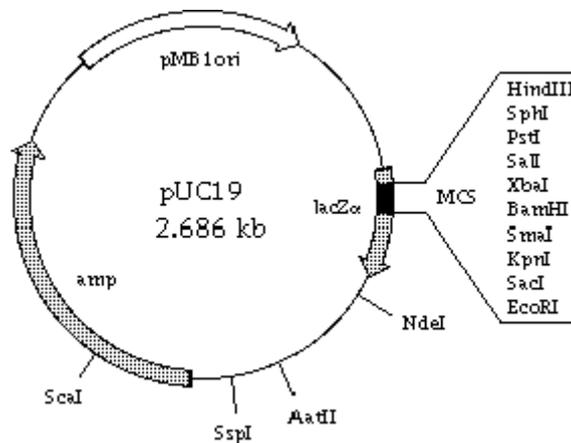


Abbildung 3: Das Plasmid pUC19 mit drei Regionen AMP, ori, lacZ und die Enzymschnittstellen

In der Biothechnologie werden die Plasmide als cloning-Vektor für Rekombinant-DNA Technologie verwendet, um Rekombinant-Proteine in den prokariotischen oder eukariotischen Zellen zu produzieren. Ein Plasmid-Vektor besteht aus einem Replikationssystem, einem oder mehreren Selektionsmarkern und einer Multicloningsite, MCS (Abbildung 3). Die ori (origin of replication) reguliert die Anzahl der Plasmidkopien. Es gibt low copy-Plasmide mit 10 Kopien und high copy-Plasmide mit der Kapazität für hundert Kopien. Die multicloning Region mit verschiedenen Restriktionsstellen für Endonukleasen erlaubt die Entstehung von Rekombinant-Plasmiden, die in der Gentherapie und Gen-Impfung benutzt werden.

2.1.1 Plasmidisoformen

Die doppelsträngige DNA hat eine helikale Struktur. Neben der inherenten Struktur für die DNA und Plasmide existieren auch andere Formen, die sich in Topologie und Größe unterscheiden. Die überwältigende Mehrheit von Plasmiden, die von Bakterien isoliert werden, sind „covalently closed circles“, die negativ gespult sind und „ccc-Form“ heißen. Wie man in der Abbildung 4 sieht, hat die ccc-Form eine kompakte Struktur. Die doppelsträngige DNA-Helix in der ccc-Form ist in sich aufgewickelt. Beide Stränge sind unversehrt und geschlossen, deswegen werden sie „covalently closed“ genannt. Ein Bruch, verursacht in einem DNA-Strang durch Nuklease oder mechanischen Stress, bildet eine „open circular“ Form oder oc-Form (in Abbildung 4 als offenkettige Form bezeichnet). Die oc-Form ist ganz entspannt und nicht kompakt. Die lineare Form entsteht, wenn beide Stränge durch Endonuklease an der selben Stelle geöffnet werden. Die oligomerische ccc- und oc-Formen werden „concatemers“ genannt, die doppelt so groß wie ihre

entsprechenden monomeren Formen sind. Es gibt noch eine Oligoform, die so genannte „catenane“, die durch Verknoten zwischen zwei Monomeren entsteht.

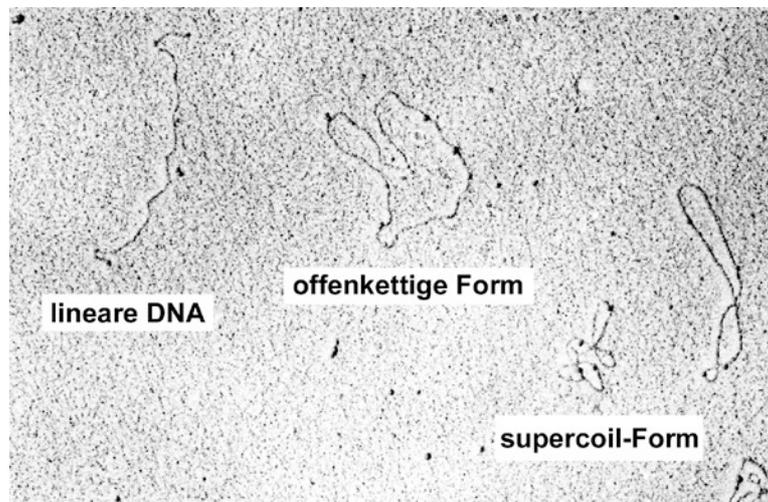


Abbildung 4: Plasmidkonformationen im elektronenmikroskopischen Bild

2.1.2 pDNA Topoisomere

DNA Topoisomerasen katalysieren die Superspiralisierung zu ccc-Plasmidform sowie deren Relaxation der zirkulären DNA. Es gibt zwei Gruppen von Topoisomerasen. Topoisomerase Typ 1 schneidet einen DNA-Strang (Einführung sogenannter „nicks“, bei denen es sich um Einzelstrangbrüche handelt). Daraufhin kann dann das DNA Molekül durch Entfernen der Supercoils entspannt werden. Topoisomerasen vom Typ 2 schneiden hingegen beide Stränge der doppelsträngigen DNA.

Die Mehrheit der superspiralisierten Plasmide in Bakterien ist negativ „supercoiled“, während die innere DNA-Helix-Struktur rechtwinklig ist [2].

Wir haben zwei Arten von Windungen: Die Wicklung der DNA-Stränge aneinander T_w (twist) und die Verwindung der Doppelhelix-Achse im Raum W_r (writhe). Erklären kann man dies schematisch anhand von zwei Seilen, die man umeinander aufwickelt. Sobald man davon einen geschlossenen Ring macht, wird die zweite Verwindungsart bzw. „writhe“ automatisch passieren. Die Verwindung der DNA-Helix im Raum kann auch in 2 Formen passieren. Entweder „plectonemic“, ein Teil der Doppelhelix-DNA ist an einem anderen Teil gewunden oder „toroidal“, die Windung der Doppelstrang-DNA um eine virtuelle Ring- bzw. Torus-Achse.

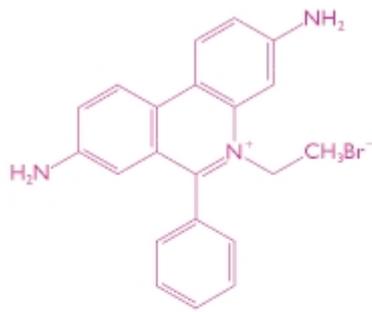
Um ein quantitatives Maß für die Doppelhelix-Verwindungen zu haben, kann man die Verwindungszahl („linking number“) definieren. Die Verwindungszahl wird als die Summe von T_w und W_r definiert. Für jedes bestimmte ccc-Plasmid ist die Verwindungszahl konstant. Jede Änderung der T_w führt zur einer ausgleichenden Änderung in W_r und umgekehrt.

Verwindungszahl (LK) = twist (T_w) + writhe (W_r)

Zum Beispiel kann ein Temperaturanstieg oder Zugabe von Ethidiumbromid (EthBr) zu einer Änderung in T_w und W_r führen. Die Elektronenmikroskop-Aufnahmen haben ein übliches Verhältnis von 75% W_r plus 25% T_w für L_k gezeigt [4].

Ethidium Bromid-Interkalation: EthBr wickelt die DNA-Helix lokal um 26° ab. T_w sinkt (ausgleichend wird W_r erhöht): Dies bewirkt eine Senkung des negativ-Supercoiling, was daher eine Senkung der Mobilität in der AGE ergibt. Mit steigenden EthBr-Konzentrationen wird man höhere W_r und niedrigere Mobilität haben, bis zu einem kritischen Punkt, wo das Negativ-Supercoiling komplett weg ist, das Molekül völlig relaxed ist. Mit weiterer Zugabe von EthBr erhält man dann ein positiv-Supercoiling. Dann fängt positive W_r an und die Mobilität in der AGE wird wieder höher. Deswegen hat man gaußförmiges Muster bei Agarose Gel Elektrophorese [5].

(A) Ethidium bromide



(B) The mutagenic effect

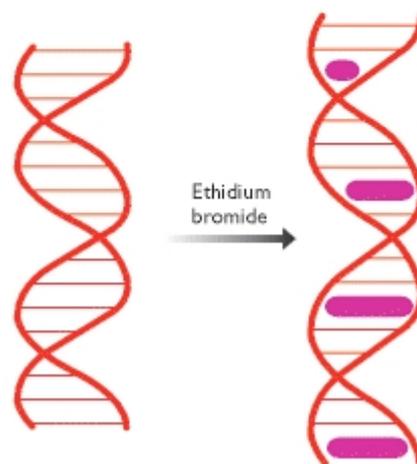


Abbildung 5: A) Ethidiumbromid (EthBr) ein Interkalator, B) Einlagerung der EthBr-Moleküle zwischen den Basenpaaren verursacht eine gewisse Entspannung in der DNA-Helix

2.2 Analytik der Plasmiden

Die Routine-Analytik für Plasmide begann mit großem Interesse, wie erwähnt, seitdem die Plasmide als Vektoren in Gentherapie und DNA-Vaccination benützt werden.

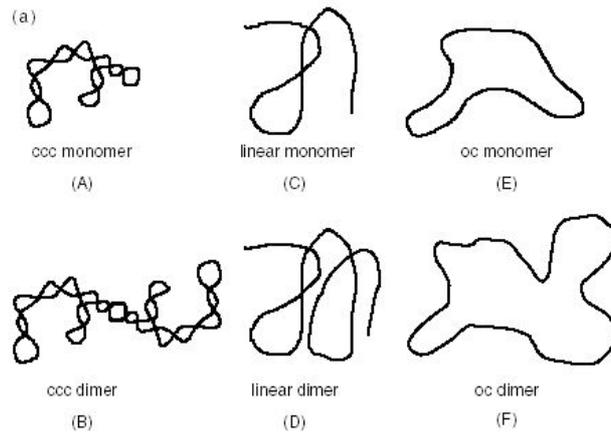
Die physikalisch-chemischen Eigenschaften, die deutlich anders als bei den Proteinen sind, haben großen Einfluss auf entsprechende technische Methoden. Die Ladung der Polynukleotide ist unter physiologischen Bedingungen stark negativ, und wegen ihrer Größe und Form sind die Polynukleotide sensitiver für Scherkräfte. Ein typisches Plasmid mit der Größe 3 bis 20 Kilobasenpaare erscheint in verschiedenen Isoformen. Die supercoiled-Form bzw. „covalently closed circular (ccc)“ Form ist die erwünschteste Form für therapeutische Anwendungen. Die zwei anderen Isoformen, open circular Form (oc) und lineare Form, kommen von der ccc-Form ab. Laut USA FDA (Food and Drug Administration) muss die Homogenität, definiert als Mengenprozent von ccc-Form in der Probe, höher als 90% sein, und das ist der wichtigste Parameter neben der allgemeinen chemischen Reinheit für die Qualität eines pDNA-Produktes. Im Prinzip hat der pDNA-Produktionsprozess drei Stufen: Fermentation, Zell-Aufschluss und Reinigung. Downstream Prozess der pDNA beginnt mit einem alkalischen Zell-Aufschluss zur Gewinnung der Plasmide. ‚Die alkalische Lysis‘ ist die Methode der Wahl für den Aufschlussprozess mit industriellen Absichten, weil die ‚Hochdruck-Homogenisierung‘ für Plasmide schädlich ist und ‚die enzymatische Lyse‘ wirtschaftlich nicht günstig ist.

Nach der Herstellung der Lysate beginnt die Reinigung. Die angewandten Prozesse sind Extraktion und Ausfällung der pDNAs durch organische Lösungsmittel, Ultrafiltration und Flüssigchromatographie[1].

Chromatographie ist bekannt als eine Methode mit hoher Auflösung, weswegen diese geeignet ist für therapeutische pDNA Produktion ist. Die meist benützten Methoden sind Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), Anionenaustauschchromatographie (AEX) und „Size Exclusion“ Chromatographie. Diese Reihenfolge entspricht jener wie sie im chromatographischen Verfahren beim industriellen Reinigungsprozess zur Anwendung kommen.

2.2.1 Anionenaustauschchromatographie AEX

Anionenaustauschchromatographie ist die übliche Methode für pDNA-Analyse. Das Prinzip beruht auf elektrostatische Interaktion zwischen negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Helix und der positiv geladenen stationären Phase (in dieser Arbeit Diethylaminoethyl-Gruppen).



Die Interaktionsstärke basiert nicht nur von der Netto-Ladung, sondern auch von der Ladungsdichte. Mit steigender Salzkonzentration werden die DNA-Moleküle nach ihren Längen (Anzahl der Phosphatgruppen) eluiert. Die Trennung von Isoformen mit gleicher Ladung ist auch möglich. Die ccc-Form hat eine höhere Ladungsdichte als die oc-Form und die lineare Form. Durchaus resultiert es eine stärkere elektrostatische Anziehung zu positiv geladenen Liganden, was zur späteren Elution der ccc-Form gegenüber anderen Formen führt. Es gibt einige weitere Parameter, die die Elution beeinflussen können, wie zum Beispiel Scherkräfte (für linear-Form sind diese größer), Elastizität (lineare Form hat mehr Elastizität), Dipol-Dipol Wechselwirkungen, Wasserstoff Bindungen, solvophobe Wechselwirkungen und auch der AT-Gehalt. [6]

Anionenaustauscherchromatographie ist, wie erwähnt, eine übliche Methode fürs Gewinnen und Reinigen der pDNA, sowohl im analytischen Lab, als auch für präparative Arbeit. HPLC liefert im Prinzip eine gute Selektivität für pDNA in Anwesenheit von RNA, Endotoxine und Proteine. Auf der anderen Seite ist die Effektivität, aber sehr abhängig von der Proben-Komposition und Proben-Vorbereitung sowie der Herkunft des Produktes.

Die Grundlage für den Ionenaustausch ist die kompetitive Wechselwirkung geladener Ionen. Die geladenen pDNAs konkurrieren mit Salzionen, in diesem Fall Chloridionen, um den geladenen Positionen auf der stationären Phase (in unserer Studie die Diethylaminoethyl-Gruppen) zu bekommen. Im ersten Schritt nach der Injektion binden die pDNA-Moleküle an fixierte Ladungen an der stationären Phase unter bestimmten pH-Bedingungen. Im zweiten Schritt wird die Elution des Analyten durch die steigende Salzkonzentration des Eluenten stattfinden. Die Ladung der stationären Phase und der Analyte ist natürlich sehr stark abhängig von pH-Wert des Puffers. Bei pH 9 sind die Plasmide negativ und Diethylaminoethyl positiv geladen. Die verwendete Standard-Methode wird später definiert.

AEX kann auch in Form von zweidimensionaler Chromatographie nach einer SEC-Säule angewendet werden.

2.2.2 Größeausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie (Size-Exclusion-Chromatographie SEC) trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Für das Trennverhalten ist das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle verantwortlich. Die bestimmten Trenngele enthalten Poren, die in einem kritischen Verhältnis zu den Molekülgrößen stehen. Die Analytmoleküle ab einer bestimmten Größe können nicht in die Poren eindringen und eluieren im Ausschlussvolumen. Kleinere Moleküle bewegen sich nicht nur ungehindert zwischen den einzelnen Teilchen der stationären Phase, sondern dringen außerdem auch in ihre Poren ein. Dadurch wird die Elution verzögert und das Elutionsvolumen entspricht der Summe des internen Porenvolumens und des Partikelzwischenraums.

Die kleinsten Komponenten haben somit die längste Aufenthaltsdauer in den Poren und werden zuletzt eluiert.

Für pharmazeutische Plasmid-Proben wird die SEC-Methode in dem letzten Reinigungsprozess benutzt. Grundsätzlich könnte man SEC aber auch in früheren Prozessstufen einsetzen, jedoch ist dies ungünstig hinsichtlich Produktivität. Wie wir in den Ergebnissen sehen werden, werden zuerst Plasmide, dann RNA-Moleküle und am Schluss niedermolekulare Substanzen von einer SEC-Säule eluiert.

2.2.3 Ionen Ausschluss Chromatographie IEC

„Ion Exclusion“ Chromatographie wird normalerweise für die Trennung von schwachen Säure-Anionen benutzt. Dafür werden starke Kationen-Austauscher mit hoher Konzentration der funktionellen Gruppen zur Erhöhung des Exclusion-Effektes benutzt. Die funktionellen Gruppen sind oft Sulfonsäure-Gruppen.

Der Retentionsmechanismus in IEC lässt sich wie folgt erklären: Die neutralen ungeladenen Moleküle dringen in die Pore der Phase ein, während die ähnlich geladenen Molekülen durch dissoziierte geladene funktionelle Gruppen auf der stationären Phase abgestoßen werden. In der IEC werden die stark geladenen Molekülen zuerst und die schwach geladenen Molekülen später eluiert. Die stark geladenen Moleküle werden in Ausschlussvolumen eluiert. Die ungeladenen Moleküle werden mit t_0 eluiert. Der t_0 -Marker, der keine Wechselwirkung mit der stationären Phase hat, wird am Schluss eluiert[7].

2.2.4 Agarose Gel Elektrophorese

Die meist verwendete Methode zur Bestimmung der Verteilung der Plasmidformen ist die Agarose-Gel-Elektrophorese (AGE). Bei der AGE werden die verschiedenen Plasmidstrukturen in einem elektrischen Feld nach ihrer Mobilität in einer Polymer-Matrix von der Agarose getrennt. Die Nukleinsäuren sind in einem großen pH-Bereich negativ geladen, wegen ihrem Zuckerphosphat-Gerüst. In einem elektrischen Feld wandern die Nukleinsäuren zur positiv geladenen Anode. Die Polymer-Matrix wie Agarose oder Polyacrylamidgel bilden ein Netzwerk, was die Mobilität der großen Moleküle behindert. Die Unterschiede in den Größen der DNA-

Strukturen beeinflussen die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle. Die Nucleinsäuren besitzen eine hohe gleichbleibende Ladungsdichte, das heißt, das Verhältnis von Molekulargewicht zur Ladung ist stets konstant. So ist die Erzeugung einheitlicher Ladungsoberflächen mit Hilfe von SDS unnötig, was zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen benötigt wird.

Die Trennung erfolgt letztlich aufgrund unterschiedlicher Retentionen von Plasmiden mit verschiedenen Größen im Gel. Wenn eine Plasmid-Probe wird durch die AGE-Methode analysiert wird, beziehen sich die verschiedenen getrennten Bande auf die verschiedenen Plasmid-Größen oder Plasmid-Topologiestrukturen wie zum Beispiel ccc-, oc-, oder linear-Plasmidformen. Die elektrophoretische Mobilität hängt von topologischen Plasmidstrukturen, die sich unter unterschiedlichen Bedingungen ändern können, wie zum Beispiel als elektrischer Spannung, Temperatur, Ionenstärke von elektrophoretischem Puffer und die Farb-Konzentration. Deswegen werden oft „die unbehandelte Probe“, „linear-Form“, „Marker“ und andere vergleichbare Proben parallel auf das Gel für jeden Versuch aufgetragen[4].

In der Regel wandert die kompakte monomere ccc-Form schneller als alle anderen Formen. Die relaxierte oc-Form wandert im AGE wesentlich langsamer als die lineare Form (Abb. 6).

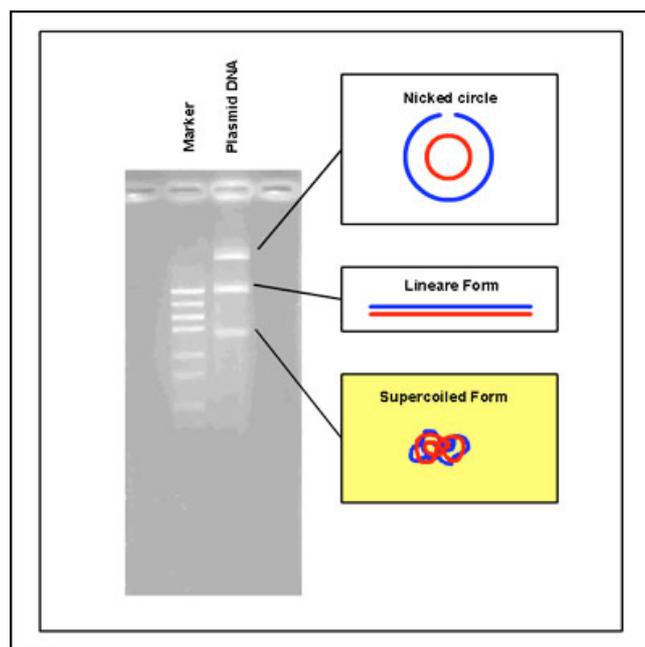


Abbildung 6: Gelelektrophorese mit Plasmid-DNA (Enzyklopädie Chemgapedia)

2.2.5 Kapillargelelektrophorese (CGE)

Die Kapillargelelektrophorese ist eine neuere analytische Methode fürs Quantifizieren der Plasmidstrukturen. Bei dieser Methode erfolgt die Trennung der verschiedenen Plasmidstrukturen im elektrischen Feld in einem mit Polymer-Lösung gefüllten dünnen Fused-Silikakapillar. Für die DNA-Analyse müssen die Kapillaren mit einer neutralen Schicht gecoatet sein. Die angelegte Spannung ist für die DNA-Analyse meist 30kV. Die Probe wird hydrodynamisch durch Druck oder elektrokinetisch durch ein elektrisches Feld injiziert. Während der Elektrophorese tauchen beide Enden der Kapillare je in einem Puffergefäß. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Plasmidmoleküle durch die Polymer-Lösung und fließen durch das Detektor-Fenster. Die DNAs werden durch UV-Licht ($\lambda = 258 \text{ nm}$) detektiert. Die Trennung von Plasmidisformen basiert in dieser Methode auf Größe und Form[3].

Erwähnenswert ist, dass die Geschwindigkeit der Plasmidisformen durch den HPLC-Detektor gleich ist, so ist die Peakfläche proportional zu der Probenkonzentration. Aber bei CGE sind die Migrationsgeschwindigkeiten der Moleküle durch Detektor nicht gleich[8]. Das heißt während der Migration durch den Detektor findet noch immer Trennung statt. Aus diesem Grund ist es oft sinnvoll mittels korrigierten Peakflächen zu quantifizieren ($A_{\text{corr}} = A/t_{\text{mig}}$).

Die Reihenfolge der migrierten Plasmide ist in der Abbildung 7 gezeigt. A: ccc Monomer, B: ccc Dimer, C: linear Monomer, D: linear Dimer, E: oc Monomer, F: oc Dimer

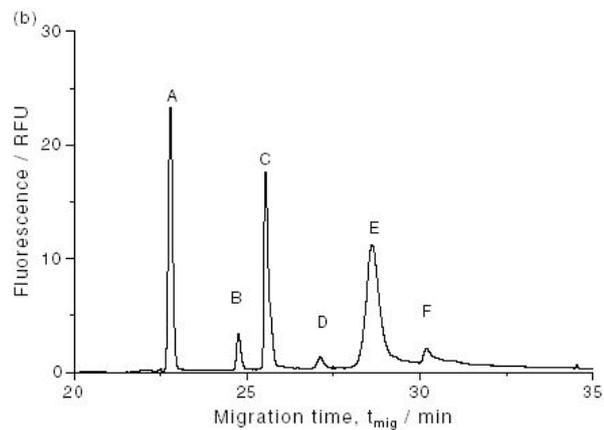


Abbildung 7: CGE-Elektropherogramm (Der Lehrstuhl für Fermentationstechnik an der Universität Bielefeld)

3 Der experimentelle Teil

Im Zuge der analytischen Qualitätskontrolle und Trennungsmethode für Plasmidisoformen sind noch einige Probleme offen. Um eine generische Methode zu entwickeln, die die Trennung und analytische Bestimmung von linear-, oc-, ccc-Form und dimeren und multimeren pDNA-Strukturvarianten für verschiedene Plasmidgrößen, unabhängig von ihren Größen, erlaubt, wird es einerseits auf Trennmaterialien, andererseits auf Trennmethode (Eluenten und Gradienten) und Methodvalidierung gearbeitet. Insbesondere sollen Präzision, Nachweisgrenzen sowie Recovery, die besonders bei größeren Plasmiden zum Problem werden kann, Teil dieser Methodvalidierung sein. Die entwickelte Methode soll die Recovery 99% und die Auflösung mehr als 2 erreichen können.

Die im ersten dritten Kapiteln durchgeführten Experimente dienen als Preexperimente, die einige Basiswissen für manche Methodenentwicklungsideen wie zum Beispiel generische AEX-Methode, zweidimensionale AEX und Ionenausschlusschromatographie für Plasmide verleihen. Im vierten Kapitel wird ein bedeutsamer Plasmidstrukturparameter, nämlich Verwindungszahl, für zwei Plasmidgrößen, Standardplasmide pDNA1 (4892 bp) und pDNA2 mit 9900 bp, durch AGE quantifiziert.

3.1 Plasmid-Trennungen durch AEX

In diesem Teil werden einige Experimente mit dem Ziel der Optimierung der AEX-Trennung für das Plasmid pDNA1 (4892 bp) durchgeführt. Durch Variieren der Parameter wie zum Beispiel Flußrate, Temperatur und Salzkonzentration in der mobilen Phase versucht man eine bessere Trennung für Plasmidisoformen zu finden.

3.1.1 Instrumente

Die verbrauchten Säulen TOSOH DNA-NPR Gen-Pak FAX 4,6x100 mm mit der part No. WAT015490 Wurden verwendet.

Die benutzten HPLC-Geräte waren:

1. Dionex Ultimate 3000
2. Agilent 1100 mit binärer Pumpe G1312 A, Degasser jp73024005, ALS G1329A, FC/ALS Therm G1330B, TCC G1316A, DAD-Detektor G1315B
3. Agilent 1200
4. Agilent 1100 im HPLC-Labor

Die mobile Phase wurde durch 0,22 µm Nylon Membran(Sigma) filtriert und der pH-Wert wurde mit pH-Meter ‚inolab‘ WTW series pH 720 gemessen.

Die Proben wurden möglichst frisch verwendet. Weil mit der Zeit können die ccc-Plasmidisoformen durch UV-B Bereich, was im Sonnenlicht auch vorhanden ist, oder auch Temperatur geschädigt werden und in oc-Form umgewandelt werden[9].

3.1.2 Materialien

Die folgenden Puffer wurden als mobile Phase verwendet;

Puffer A: Tris-HCl (Trizma-SIGMA T3253) 20 mM, pH 9

Puffer B: Tris-HCl (Trizma) 20 mM/ NaCl (Fluka,71381) 1M, pH 9

Die Proben waren Plasmid pDNA1 (4892 bp) final bulk mit der Konzentration 2,84 mg/ml, pDNA1 (4892 bp) lineare Form mit der Konz. 0,05 µg/µl(HindIII) und pDNA1 (4892 bp) oc Form mit der Konz. 0.05 µg/µl (Nt.BstNB1).

3.1.3 Standard-Methoden nach BI

Zuerst werden Standard Methoden bei zwei HPLC-Geräten, nämlich Dionex-HPLC, Agilent 1200 durch relative Standardabweichung für Peakfläche verglichen.

20 µl Natriumsalz 3 M (Fluka 71381, 99,5%) in die mit Puffer A und Puffer B 1:1 äquilibrierte Säule injiziert. Der Waschgradient fängt mit 50% B an. In 2 Minuten steigt die Konzentration des Puffers B auf 100%. Für eine Minute bleibt der Eluent-Anteil bei 100% Puffer B. Nachher sinkt die Salzkonzentration rasch (in 0,005 Min.) wieder auf 0,5 M ab und so beginnt die Äquilibrationsphase (10 Min.) für nächsten Lauf. Die Säule soll mit einem Eluentvolumen gleich 10-15-mal ihres Volumens äquilibriert werden. Der ganze Waschgradient wird nochmal erfolgen, damit die restlichen gebundenen Plasmide vollkommen eluiert werden.

Nach 2 Reinigungsläufen wird 3 µl der Probe pDNA1 (4892 bp) final bulk injiziert. Der Elutionsgradient fängt hier mit 0,5 M Salzkonzentration. In 5 Minuten wird die Salzkonzentration auf 0,75 M erhöht und dann schnell wieder auf 0,5 M Salzkonz. absinkt, worauf die Äquilibrierung für 10 Minuten mit der 500 µl/min bei dieser Konzentration erfolgt.

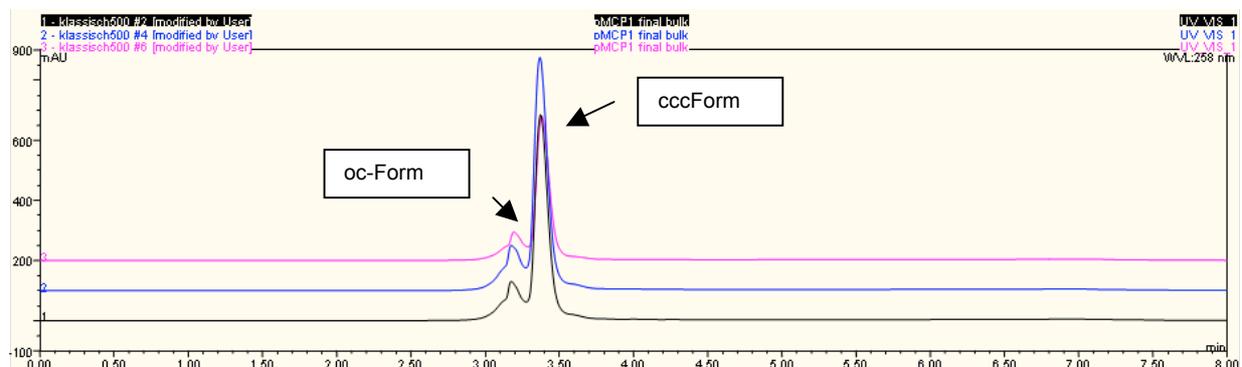


Abbildung 8: Dionex-HPLC , 3 Läufe mit 3 µl der Probe pDNA1 (4892 bp) fb

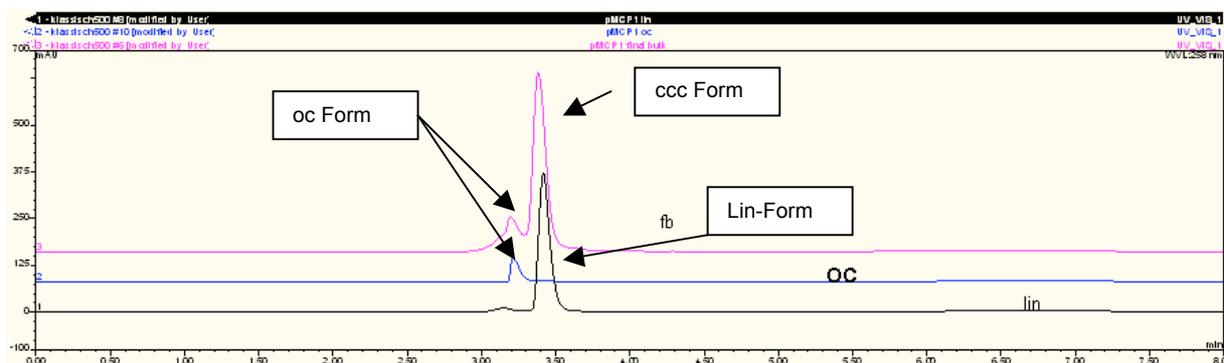


Abbildung 9: Dionex-HPLC; fb- , oc- und linear-Proben; Die 3 pDNA1-Isoformen

Aus Abb. 8 und Abb. 9 wird es sichtlich, dass die oc-Form gut von der ccc-Form getrennt werden können. Allerdings coeluiert die lineare Form unter den verwendeten Bedingungen mit der ccc-Form.

Aus der folgenden Tabelle der Chromatographieren-Daten geht hervor, dass die Retentionszeit der wiederholten Läufe keine bedeutsame Änderung zeigt. Für die Peakflächen wurde die relative Standardabweichung berechnet.

Tabelle 1: Dionex-HPLC , die Ergebnisse durch Standard-Methoden

„pDNA 1“	Peakfläche mAU*min	Retentionszeit min	Peakfläche mAU*s	Rel. STABW für Peakfläche (RSD)
final bulk	92,188	3,373	5531,28	0,25%
	105,067	3,373	6304,044	
	63,0982	3,38	3785,892	
Lin	33,5822	3,42		
Oc	5,1256	3,213		

Die Standard-Methode wurde genauso für 3µl pDNA1 (4892 bp)-final bulk, -oc und -linear auf dem Agilent 1200 System durchgeführt. Die Waschgradienten und Äquilibrierzeiten wurden immer zwischen den Läufen durchgeführt und berücksichtigt.

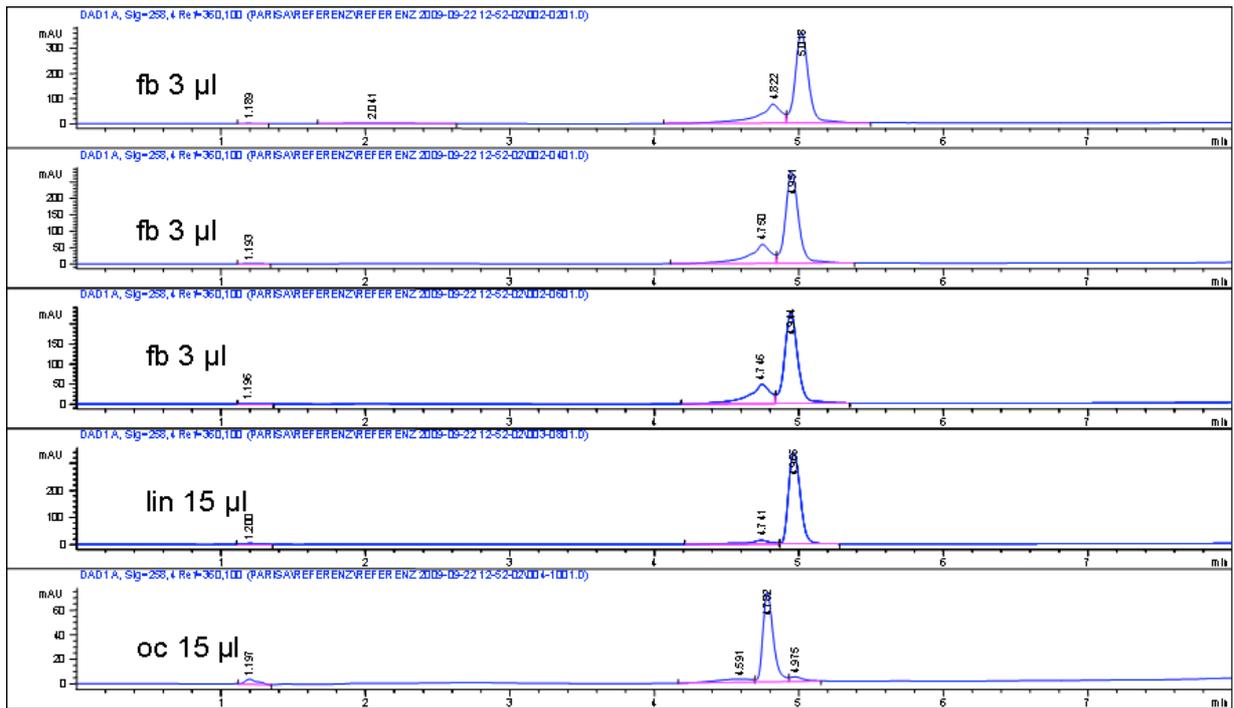


Abbildung 10: Agilent 1200-HPLC, Die AEX-Chromatographie von 3 Plasmidisformen

In der folgenden Tabelle wurde die relative Standardabweichung berechnet. Wenn man die rel. STABW bei beiden HPLC-Geräten vergleicht, sieht man keinen großen Unterschied zwischen beiden.

Tabelle 2: Agilent 1200, Die Probe pDNA1, Standard-Methode

Probe „pDNA 1“	Retentionszeit min	Peakfläche mAU*s	Rel. STABW für Peakfläche (RSD)
Fb	5,018	3197,2	0,22%
	4,951	2523,5	
	4,944	2045,7	
Lin	4,965	2046,2	
Oc	4,872	479,9	

Am Schluss wird die Standard-Methode auch für das Agilent-1100-HPLC gemacht. In allen Versuchen später kann man immer die Ergebnisse mit denen der Standard-Methode vergleichen.

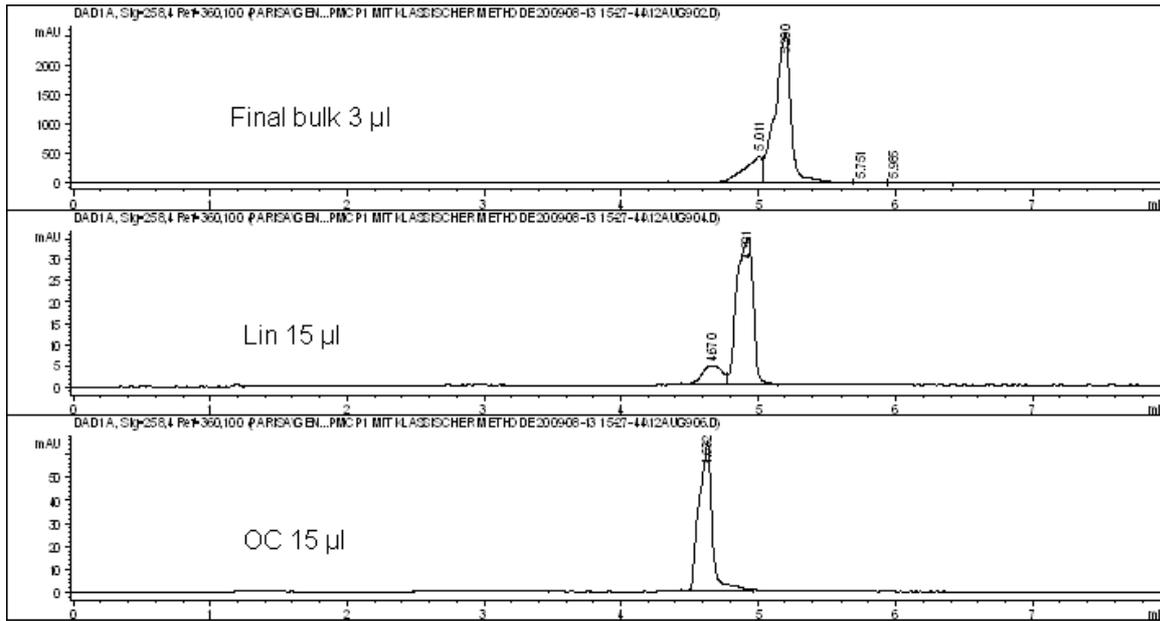


Abbildung 11: Agilent1100-HPLC, Standard Methode für drei Plasmidisoformen

Tabelle 3: Die Ergebnisse von Standard-Läufen mit Agilent1100-HPLC für die Plasmidisoformen

	pDNA1 final bulk	pDNA1 lin	pDNA1 OC
Peakfläche	25151,2	324,4	431,5
Retentionszeit (min)	5,2	4,921	4,632

Die Totzeit t_0 ist für die Säule GenpakFax DNA-NPR (Lab.Nr. 51) 1,2 Minuten.

3.1.4 Temperaturstudie mit der Säule GenpakFax DNA-NPR (Lab.Nr. 46)

Die Probe „final bulk“ wird bei verschiedenen Säule-Temperaturen mittels Standardmethode analysiert. Zuerst wird die Säule mit einem Reinigungsgradient gereinigt und dann entsprechend äquilibriert.

Reinigungsgradient: 20µl NaCl 3M wird injiziert, A:Tris-HCl 20mM pH 9, B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9, Gradient 50-100% B in 2 Min, 1 min 100% B, 10 Min Äquilibrieren.

Die Methode: Injektion von 5 µl pDNA1 (4892 bp) fb, der Puffer B in der mobilen Phase wird von 50% auf 100% in 2 min steigen. Für eine Minute bleibt es bei 100% und nachher ist die Äquilibrierzeit 10 Minuten bei der Flußrate 500 µl/min.

Die Methoden unterscheiden sich in Temperatur. Deshalb müssen nach den Reinigungsläufen vor den analytischen Läufen die stationäre Phase mit neuer Temperatur äquilibrieren.

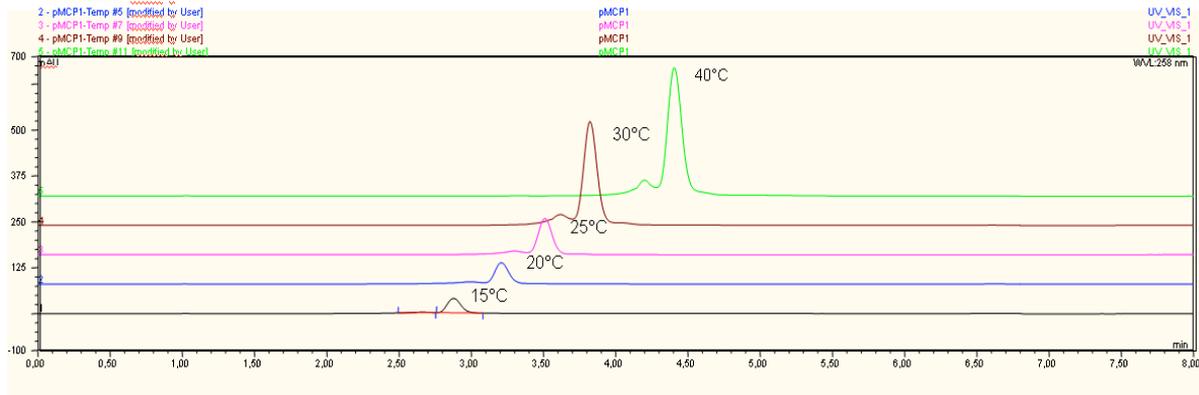


Abbildung 12: Dionex HPLC-Chromatogramm bei unterschiedlichen Temperaturen

Tabelle 4: Die Daten von Temperaturstudie

Temperatur(°C)	Temperatur K	Peakfläche mAU*min	ccc-tR(min)	ln k*	Auflösung (oc/ccc-Form)
15	288	4,5232	2,88	1,06	1,06
20	293	6,3584	3,207	1,17	1,2
25	298	10,6787	3,513	1,26	1,29
30	303	29,4394	3,82	1,34	1,27
40	313	38,1191	4,407	1,48	1,38

k*: sichtbare Retentionsfaktor; der uns die Retention der Verbindung im Chromatogramm weitergibt (Peaklocator).

Daraus lässt sich ableiten dass, die Interaktion zw. Plasmiden und stationärer Phase endothermisch ist bzw. entropisch dominiert ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Retention mit steigender Temperatur höher wird.

Das Resultat in dieser Studie stimmt mit dem Wissen überein, dass die negative Spulung des ccc-Plasmides in Bakterien durch Steigung der Temperatur steigt [2]. Wenn die Verwindungszahl des ccc-Plasmides steigt, wird es zur Erhöhung der Ladungsdichte führen, was eine stärkere Retention an der stationären Phase verursacht. So kann man erwarten, dass die Plasmide bei höheren Temperaturen später eluiert werden.

3.1.5 Flussrate Studie

3.1.5.1 Für Säule GenpakFax DNA-NPR (Lab.Nr. 46) mit Dionex Ultimate 3000 System

Die Probe pDNA1 (4892 bp) final bulk wird mit gleichen Bedingungen aber unter unterschiedlichen Flußrate injiziert.

Die Methode: Injektionsvolumen 5µl pDNA1 (4892 bp) fb, Die mobile Phase (Puffer A: Tris,HCl 20mM pH 9, Puffer B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9), Gradient 50-75% B in 5 min, 3 min Äquilibrieren, Flußrate variiert.

Reinigungsgradient: 20µl NaCl 3M wird injiziert, A:Tris,HCl 20mM pH 9, B:Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9, Gradient 50-100% B in 2 Min, 1 min 100% B, 10 Min Äquilibrieren.

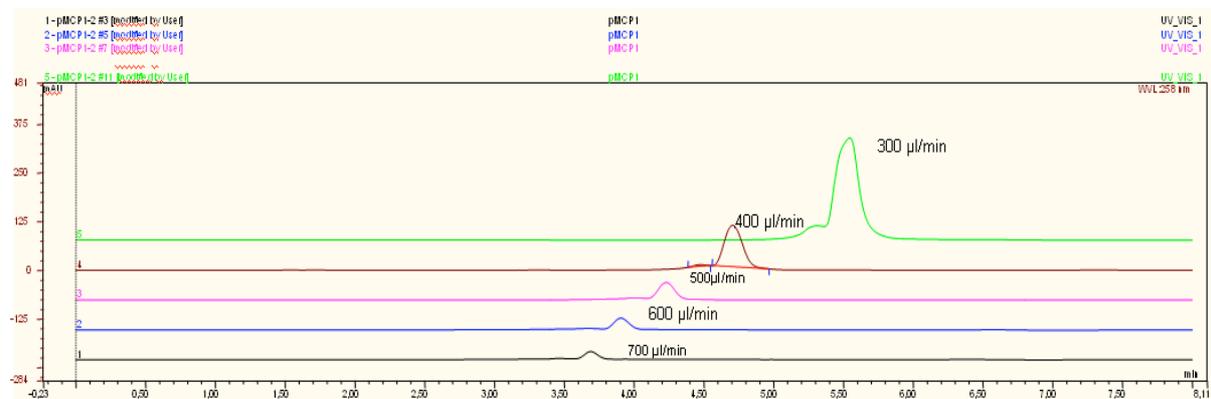


Abbildung 13: Chromatogramme für Änderung der Flußrate, Säule GenpakFax DNA-NPR (Lab.Nr. 46) , Dionex 3000-HPLC

Tabelle 5: Die Abhängigkeit der Retentionszeit von der Flußrate

Flußrate (µl/min)	Peakfläche (mAU*min)	ccc-t _R (min)	Auflösung (oc-ccc-Form)
700	2,5097	3,693	0,65
600	3,6027	3,907	1,01
500	5,6248	4,233	1,12
400	16,3089	4,473	1,15
300	43,7933	5,547	0,94

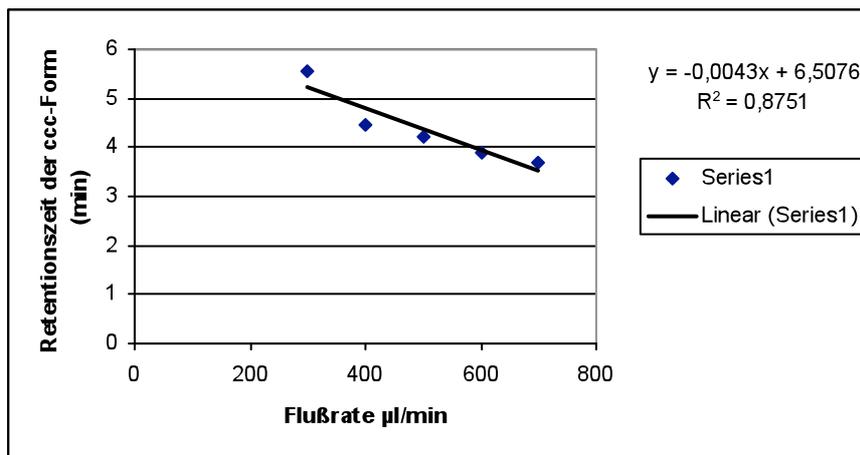


Abbildung 14: Abhängigkeit der Retentionszeit von Flußrate

Die Retentionszeit ist umgekehrt proportional zur Flußrate. Bei langsamerer Flußrate fließt der Analyt langsamer durch den Detektorzelle, deshalb wird er länger detektiert und verursacht größere Peake.

3.1.5.2 Flußrate-Studie für andere Säule Gen Pak Fax DNA-NPR (Lab.Nr.51) mit HPLC mit Agilent 1100-HPLC

Die Flußrate Studie wird hier mit dem Agilent 1100 HPLC-Gerät wiederholt.

Die Methode: Injektion von 5µl pDNA1 (4892 bp) final bulk, die mobile Phase bestehend aus den Puffern (A: Tris,HCl 20mM pH 9) und (B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9), der Elutionsgradient 50-75% B in 5 min, 3 min äquilibriumieren, Flußrate variiert (300, 400, 500, 600, 650 µl/min).

Reinigungsgradient und Äquilibriumieren: 20µl NaCl 3M wird injiziert, der Puffer (Tris,HCl 20mM pH 9/ Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9), Gradient 50-100% B in 2 Min, 1 min 100% B, 10 Min Äquilibriumieren.

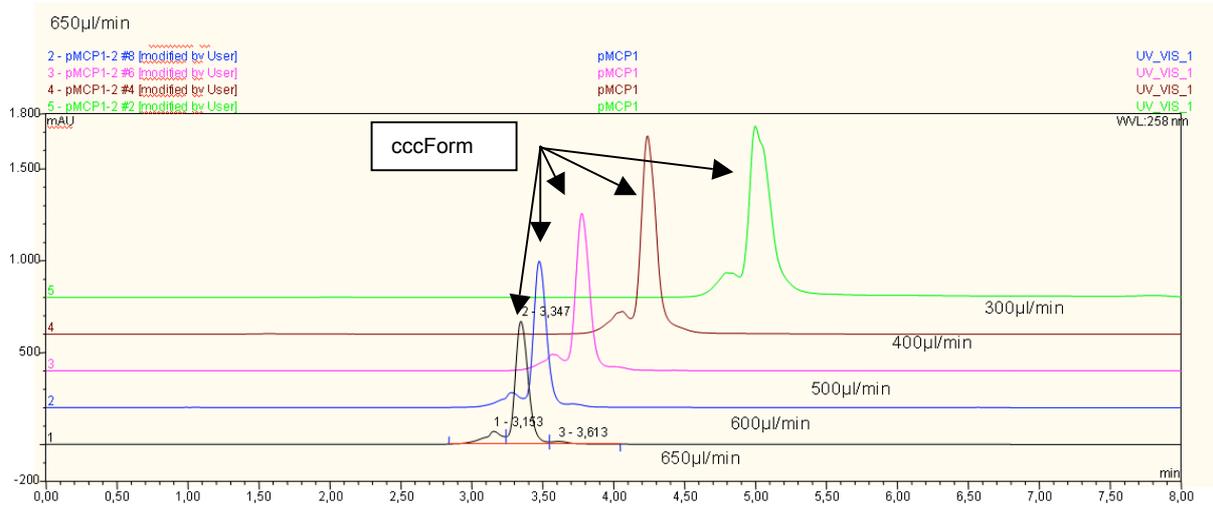


Abbildung 15: Elution der pDNA1 fb bei verschiedenen Flußrate auf der Säule Gen Pak Fax (Lab.Nr. 51) und mit dem Agilent-HPLC 1100

Tabelle 6: Die Ergebnisse der Flußratestudie

Flußrate(µl/min)	cccForm-Retentionszeit(min)	Peakfläche(mAU*min)	Auflösung(oc/ccc-Form)
300	5	185,989	0,9
400	4,24	154,73	0,99
500	3,773	115,725	1,28
600	3,47	101,188	1,34
650	3,347	83,377	1,42

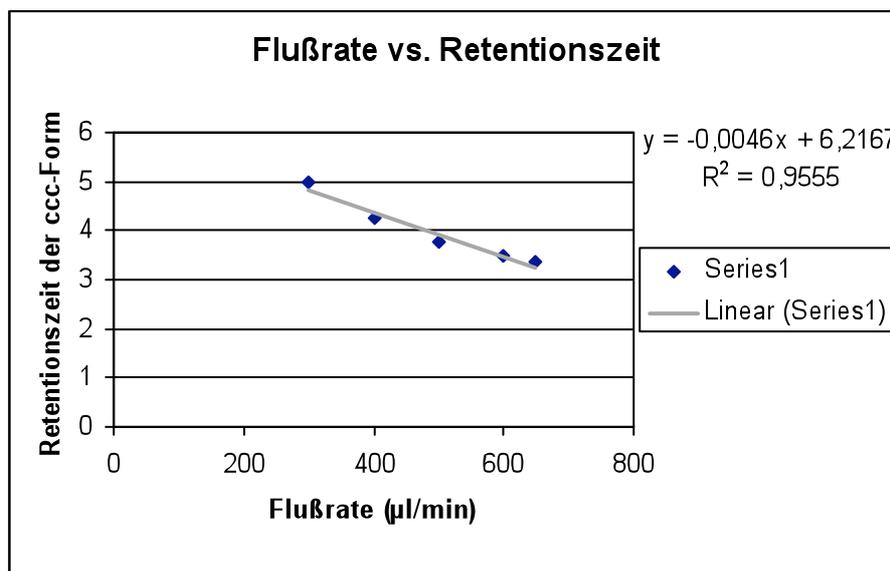


Abbildung 16: Agilent 1100-HPLC, Flußrate-Studie

Die Auflösung (oc/ccc-Form) der Peake bei unterschiedlichen Flußraten weist darauf hin, dass man bei langsameren Flußraten schlechtere Auflösungen hat.

3.1.6 Studie zur Bestimmung einer Konzentration für isokratische Elution

Um eine Temperaturstudie bei isokratischer Bedingung durchzuführen, was durch Van't Hoff Plot die Bestimmung der Enthalpieänderung des chromatographischen Prozesses erlauben würde, braucht man zuerst die isokratische Bedingung zu finden, bei der Plasmidisformen getrennt eluiert werden.

In dieser Experimenten-Serie hat man versucht, eine Salz-Konzentration für die mobile Phase zu finden, die eine isokratische Elution aller Plasmidisformen ermöglicht. Laut Standard-Messungen wird der Analyt ungefähr bei der Minute 5 eluiert und daher müssen wir bei 75% Puffer B isokratisch arbeiten. Bei der isokratischen Elution muss man aber deutlich weniger als 75% B verwenden, da sonst die Verbindung mit t_0 eluiert wird.

Die Methode für die Serie: der Anteil des Puffer B variiert (54%, 54,5%, 55%, 55,5%, 56%, 56,6%, 57%), die Flußrate 500 $\mu\text{l}/\text{min}$, Injektionsvolumen 5 μl , bei 25°C, die Laufzeit 8min., zwischen den Läufen wurde 20 μl NaCl 3 M injiziert und die Säule wurde 10 Minuten gereinigt.

Die Frage ist, ob das HPLC-Gerät die Puffer zu genau mischen kann! Es wäre richtiger, wenn die Unterschiede 5-10% wäre. Es hängt auch von den Puffern ab, wie sie alt sind und welche Konzentration sie zu der Zeit des Versuches haben.

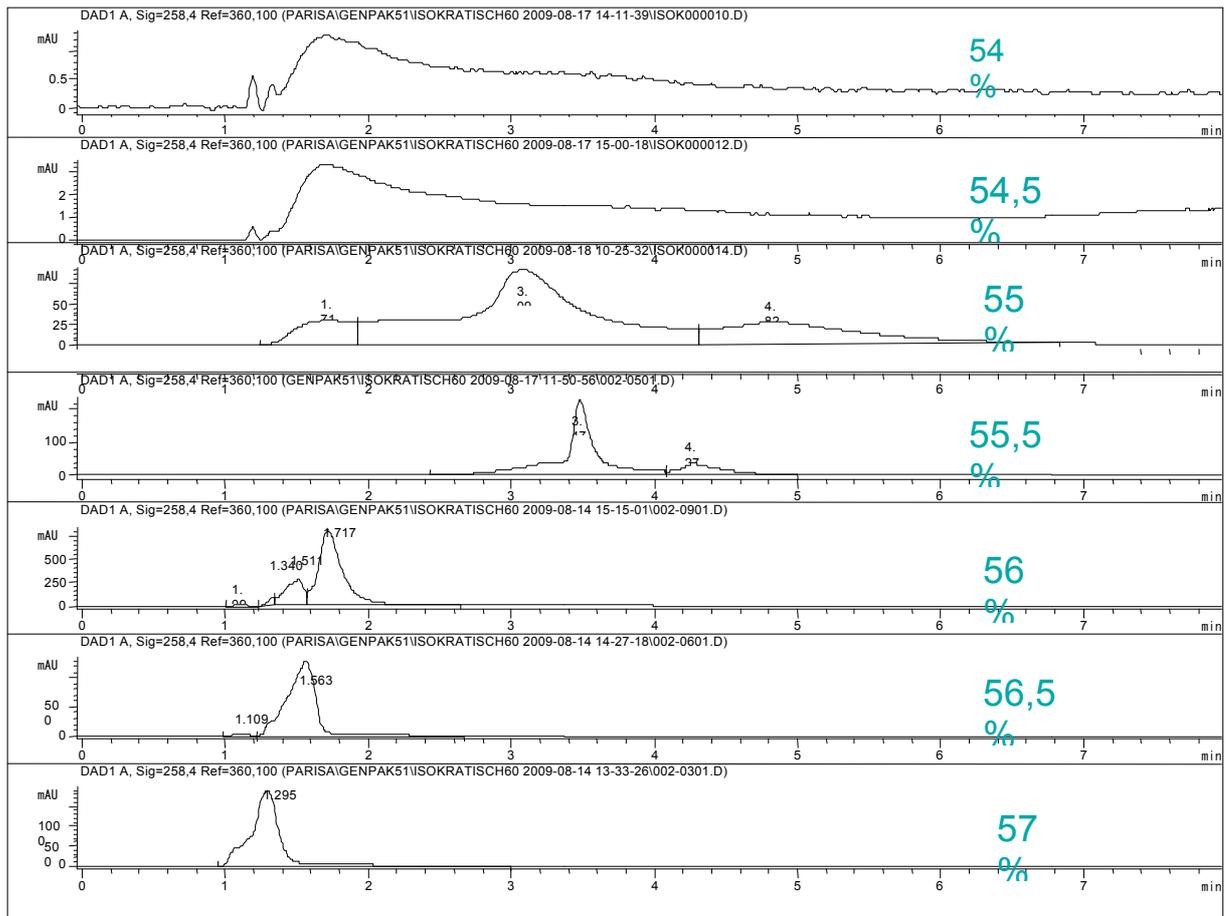


Abbildung 17: Agilent1100-HPLC , Abhängigkeit der Trennung v. final bulk von der Salzkonzentration

Bei 54% und 54,5% Puffer B hat man innerhalb 8 Minuten keine Elution. Bei 55,5% Puffer B wurden die Plasmide bei der Minute 3,47 mit guter Selektivität eluiert.

Aufgrund der schwierigen Wiederholbarkeit des Experiments wegen des sehr engen Bereiches (55-56% B), in dem isokratische Elution möglich ist, wurden keine weiteren Versuche in isokratischem Modus unternommen.

Tabelle 7: Retentionszeit für verschiedene isokratische Konzentrationen

Salzkonzentration M	Retentionszeit (Min)	log k	log 1/C
0,55	3,09	0,197005	0,259637
0,555	3,47	0,276462	0,255707
0,56	1,7	-0,37675	0,251812
0,57	1,56	-0,52288	0,244125
0,6	1,29	-1,12494	0,221849

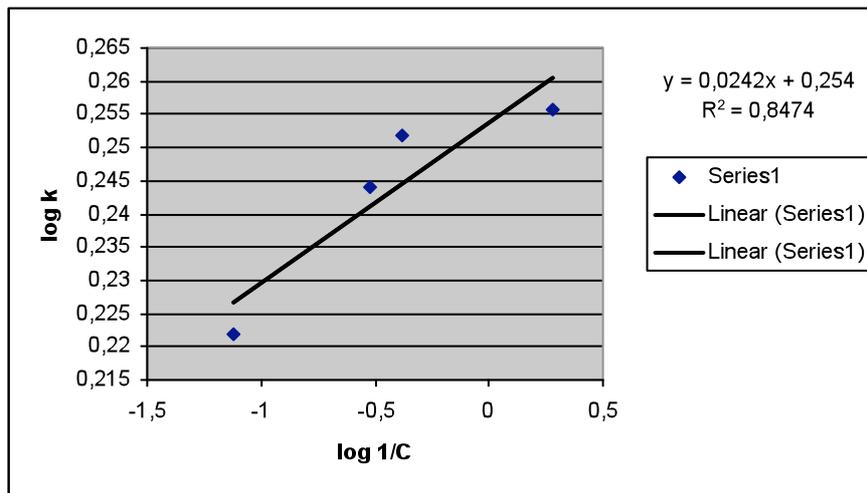


Abbildung 18: log k vs. Log 1/C

$$\text{Log } k = \text{log } a + z \text{ log } 1/C$$

K: Kapazitätsfaktor, a: konstant, z: die Ladung von Analyt, C: Salzkonzentration in der mobilen Phase.

3.1.7 Studie zum Bestimmen eines flachen Elution-Gradienten mit dem Agilent 1100 HPLC

Verschiedene Gradienten werden hier getestet. Der Puffer B 50-60% in 9 Minuten, 53-65% in 9 Minuten, 50-65% in 15 Minuten.

Die Methode: Die mobile Phase bestehend aus Puffer A(Tris,HCl 20mM pH 9) und Puffer B (Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9), der Gradient (variiert) , 3 min Äquilibrieren, Injektionsvolumen 3µl bzw. 15 µl, Flußrate 500µl/min.

Reinigungsgradient: 20µl NaCl 3M wird injiziert, die Puffer (A: Tris,HCl 20mM pH 9, B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9), Gradient 50-100% B in 2 Min, eine Minute 100%, Äquilibrieren 10 Min entsprechend der Start-Salzkonzentration beim nächsten Lauf.

Die Experimente wurden für jede Plasmidisoform und auch zusätzlich für eine Mischprobe von fb und linearer Form gemacht. Für die Vorbereitung der gespikten Probe, werden die Magnesium-Ionen enthaltenen Enzyme (Ligase), die zur Herstellung der lineare Form von ccc-Form benutzt wurden, durch Zugabe der 15 µl EDTA-Lösung 1mM zur 30µl lin-Form deaktiviert, weil EDTA mit den Metalionen Komplexe bildet.

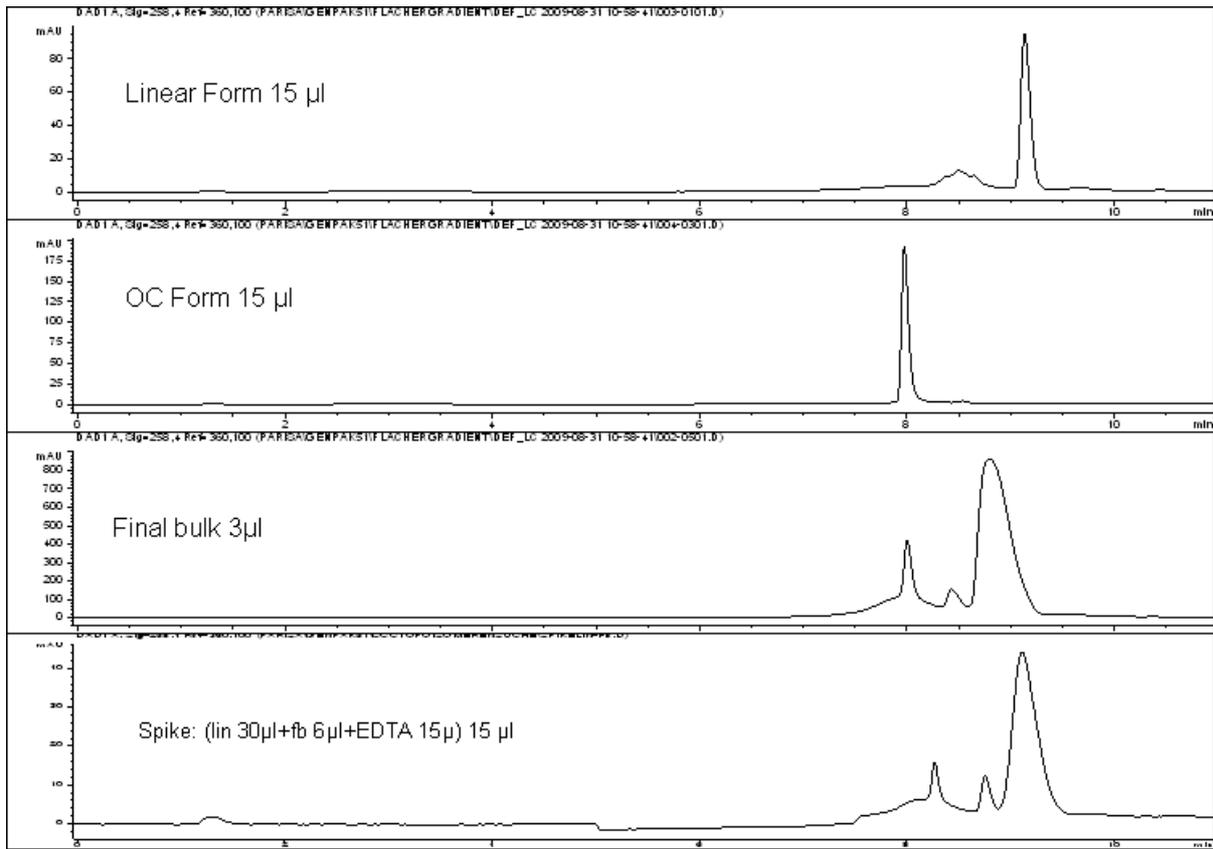


Abbildung 19: Der Gradient 50-60% B in 9 min

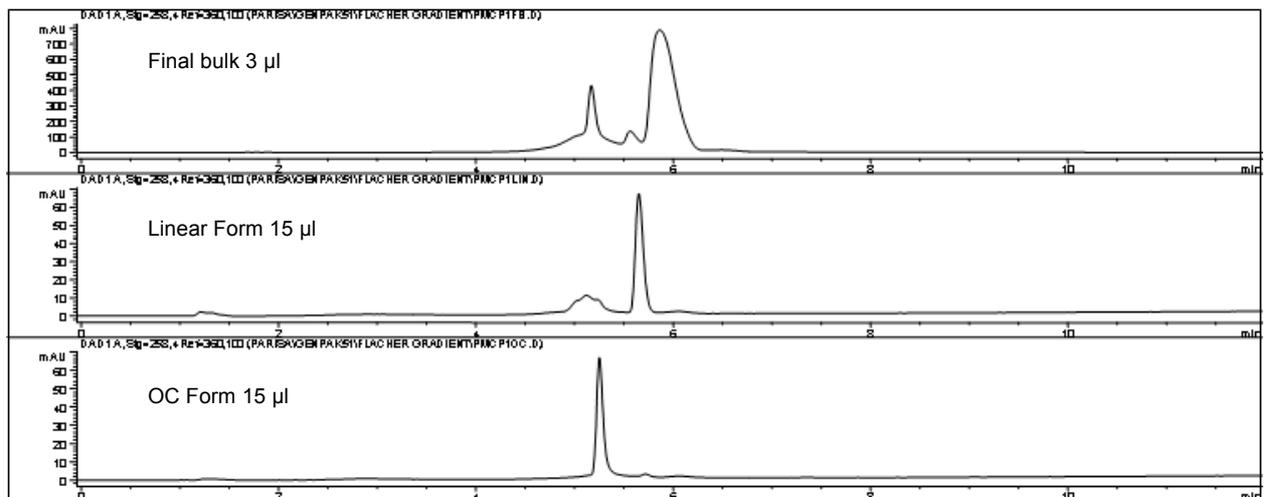


Abbildung 20: Der Gradient 53-65% B in 9min

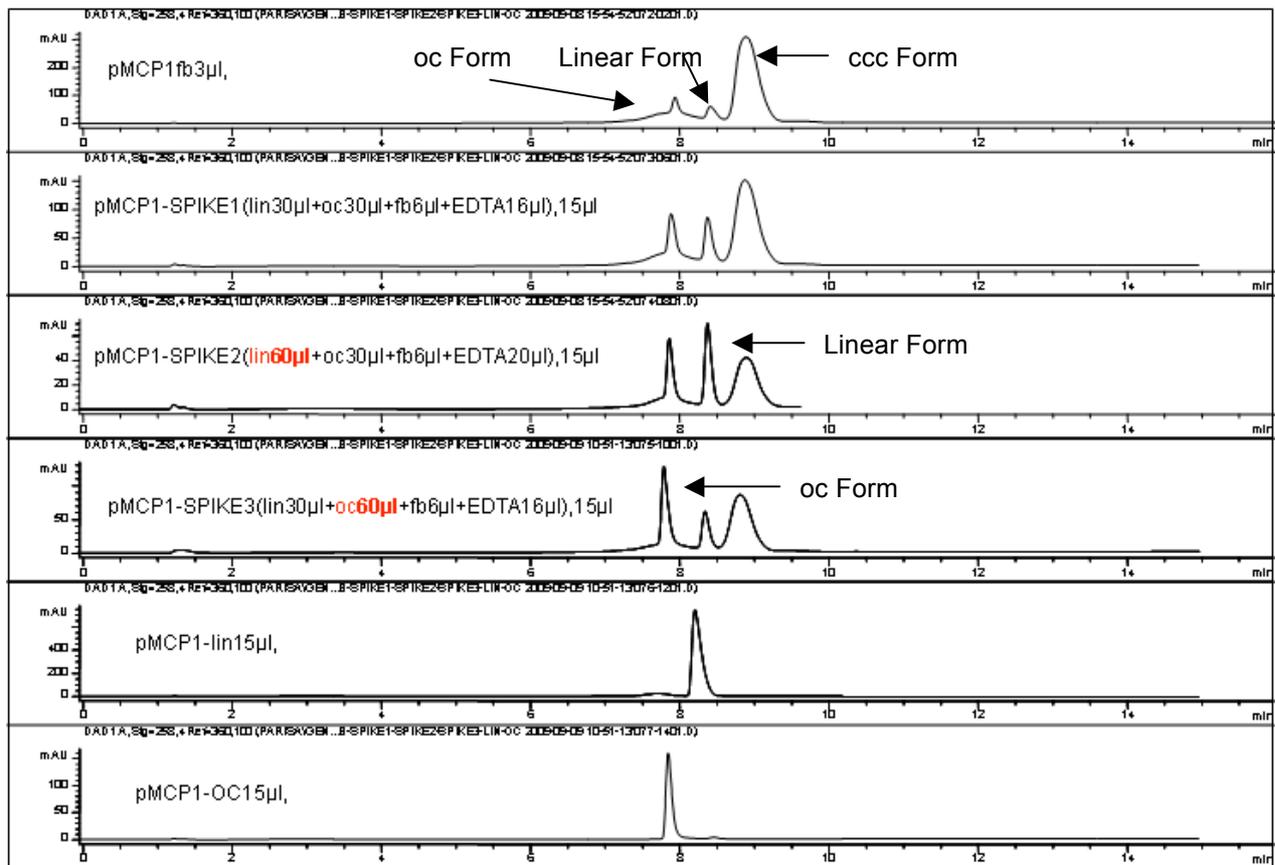


Abbildung 21: Der Gradient 50-65% B in 15 min

Die Ergebnisse in Abb. 19-21 zeigen, dass mit dem geänderten Gradienten eine Verbesserung der Trennung in Vergleich zum Standard-Gradient erreicht werden kann; Es muss jedoch eine längere Laufzeit im Kauf genommen werden. Bei diesem Gradient kann die lineare Form von der ccc-Form getrennt werden, während mit der Standardmethode beide koeluiieren. Durch den Vergleich einer gespikten Probe und einer weiteren gespikten Probe mit doppelter Zugabe der linearen Form kann man die lineare Form eindeutig als zweiter Peak identifizieren. So wird es bewiesen, dass die lineare Form vor der ccc-Form eluiert wurde. Das Gleiche gilt auch für die Identifizierung des oc-Peaks.

Tabelle 8: Ein Vergleich zwischen Gradienten-Elution für pDNA1 final bulk

Gradienten	cccForm-Peak für Injektion von 3 µl pDNA1 final bulk		
	Retentionszeit Min	Peakfläche mAU*s	Auflösung
50-75%Puffer B in 5 Min.	5,20	21131	0,92
50-65%Puffer B in 15 Min.	9,444	1738	1,48
53-65%Puffer B in 9 Min.	5,86	13577	0,8
50-60%Puffer B in 9 Min.	8,795	17827	0,87

Mit Hilfe der Daten der Tabelle 9 wird ein Vergleich zwischen 4 Elutionsgradienten ermöglicht. Die Auflösung bei dem Gradient 50-65% ist besser als bei der Standardmethode bzw. die Selektivität verbessert. Aber die Wiederfindung ist anscheinend bei der Standardmethode effizienter.

3.1.8 Temperaturstudie bei ausgewähltem flachen Gradient

3.1.8.1 Mit Agilent 1100, Gradient 50-65% B , bei 35°C

Die Methode: Die mobile Phase der Puffer A (Tris,HCl 20mM pH 9) und der Puffer B (Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9), der Gradient 50-65% B in 15 min, Injektionsvolumen für fb 3µl und für andere Proben 15 µl, 3 min Äquilibrieren, 600 µl/min, 35°C

Reinigungsgradient: 20µl NaCl 3M wird injiziert, der Puffer (A:Tris,HCl 20mM pH 9/ B:Tris HCl 20mM,NaCl 1M pH 9), der Gradient 50-100% B in 2 Min, 1 min 100%, 10 Minuten Äquilibrieren. Die Temperatur ist immer entsprechend jener des nächsten Laufes eingestellt.

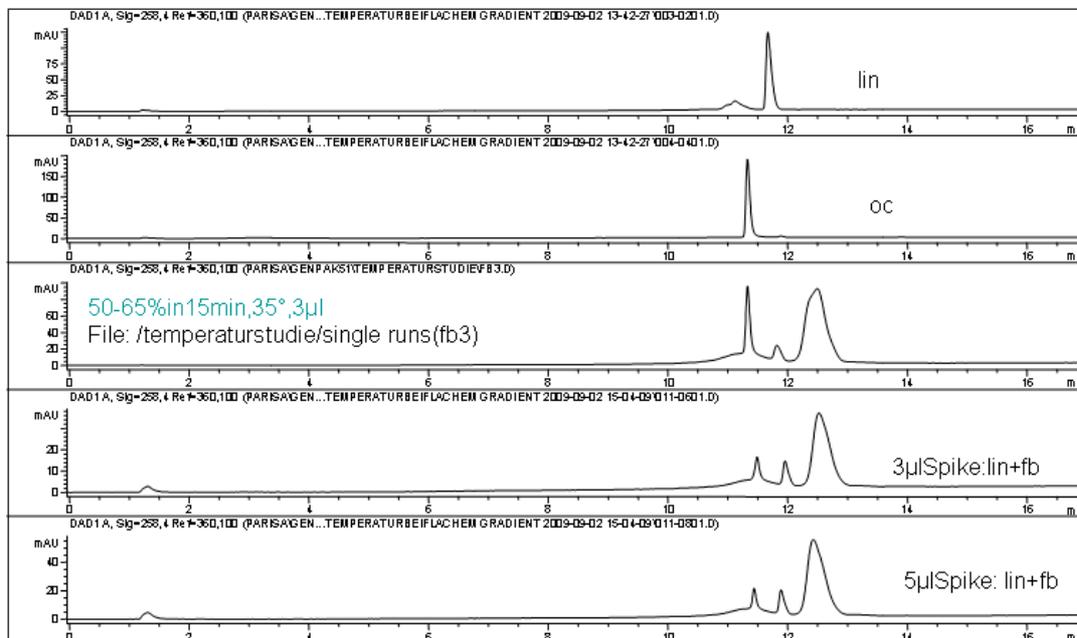


Abbildung 22: Der Gradient 60-65% B in 15 min, bei 35°

Tabelle 9: Chromatogramm-Daten für 50-65% in 15 min, bei 35°C und bei 25°C

Gradienten	cccForm-Peak für Injektion von 3 µl pDNA1 final bulk		
	Retentionszeit Min	Peakfläche mAU*s	Auflösung (ccc-lin)
50-75% B in 15 Min. bei 35°C	12,49	2108	1,07
50-65% B in 15 Min. bei 25°C	9,444	1783	1,84

Wie es in der Tabelle 9 gezeigt wird, ist die Retentionszeit wie erwartet bei der 35° länger. Die Auflösung zeigt aber keine Verbesserung bei höherer Temperatur. Die Wiederfindung ist aber höher für gleiches Injektionsvolumen bei höherer Temperatur.

3.1.8.2 Mit Dionex-HPLC beim Gradient 55-63% B

Die Methode: die Puffer (A: Tris,HCl 20mM pH 9, B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9), Gradient 55-63% B in 5 min, 3 min Äquilibrieren, 600 µl/min

Reinigungsgradient: 20µl NaCl 3M wird injiziert, der Puffer (Tris,HCl 20mM pH 9/ Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9), Gradient 50-100% B in 2 Min, 1 min 100% B, 10 Min Äquilibrieren. Die Temperatur ist immer entsprechend dem nächsten Lauf eingestellt.

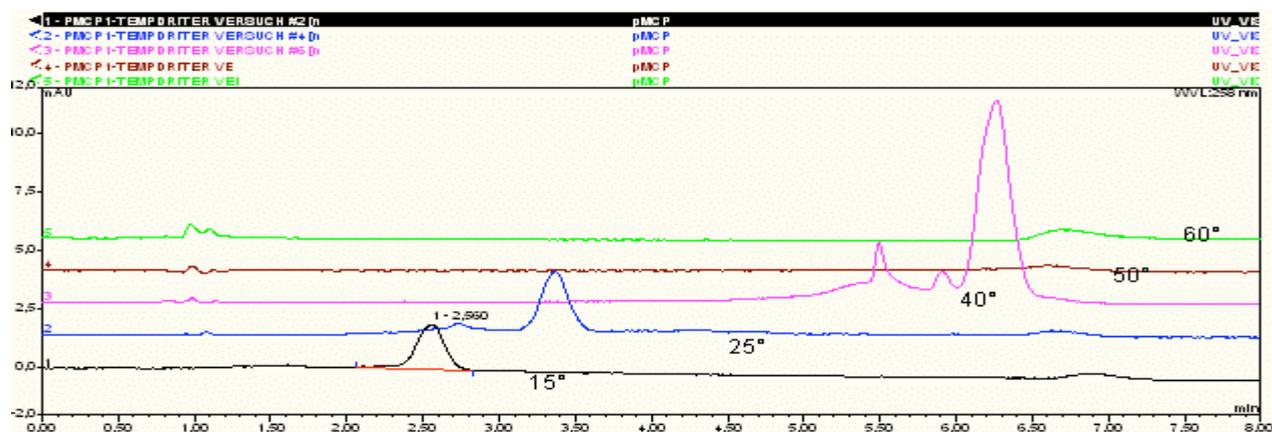


Abbildung 23: Chromatogramme der Temperaturstudie beim Gradient 55-63% B

Tabelle 10: Temperaturstudie bei einem flachen Gradient 55-63% B

Temperatur °C	ccc-Form Retentionszeit (min)
15	2,56
25	3,37
40	6,27

Weil die Elution bei 40° C nicht innerhalb des Gradienten war, hat man mit längerer Gradientzeit die Läufe durchgeführt.

Die Methode: der Puffer (A: Tris,HCl 20mM pH 9, B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9), Gradient 55-63% B in 9 min, 5 min Äquilibrieren, 550 µl/min, Injektionsvolumen 5 µl, 25°C

Reinigungsgradient: 20µl NaCl 3M wird injiziert, die Puffer (A: Tris,HCl 20mM pH 9 und B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9), Gradient 50-100% B in 2 Min, 1 min 100% B, 10 Min Äquilibrieren. Die Temperatur ist immer entsprechend des nächsten Laufes eingesetzt.

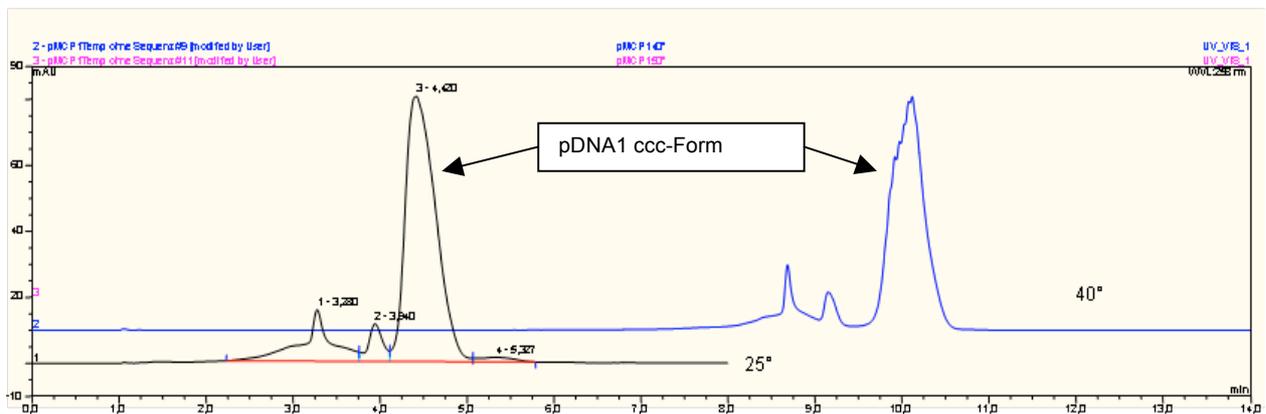


Abbildung 24: Temperaturstudie beim Gradient 55-63% mit der Rampe 9 min

Tabelle 11: Der Gradient 55-63% in 9 Min. bei 2 Temperaturen

Temperatur °C	oc Retentionszeit (min)	lin Retentionszeit (min)	ccc-Form Retentionszeit (min)	Auflösung oc/lin	Auflösung lin/ccc
25	3,2	3,94	4,42	2,49	1,02
40	8,69	9,15	10,12	2,26	1,98

Die Resultate bestätigen, dass der chromatographische Prozess endothermisch ist; wie es von Erhöhung der Retentionszeiten mit der Temperatur abgeleitet werden kann. Bemerkenswert ist, dass bei erhöhter Temperatur die Auflösung zwischen lin- und ccc-Form verbessert ist.

3.1.9 Recovery Bestimmung

Ein großes Problem bei der Analytik von Plasmid-DNAs bereitet die mangelnde Wiederfindung, insbesondere der oc-Form. Je größer die Plasmide sind, umso kritischer wird dieser Aspekt und bei Plasmiden mit 15 kbp findet man z. B. auf Tosoh DNA-NPR gar keine oder kaum eine oc-Form wieder, obwohl dieser vorhanden ist. Aus diesem Grund wird neben der Trennung auch die Wiederfindung definiert.

In dieser Studie wird man bei verschiedenen Konzentrationen, die eluierten Probe-Menge durch Säule mit der eluierten Proben durch Union (ein eingebautes Verbindungsstück statt Säule) vergleichen.

Die Methode: der Puffer A: Tris,HCl 20mM pH 9, der Puffer B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9, Gradient 50-75% B in 5 min, 3 min Äquilibrieren, 500 µl/min, Injektionsvolumen 2µl, Agilent 1100-HPLC

Reinigungsgradient: 20µl NaCl 3M wird injiziert, der Puffer A: Tris,HCl 20mM pH 9, der Puffer B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M pH 9, der Gradient 50-100% B in 2 Min, 1 min 100% B, 10 Min Äquilibrieren.

In diesem Teil wird die Recovery für die Säule Gen Pak Fax (Lab.Nr. 51) bei dem flachen Gradient 50-65% B in 15 min berechnet. Zuerst hat man 3µl pDNA1 (4892 bp) final bulk injiziert, aber weil die Peakflächen höher als 2000 mAU* s waren, hat man 2µl injiziert.

Tabelle 12: Die Peakflächen der Elution von 2 µl pDNA1 final bulk mit Union

Läufe mit Union	Peakfläche	Mittelwert
1	7286	7292
2	7254	
3	7336	

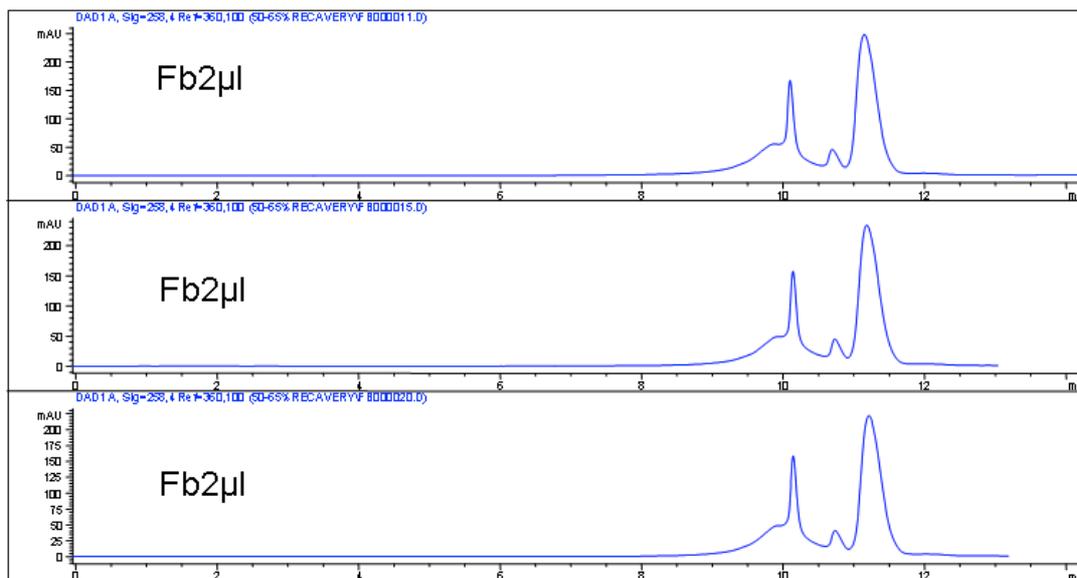


Abbildung 25: Der Gradient 50-65% B in 15 min

Tabelle 13: Die Peakflächen von Elution der 2µl pDNA1 final bulk mit der Gradient 50-65% in 15 min

Läufe mit Säule	Peakfläche	Mittelwert
1	8655	8096
2	7927	
3	7707	
Recovery 111%		

Wie man in den Ergebnissen sieht, ist die Recovery gleich 111%. Die Wiederfindung zeigt, dass restliche Proben durch viele Messungen an der stationären Phase in der verbrauchten Säule gebunden sind.

3.1.10 Additive

Es ist bekannt, dass Polykationen zu einer Kompaktierung von pDNA führen können. Zum Prüfen, ob die positiv geladenen Aminen zu einer Retentionszeitverschiebung und so zu einer Änderung der effektiven Selektivität führen können oder nicht, werden eine Reihe Experimente mit der Standardmethode, aber durch Verwenden von Polykationen als Additive in Puffer A und Puffer B durchgeführt. Für die Versuche werden folgende Amine ausgewählt.

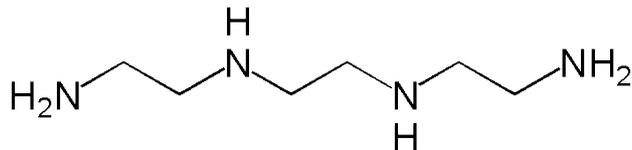


Abbildung 26: Triethylentetramin

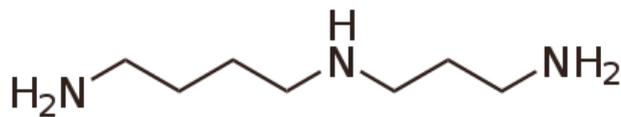


Abbildung 27: Spermidin

Triethylentetramin hat vier Amino-Gruppen. Spermidin hat drei Aminogruppen und eine kürzere Länge. Die Polyamine sind bekannt für ihren Effekt in Neutralisierung der Phosphodiester-Ladung an der DNA-Backbone [10], was zu einer früheren Elution in AEX-Chromatographie führen sollte.

3.1.10.1 Triethylentetramin im Puffer

Die Methode hier ist die BI-Standardmethode mit Puffern A und B, die bereits erwähnt wurden. Der einzige Unterschied Standardmethode ist die Zugabe der Amine in die beiden Puffer.

Die Puffer A und B werden mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt: 0,1 mM, 0,2mM, 0,5mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1mM, 2mM. Dieser Bereich von Retentionszeit-Änderung für Plasmide wurde in Vorversuchen gefunden und aus diesem Grund in kleinen Konzentrationsänderungen experimentiert.

Die Methode: der Puffer A (Tris,HCl 20mM/Amine pH 9) und der Puffer B (Tris HCl 20mM/NaCl 1M/Amine pH 9), Gradient 50-75% B in 5 min, 3 min Äquilibrieren, 500 µl/min, 25°C. Die Probe pDNA1 (4892 bp) final bulk wird immer 3µl injiziert. Die

Proben linear- und oc-Form und die gespikten Proben werden immer je 15 µl injiziert.

Reinigungsgradient: 20µl NaCl 3M wird injiziert, der Puffer A:Tris-HCl 20mM/Amin pH 9 und der Puffer B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M/Amin pH 9, Gradient 50-100% B in 2 Min, 1 min 100%, 10 Min Äquilbrieren.

Die folgenden acht Chromatogrammen unterscheiden sich in Triethyltetramine-Konzentration in den Puffern. Die Amine-Konzentration ist für jede Abbildung geschrieben.

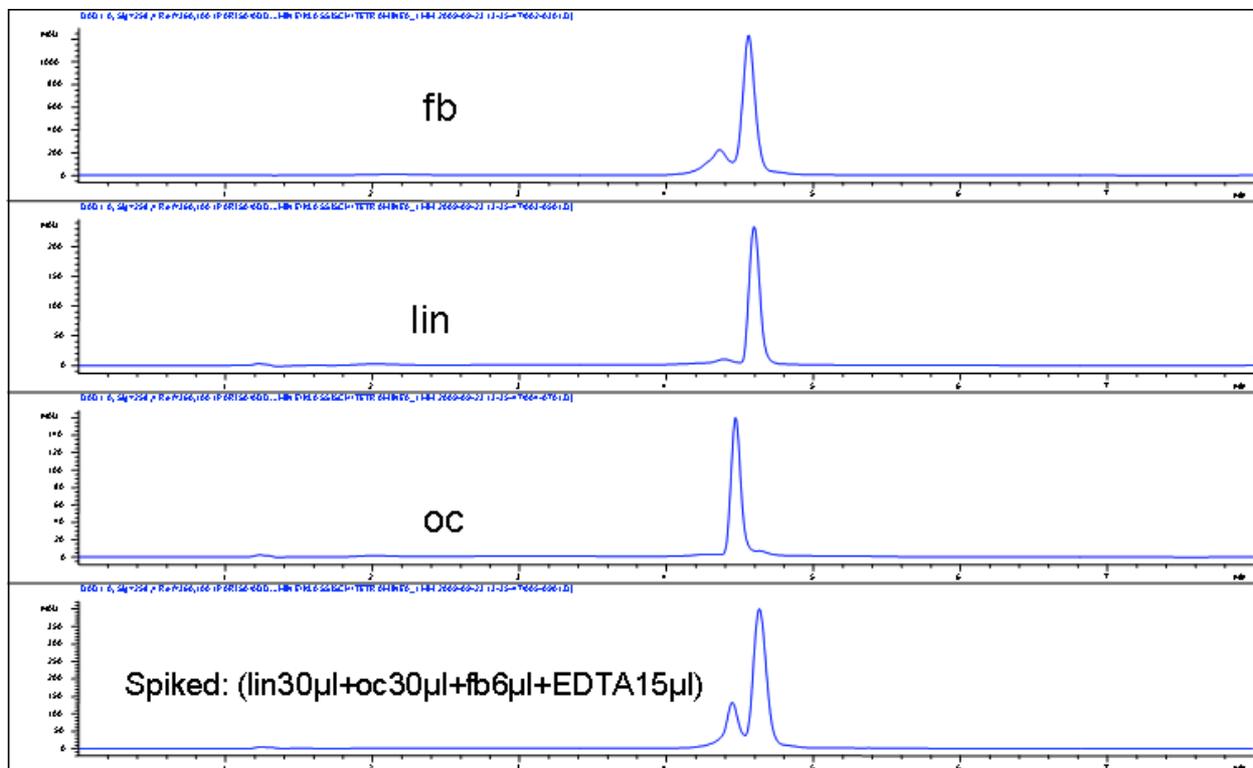


Abbildung 28: Tetramin 0,1 mM , klassische Methode , 500 µl/min

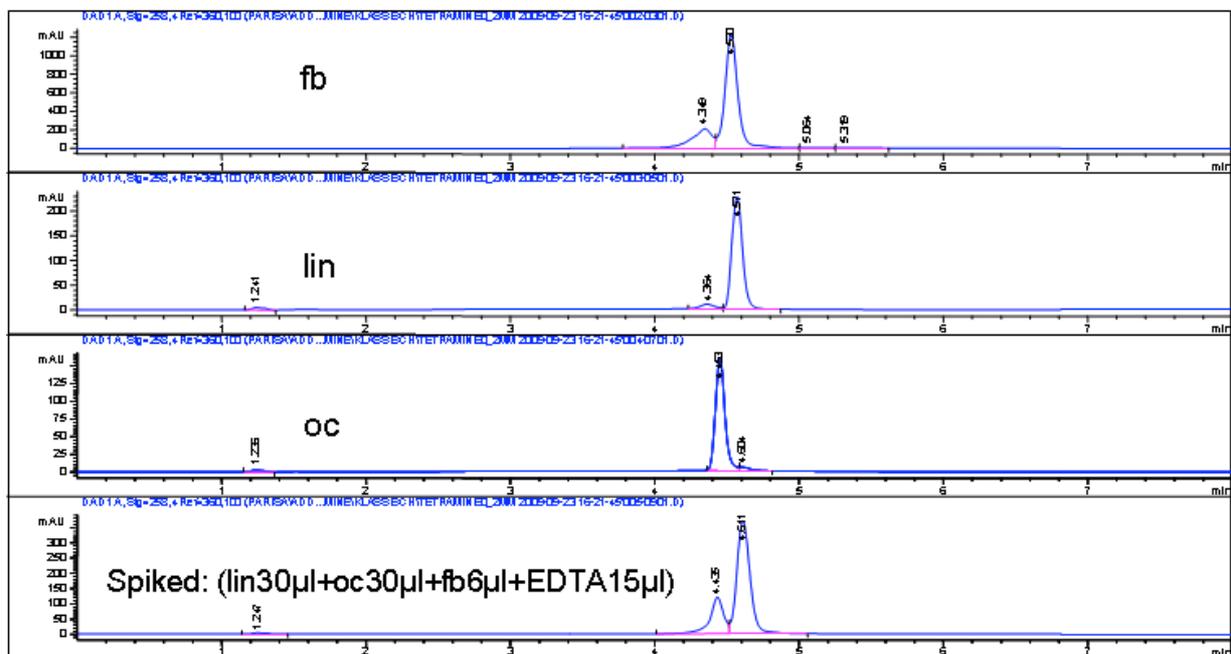


Abbildung 29: Tetramin 0,2 mM, klassische Methode, 500 μ l/min

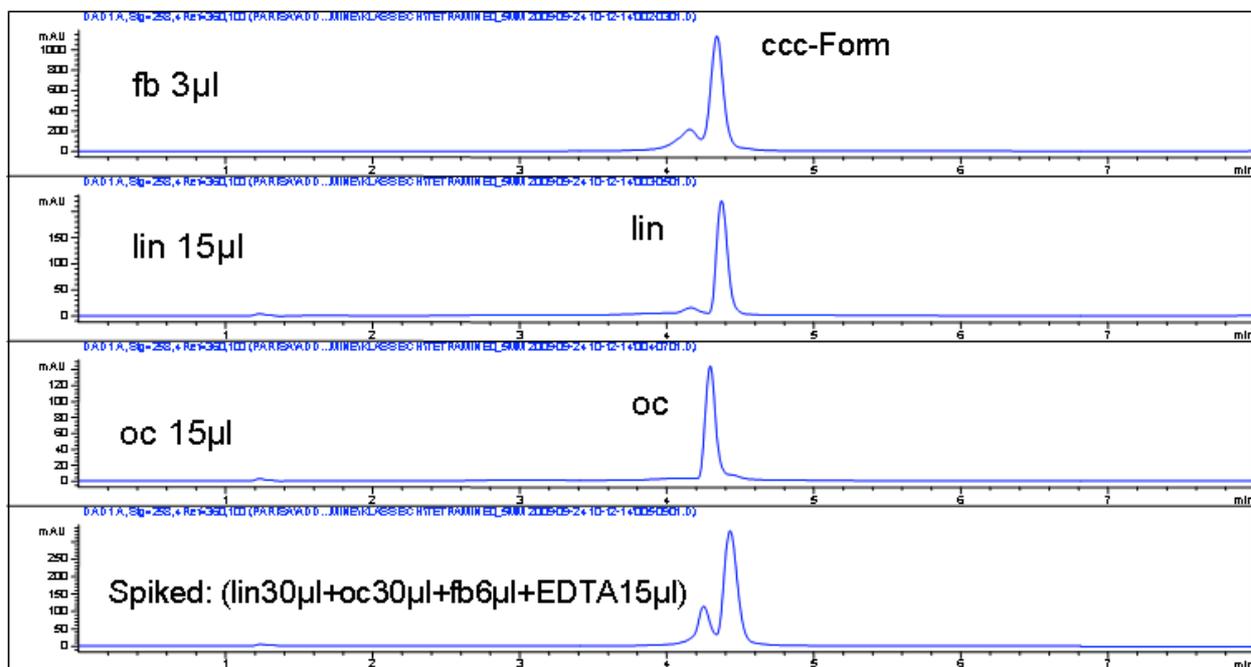


Abbildung 30: Tetramin 0,5 mM, klassische Methode, 500 μ l/min

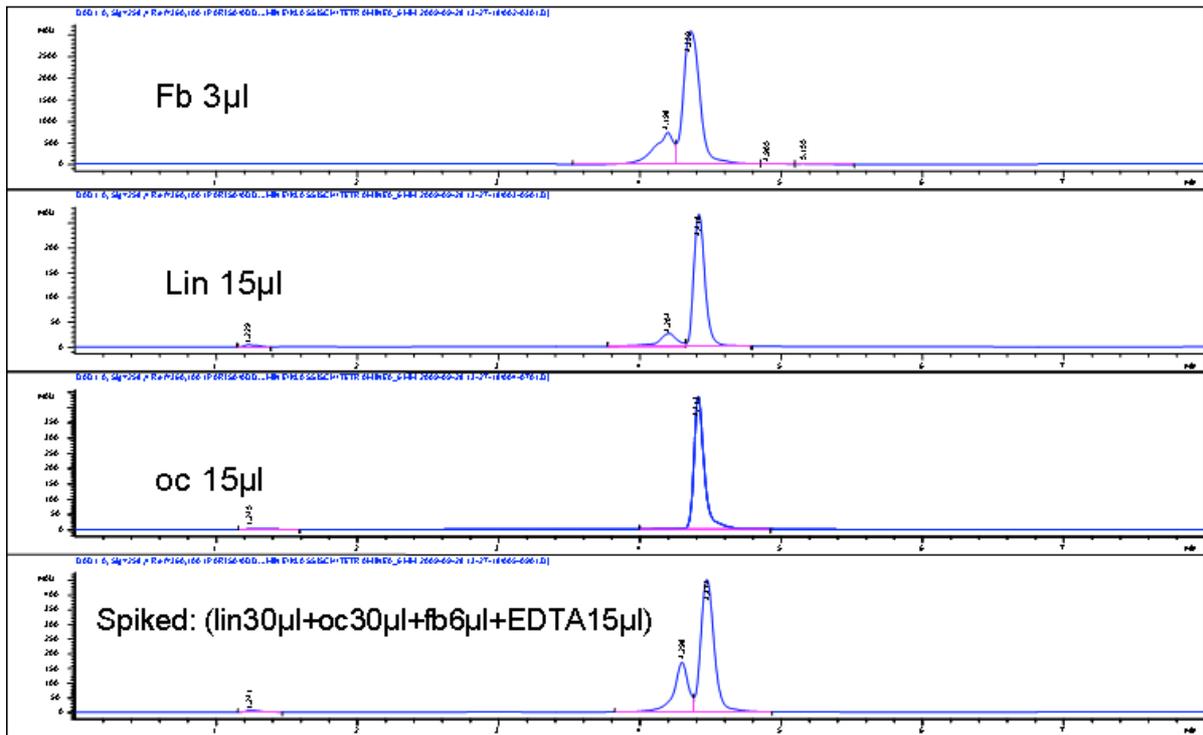


Abbildung 31: Tetramin 0,6 mM, klassische Methode, 500µl/min

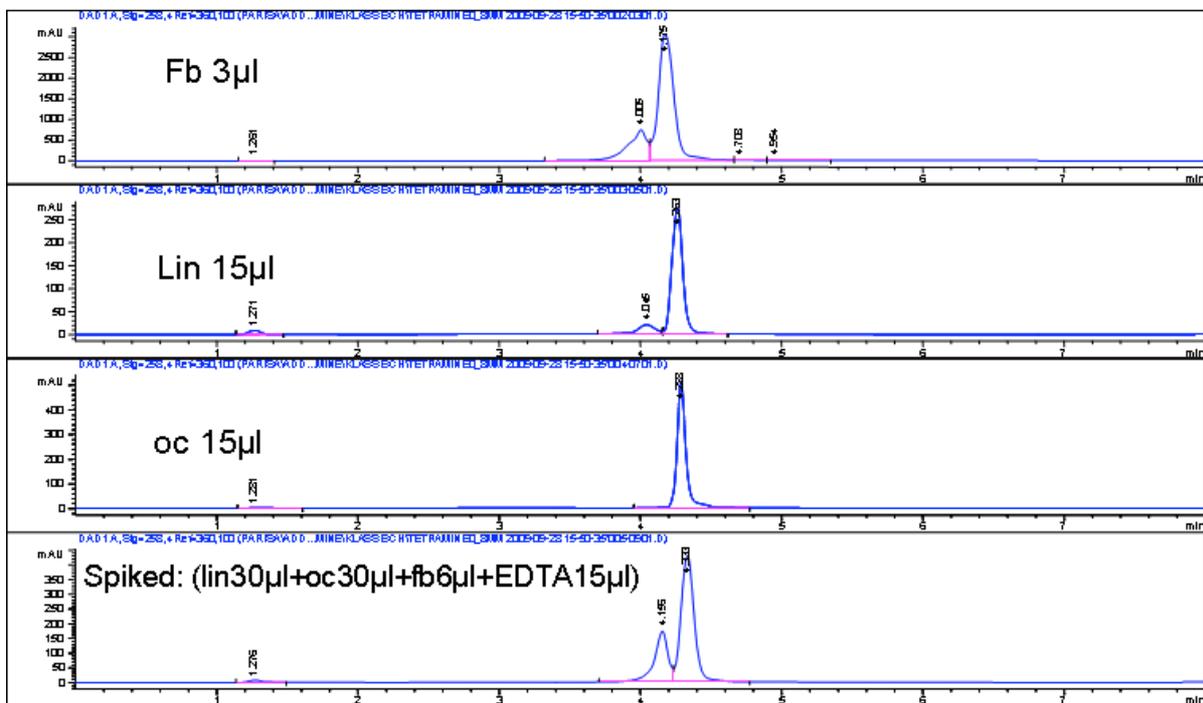


Abbildung 32: Tetramin 0,8 mM, klassische Methode, 500µl/min

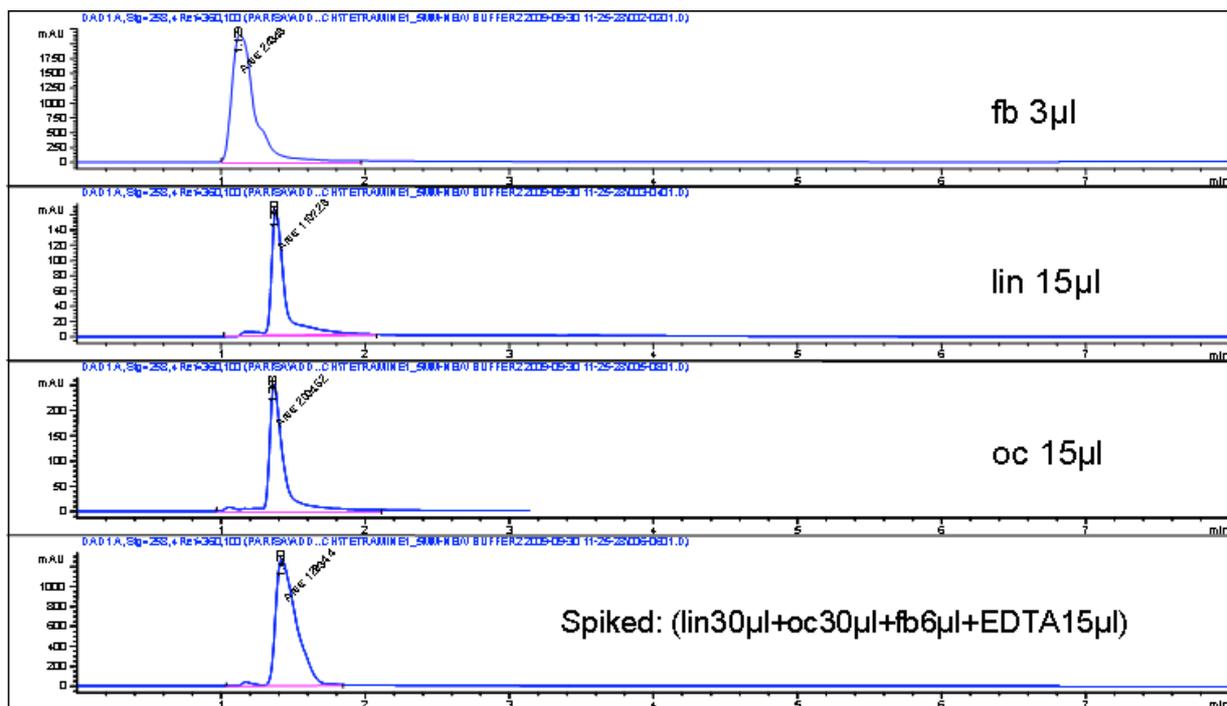


Abbildung 33: Tetramin 1,5 mM, klassische Methode, 500 µl/min

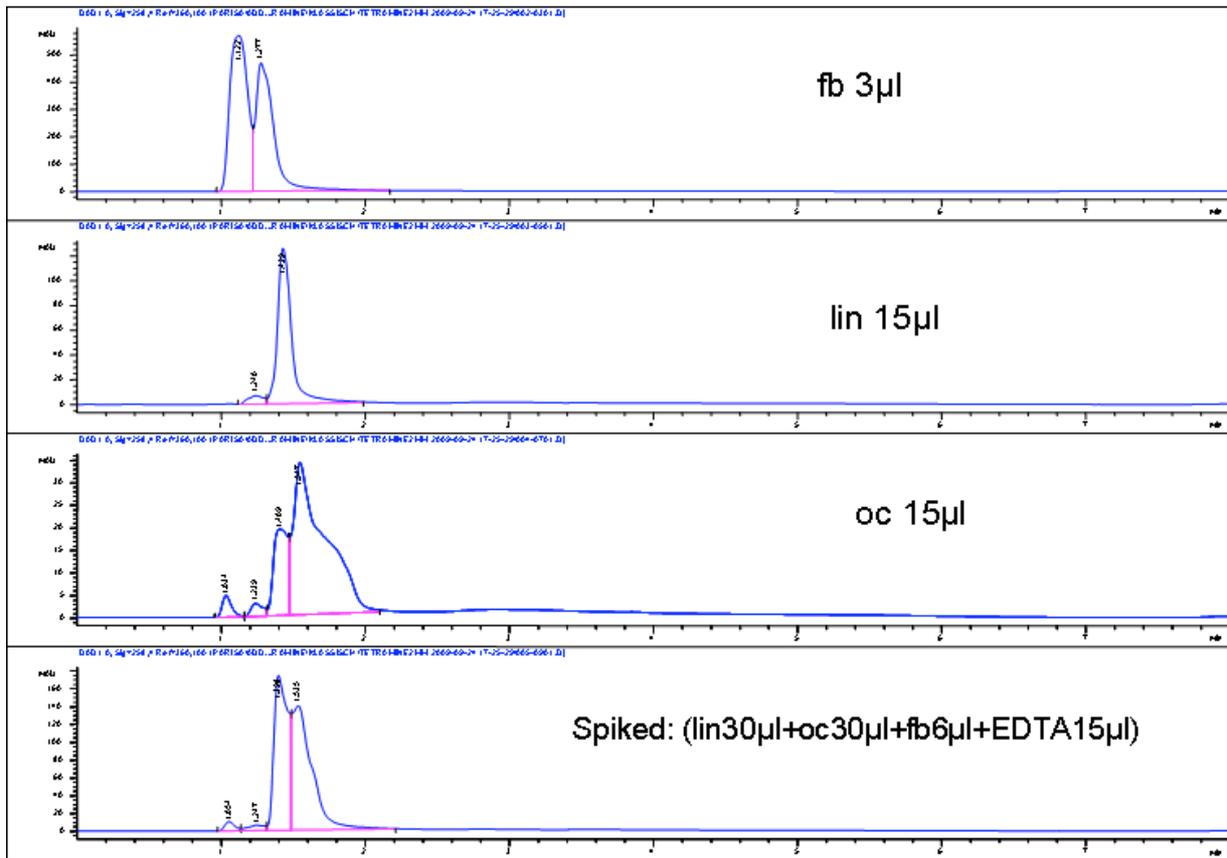


Abbildung 34: Tetramin 2mM, klassische Methode, 500 µl/min

Tabelle 14: Änderung der Retentionszeit von drei Isoformen durch Triethylenetetramin-Zugabe in Puffer

Amine Konzentration mM	t_R (min)		
	pDNA1fb	pDNA1 linear	pDNA1 oc
0,1	4,56	4,597	4,471
0,2	4,53	4,571	4,453
0,5	4,341	4,373	4,295
0,6	4,359	4,418	4,413
0,8	4,175	4,263	4,288
1	2,019	3,833	3,918
1,5	1,129	1,39	1,38
2	1,122	1,429	1,547

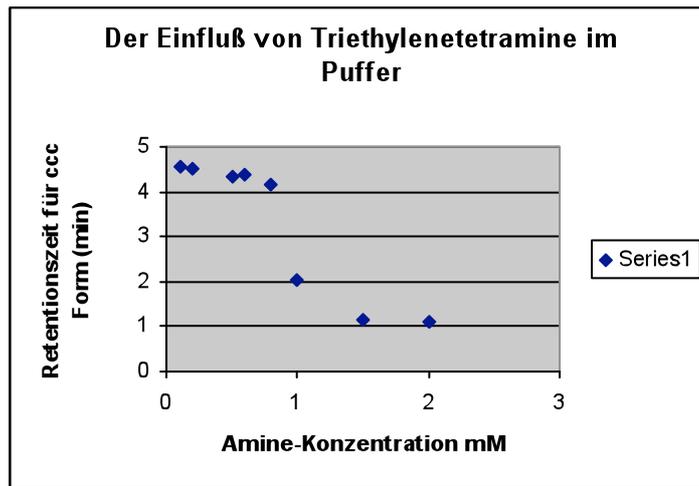


Abbildung 35: Der Triethylenamin-Einfluss auf die Elution von ccc-Form

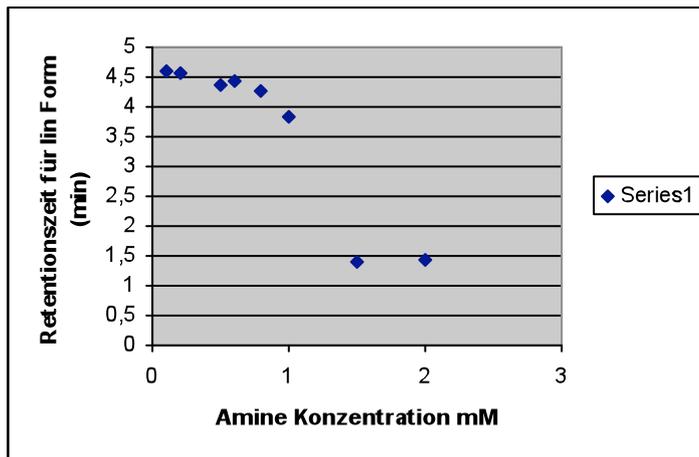


Abbildung 36: Der Triethylenamin-Einfluss auf die Elution der lin-Form

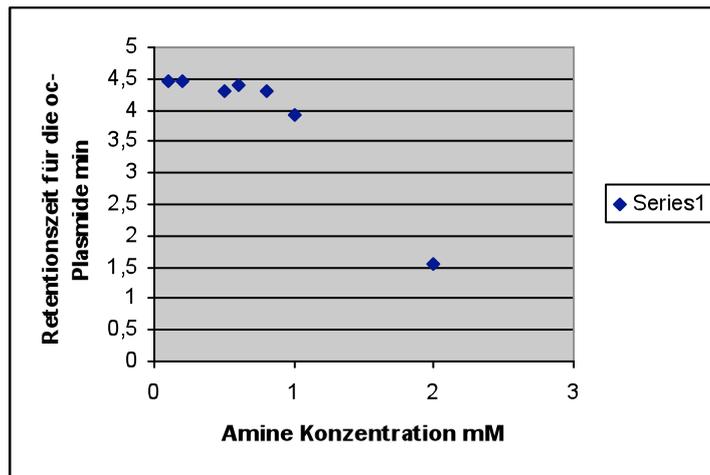


Abbildung 37: Der Triethylenamin-Einfluss auf die Elution der oc-Form

Nach allen Ergebnissen sieht man keine bessere Selektivität für Plasmidisofomen im Vergleich zur Standardmethode. Der einzige Effekt durch Triethylenetetramin ab der Konzentration 1mM merkbar ist, dass es durch Anstieg der Amin-Konzentration ab der Konzentration 1mM zur Elution der Plasmide bei t_0 kommt.

3.1.10.2 Spermidin im Puffer

Die Experimente mit Spermidin erfolgen genauso wie mit Triethylenetetramin nur mit dem Unterschied, dass der Amine-Konzentrationsbereich hier viel niedriger ist. Bei drei Spermidin-Konzentrationen (0,01 mM, 0,025 mM, 0,5 mM) werden die pDNA1 (4892 bp)-Proben mit der klassischen Standard-Methode chromatographiert.

Die Methode: der Puffer A: Tris, HCl 20mM/Additiv pH 9 und der Puffer B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M/Additiv pH 9, Gradient 50-75% B in 5 min, 3 min Äquilibrieren, 500 μ l/min, 25°C. Die Probe pDNA1 (4892 bp) final bulk wird immer 3 μ l injiziert. Von der Proben linear- und oc-Form und den gespikten Proben werden immer je 15 μ l injiziert.

Reinigungsgradient: 20 μ l NaCl 3M wird injiziert, der Puffer A: Tris, HCl 20mM/Amin pH 9 und der Puffer B: Tris HCl 20mM/NaCl 1M/Amin pH 9), Gradient 50-100% B in 2 Min, 1 min 100% B, 10 Min Äquilibrieren.

Drei Chromatographie-Reihen sind bei 3 Spermidin-Konzentrationen unten gezeigt.

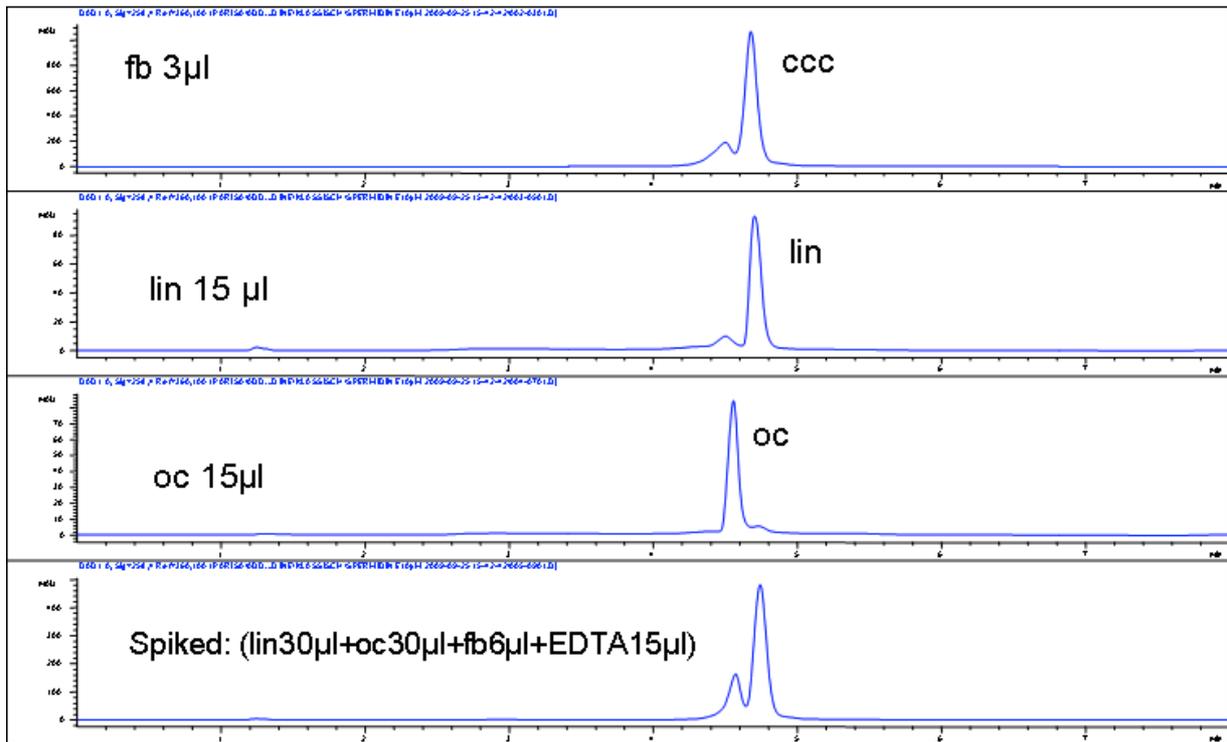


Abbildung 38: Spermidin 0,01 mM, klassische Methode, 500 µl/min

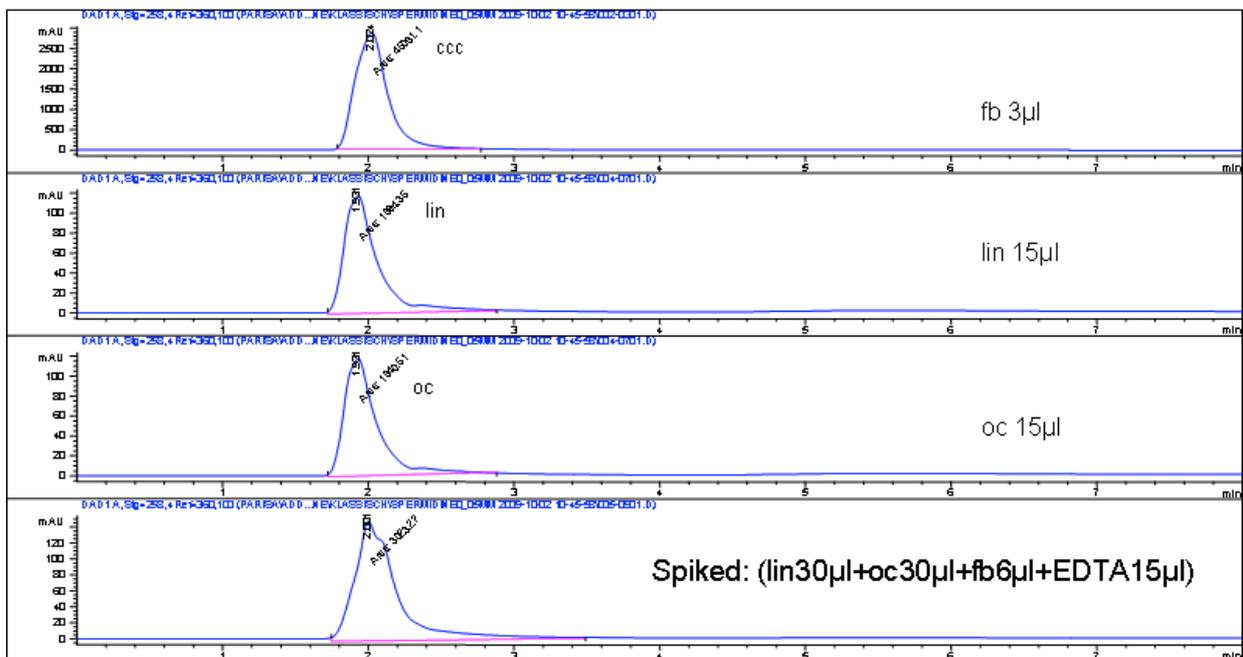


Abbildung 39: Spermidin 0,025 mM, klassische Methode, 500 µl/min

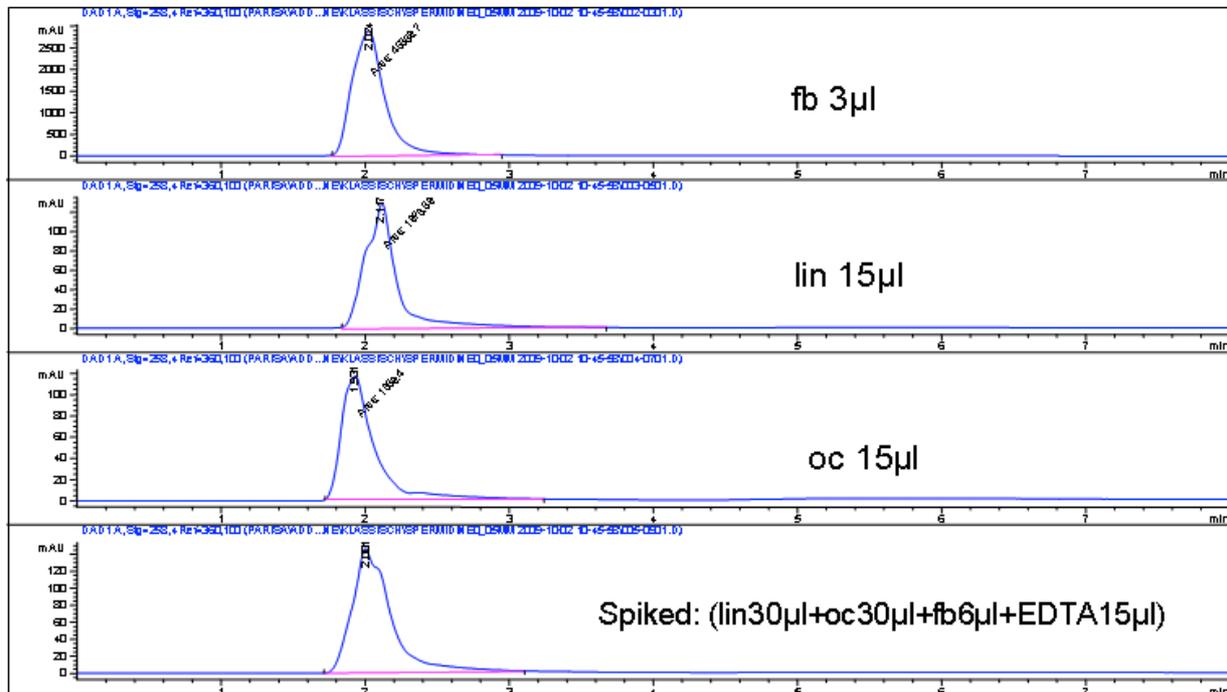


Abbildung 40: Spermidin 0,5 mM, klassische Methode, 500 µl/min

Tabelle 15: Der Spermidin-Einfluss auf Elution der Plasmidisformen

Amin Konzentration mM	t_R (min)		
	pDNA1ccc-Form	pDNA1 linear	pDNA1 oc
0,01	4,677	4,703	4,556
0,025	2,024	1,961	1,931
0,05	2,024	2,117	1,931

Spermidin zeigt auch den selben Effekt, der zur früheren Elution der Plasmide führt. Allerdings ist die Amin-Konzentration, die zur Plasmid-Elution führt, viel niedriger als bei Triethylentetramin, obwohl Spermidin nur drei Amino-Gruppen hat, kann stärker bzw. bei niedrigerer Konzentration durch Binden an Plasmide deren Wechselwirkung mit der positiv geladenen DEAE schwächen. Vermutlich spielt auch der Abstand zwischen dem Aminogruppen eine Rolle. Es wurde aber keine Verbesserung für die Selektivität zwischen Plasmidisformen anerkannt. Die Zugabe von Additiven ist daher wenig erfolgreich.

3.2 Ionenausschluss („Ion Exclusion“) Chromatographie (IEC)

Für negativ geladene Moleküle, insbesondere Biomoleküle, stellt die Anionenaustauschchromatographie, die auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht und beide Analyt und stationäre Phase gegensätzlich geladen sind, eine Standardmethode dar. Es ist aber auch bekannt, dass z.B. kleine organische Säuren auf Basis von repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen getrennt werden können. So können eine Reihe von organischen Säuren mit unterschiedlichem Dissoziationsgrad aufgrund unterschiedlicher Säurestärke auf Basis von unterschiedlich stark ausgeprägten repulsiven Wechselwirkungen getrennt werden. Dabei werden stationäre Phasen mit gleicher Ladung wie die Analyte verwendet. Analyte mit hoher Ladungsdichte geben die stärksten repulsiven Wechselwirkungen und werden partiell aus den Poren ausgeschlossen. Daher der Name Ionenausschluss („Ion-Exclusion“)-Chromatographie. Die Analyte mit der höchsten gleichgesinnten Ladungsdichte eluieren daher zuerst, während solche mit geringerer Ladungsdichte weniger abgestoßen werden und daher weiter in die Poren eindringen können, also ein größeres zugängliches Porenvolumen aufweisen und daher später eluieren.

Ziel dieses Teils der Diplomarbeit war es zu evaluieren, ob Ionenausschlusschromatographie ein geeignetes Verfahren zur Trennung von Plasmid-Isoformen, welche sich ja deutlich in den Ladungsdichten unterscheiden, sein könnte. Aufgrund repulsiver anstatt anziehender elektrostatischer Wechselwirkungen sollte auch eine verbesserte Wiederfindung resultieren.

Für diese Studie zur Plasmid-Trennung mittels Ionenausschlusschromatographie benötigt man also negativ geladene Gruppen auf einer stationären Phase. Dafür wurde Kieselgel mit Sulfongruppen ausgewählt. Andererseits muss die stationäre Phase porös sein. Die Porenweite muss so gewählt werden, dass die Mesoporen in den Partikeln zu der Größe der Plasmide passen und diese daher für die Plasmide grundsätzlich zugänglich sind, also nicht für alle Formen bzw. Zielanalyte ein Größenausschluss erfolgt. Ein Kieselgel-Produkt mit Partikeldurchmesser von 3 µm mit Porengröße von 3100 Angstrom (Kromasil 3100 – 3 µm; ein Labormuster) wurde von Eka erhalten. 3 g davon wurde zuerst mit 3-Mercaptopropylgruppen modifiziert. Danach wurde das Mercaptopropylkieselgel zu 3-Sulfopropylkieselgel oxidiert.

3.2.1 Die Evaluierung der gepackten Kieselgel-Säule

Zuerst, wurde eine Säule mit 3 µm unmodifiziertem Kieselgel mit einer Porenweite von ca. 3100 Å (von Eka Chemicals, Bohus, Schweden) gepackt und eine klassische Säulen-Testung durchgeführt, um die Qualität der Säulenpackung zu eruieren.

Für diese Versuche wurde mit einem HPLC Agilent 1100 gearbeitet. Die gepackte Säule (4x100 mm) wurde durch Injizieren von Anilin, Nitrobenzol, Phenol und Toluol evaluiert. Als t₀-Marker hat man tri-tertButylbenzol benutzt. Die mobile Phase war n-Hexane und alle Proben wurden in n-Hexane gelöst. Es wurde bei 500 µl/min gearbeitet und mit der Wellenlänge 210 nm detektiert.

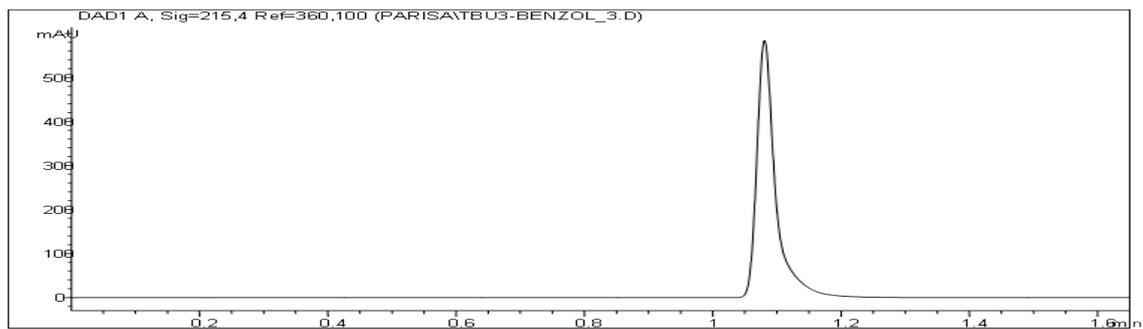


Abbildung 41: t-Butyl Benzol (t0 Marker)

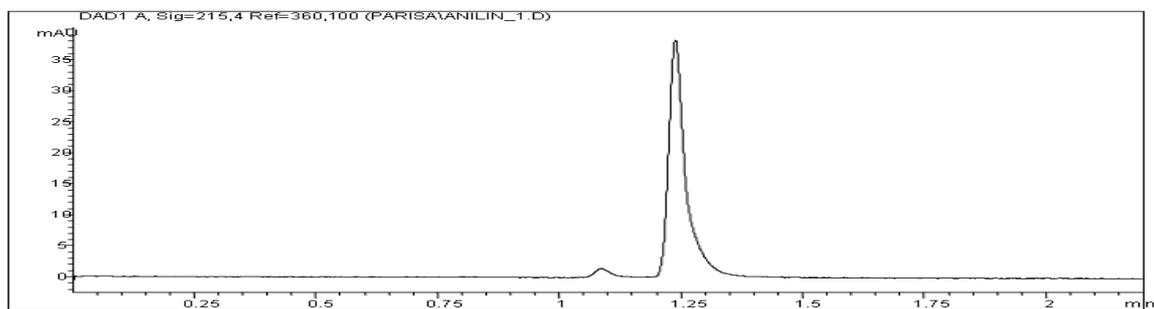


Abbildung 42: Anilin

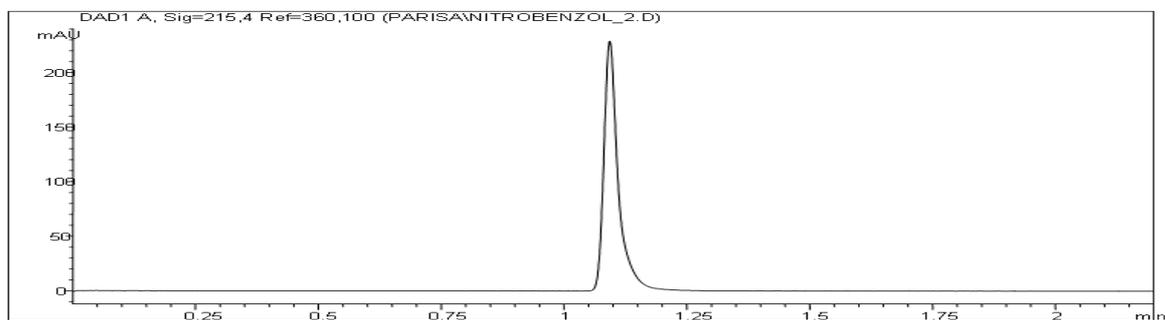


Abbildung 43: Nitrobenzol

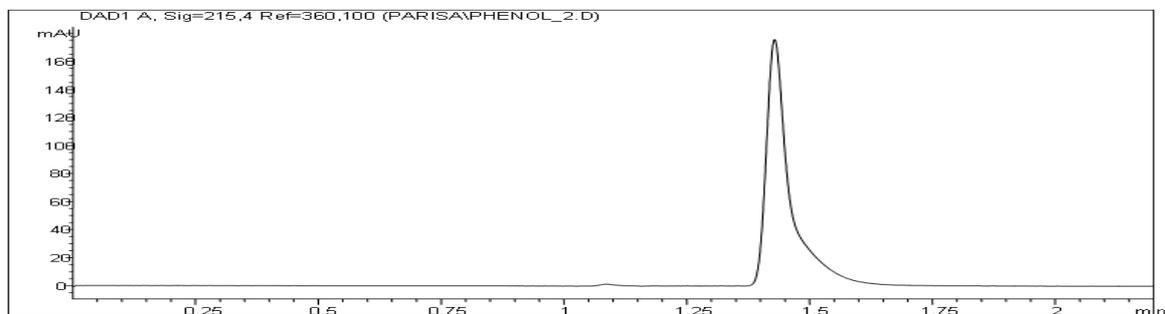


Abbildung 44: Phenol

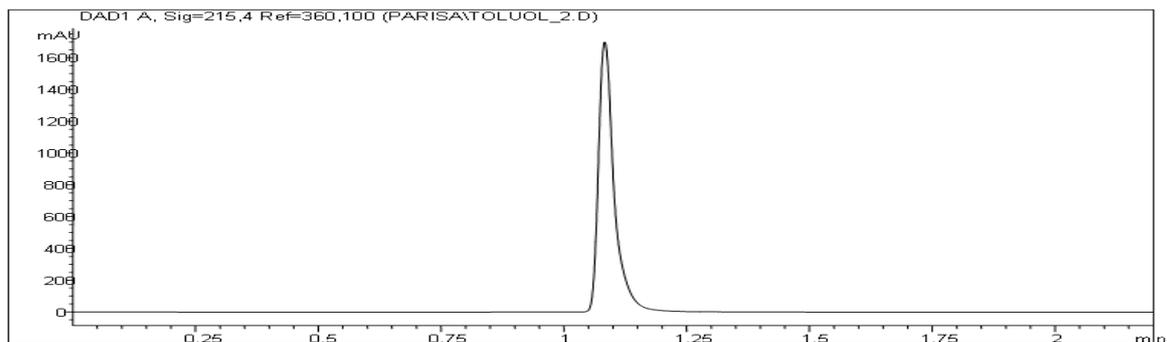


Abbildung 45: Toluol

Tabelle 16: Die Chromatographie-Ergebnisse und die berechnete relative Bodenhöhe h_{red}

Testsubstanz	Retentionszeit	Symmetrie	Peak Width	Bodenzahl	Bodenhöhe	h_{red}	k'
Anilin	1,24 min	0,57	0,036 min	6573	15,2 μm	5,07	4,4
Nitrobenzol	1,09 min	0,62	0,031 min	6849	14,6 μm	4,87	0,32
Phenol	1,43 min	0,47	0,049 min	4718	21,2 μm	7,06	7,14
Toluol	1,08 min	0,6	0,034 min	5590	17,9 μm	5,96	0
tri-tertButylbenzol	1,08 min	0,763	0,0502min	2564	39 μm	13	0

Die Ergebnisse für den Säulentest sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Totzeit der Säule ist 1,08 min und sowohl Toluol als auch Nitrobenzol eluieren mit der Totzeit. Anilin und Phenol werden retardiert. Es wurden Bodenzahlen zwischen 4500 und 7000 theoretischen Böden erzielt, was theoretischen Bodenhöhen zwischen 15 und 21 μm entspricht. Die reduzierten Bodenhöhen bewegen sich zwischen 4,9 und 7,1. Bei einer ideal gepackten Säule kann man im Idealfall reduzierte Bodenhöhen von ca. 2 erreichen. Grundsätzlich kann man aus den Ergebnissen aber schließen, dass die Säulenpackung den Anforderungen entspricht.

3.2.2 Herstellung einer Trimethylsilyl-Endcapped 3-Mercaptopropyl-modifizierten Silika Phase

2g Silikagel wurden in Toluol suspendiert. Für eine Stunde wurde Toluol abdestilliert, um die Hauptmenge des Wassers zu entfernen. Danach wurde 3-Mercaptopropylmethyldimethoxysilan und eine geringe Menge DMAP (Dimethylaminopyridin) zugefügt. Die Suspension wurde 7 Stunden unter Rückfluß und leichtem Stickstoffstrom gekocht. Danach wurde die Suspension abgenutscht und das Kieselgel mit Toluol gewaschen. Das gewaschene Gel wurde dann mit

Methanol unter Rückfluss 20 min gekocht, damit schlecht gebundenes Silane hydrolysiert und entfernt werden konnte. Das modifizierte Kieselgel wurde wieder filtriert und mit Methanol gewaschen. Diese Wasch-Prozedur wurde noch zweimal mit Methanol wiederholt. Das Gel wurde dann getrocknet. Für das „Endcapping“ von Restsilanol-Gruppen wird das Kieselgel in 120 ml Toluol und 10 ml n-Hexan suspendiert. Danach wurde eine gewissen Menge an Toluol abdestilliert, damit die Hauptmenge an Wasser und Methanol entfernt wird. Nach Entfernen der Destillationsbrücke wurde ein Rückflußkühler aufgesetzt. Der Kolben wurde mit intensivem Stickstoffstrom gespült. 250 µl Hexamethyldisilazan wurde schließlich zur Lösung zugefügt. Die Suspension wurde dann 3 Std. gekocht. Danach wurde das Gel filtriert, mit Toluol gewaschen und in Toluol gekocht. Anschließend wurde noch dreimal mit Methanol suspendiert, Rückfluß gekocht und filtriert. Zum Schluss wurde das modifizierte Kieselgel im Vakuumtrockenschrank bei 60°C getrocknet.

Tabelle 17: Elementaranalyse für 3-Mercaptopropylkieselgel

w-%C	w-%H	w-%N	w-%S
0,192	0,056	0,02	0,062
0.193	0,057	0,02	0,06

Die Daten in Tabelle 23 zeigen, dass die Funktionalisierung grundsätzlich erfolgreich war. Aufgrund der geringen spezifischen Oberfläche des weitporigen Materials ist allerdings der Kohlenstoff und Schwefel-Gehalt sehr gering, was zu erwarten war.

3.2.3 Chromatographische Säulentestung von 3-Mercaptopropylkieselgel

Das modifizierte Mercaptopropylkieselgel wurde danach chromatographisch getestet.

Tabelle 18: Die Chromatographie-Ergebnisse auf 3-mercaptopropyl-Kieselgel

Testsubstanz	Retentionszeit	Symmetrie	Peak Width	Bodenzahl	Bodenhöhe	h_{red}	k'
Anilin	>28 min						>17
Nitrobenzol	1,62 min	0,62	0,059	4177	23,9 µm	7,98	0,03
Phenol	3,68	0,47	0,296	856	116,8 µm	38,93	1,33
Toluol	1,58	0,62	0,061	3717	26,9 µm	8,97	0
tri-tertButylbenzol	1,58	0,6	0,058	4125	24,2 µm	8,08	0

3.2.4 Oxidation von hergestelltem Mercaptopropylkieselgel

Aus dem 3-Mercaptopropylkieselgel sollte für die Ion-Exclusion Chromatographie ein starker Kationenaustaucher auf Basis einer Sulfonsäure als geladene Gruppe

hergestellt werden. Dazu wurde die Mercaptangruppe von 3-Mercaptopropylsilica oxidiert.

Zuerst wurde Perameisen Säure hergestellt. 190 µl Ameisensäure wurde mit 34 µl Wasserstoffperoxid versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

3g Mercaptopropylkieselgel (3100 Å, 3 µm) wurde mit 100 µl Ameisensäure und so viel Methanol, bis das Gel bedeckt ist, in einem 3 Hals-Kolben gemischt und aufgeschlämmt. Die Perameisensäure wurde dann unter mechanischem Rühren und Eiswasserbad zugegeben und für 4 Stunden weitergerührt. Nach 2 Stunden wurde nochmals 100 µl Perameisensäure zugegeben, weil die Säure sehr flüchtig ist.

Anschließend wurde das oxidierte Kieselgel auf einer Nutsche abgesaugt und 5 mal mit Methanol gewaschen. Das Kieselgel wurde bei 60°C vorgetrocknet und über Nacht im Vacuumtrockenschrank bei 60°C zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Elementaranalyse lieferte die folgenden Ergebnisse:

Tabelle 19: Elementaranalyse für 3-Sulphopropyl-Kieselgel

w-%C	w-%H	w-%N	w-%S
0,163	0,074	0,02	0,063
0,153	0,072	0,02	0,063

0,00063g S/g Produkt

$0,00063/32,06 = 0,000196 = 19,6 \mu\text{mol S /g Produkt}$

3.2.5 DPDS-Test

Für die Quantifizierung der aktiven Thiolgruppen auf der Oberfläche der stationären Phase des 3-Mercaptopropyl-Silikagel wurde eine spektrophotometrische Bestimmung verwendet. Die Methode beruht auf einer Thiol/Disulfid-Austauschreaktion mit 2,2'-Dipyridyldisulfid (DPDS) und anschließende photometrische Bestimmung oder HPLC-Detektion des freigesetzten Pyridin-2-thion [11].

Für die erste Bestimmung wurde eine Kalibrierfunktion mit 2-Mercaptoethanol erstellt. Dafür wurden verschiedene Mengen von 2-Mercaptoethanol mit gleicher Menge von DPDS eingesetzt. Nach bestimmter Reaktionszeit werden die Reaktionsansätze photometrisch bei 371 nm gemessen. Danach wurden die mit Reagens agierten Proben photometrisch vermessen und mit Hilfe der Kalibrierfunktion die Thiolgruppen-Konzentration in der Probe bestimmt.

Tabelle 20: DPDs-Test für beide modifizierte Kieselgel-Materialien

DPDS-Test für nicht oxidiertes Material	16µmol/g
DPDS-Test für oxidiertes material	1µmol/g

Die DPDS-Ergebnisse in Tabelle 21 zeigen deutlich eine Senkung an Thiolgruppen in dem Produkt nach dem Oxidationsverfahren. Das heißt, ca. 94% der Thiolgruppen wurden laut DPDS Test vor und nach Oxidation zu Sulfonsäuregruppen oxidiert.

3.2.6 Ionenausschluß-Chromatographie mit der Sulfopropylsilikagel-Säule

Nachdem die Säule gepackt wurde, wurden einige Experimente zur Trennung der Plasmidisoformen auf Basis von Ionenausschluß-Prinzip durchgeführt. Das Ziel war zu evaluieren, ob Unterschiede in den Ladungszuständen bzw. Ladungsdichten der Plasmidisoformen, die aus dem unterschiedlichen hydrodynamischen Ionenradius resultieren, ausreichen, um Selektivitätseffekte aufgrund von unterschiedlich starken repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen und unterschiedlichen zugänglichen Porenvolumina zu entwickeln, die eine Trennung der Plasmidisoformen erlauben würden.

Es wurde mit dem Puffer A (NaH_2PO_4 5 mM, pH 7) und dem Puffer B (Phosphatpuffer 5mM/NaCl 500 mM) gearbeitet. Die Detektionswellenlänge war 258 nm.

3.2.6.1 Die Flußrate-Studie

Die Probe pDNA1 (4892 bp) final bulk wurde bei verschiedenen Flußraten injiziert (3 µl). Es wurde isokratisch mit dem Phosphatpuffer (NaH_2PO_4 5 mM , pH 7) bei 25°C gearbeitet.

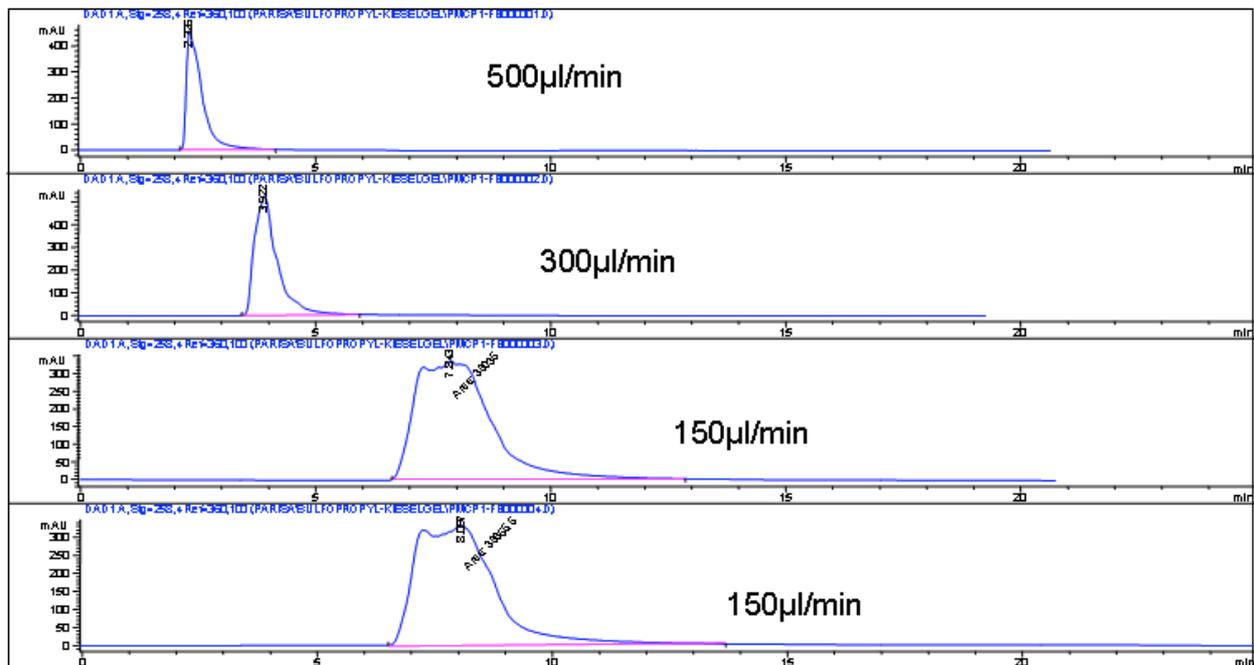


Abbildung 46: Die Flußrate-Studie für pDNA1 final bulk

Tabelle 21: Die Probe pDNA1 final bulk 3 µl

Flußrate µl/min	Retentionszeit min
500	2,326
300	3,92
150	7,843

3.2.6.2 Isokratische Chromatographie bei der Flußrate 100 µl/min

Eine Reihe einfache Chromatographie-Versuche wurden durch isokratische Elution auf der hergestellten stationären Phase durchgeführt, um mögliche Effekte zu überprüfen.

Die Methode: isokratisch mit dem Phosphatpuffer (NaH₂PO₄) 5mM, 100 µl/min, bei 25°C. Zwischen den Läufen wird die Säule für 20 Minuten gereinigt.

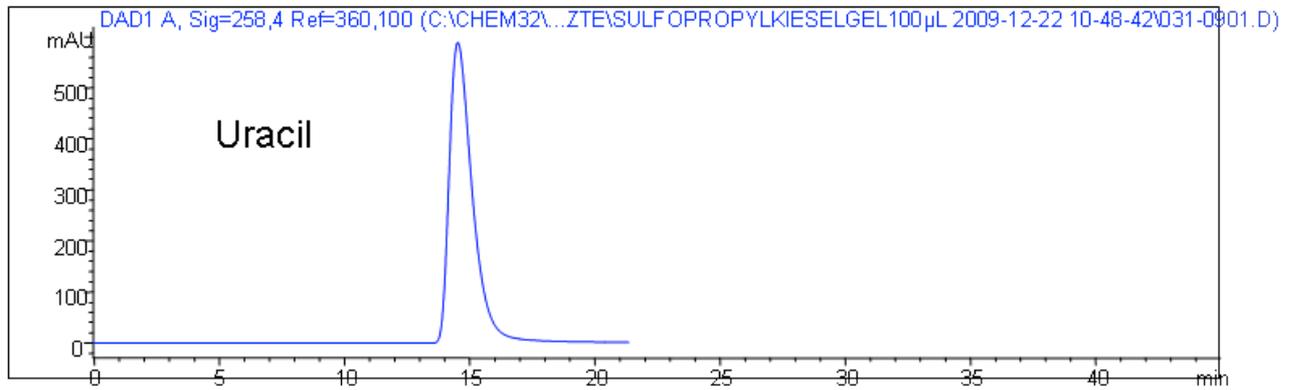


Abbildung 47: Chromatogramm von Uracil-Elution

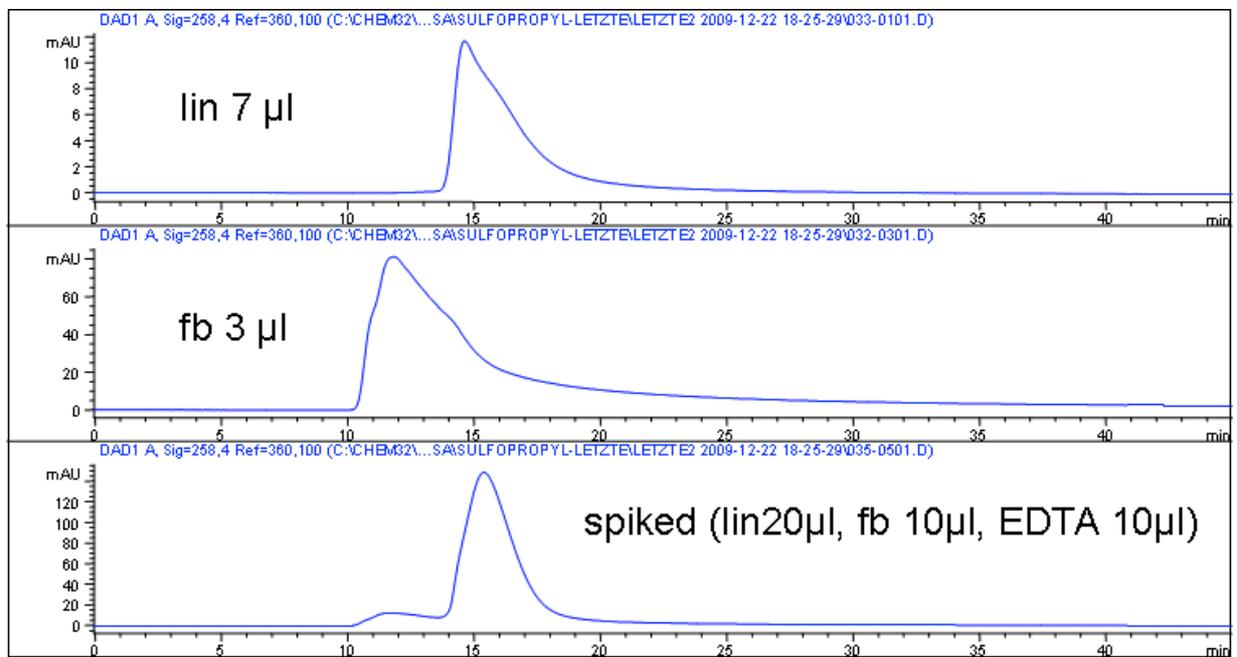


Abbildung 48: Chromatogrammen von Elution der 2 Plasmidisoformen

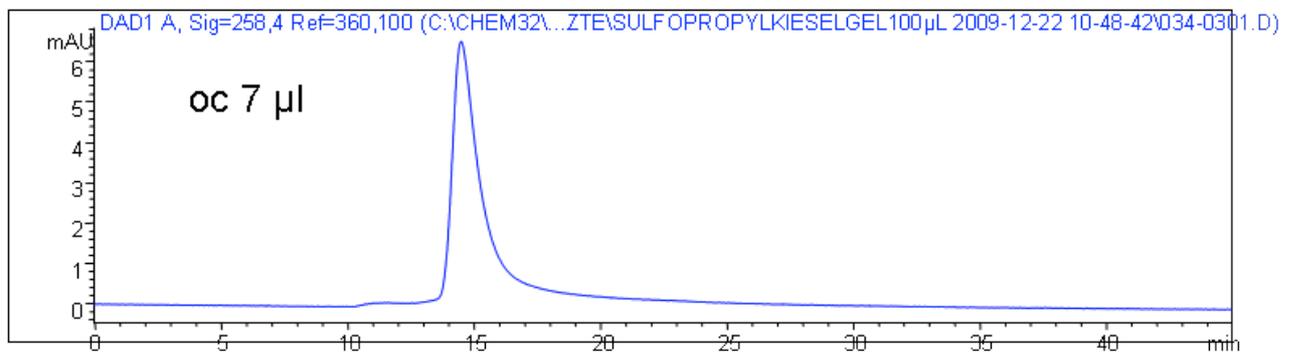


Abbildung 49: Chromatogramm von oc-Form

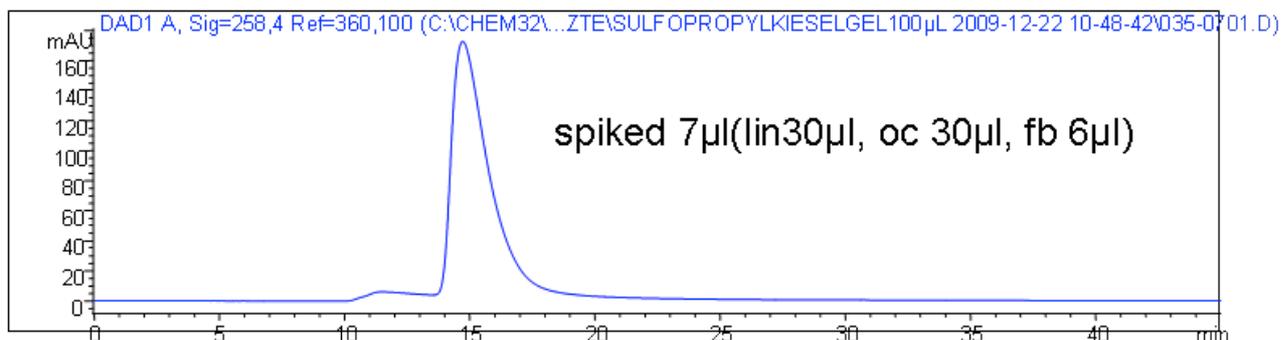


Abbildung 50: Chromatogramm der gespikten Probe

Tabelle 22: Retentionszeiten der durch Ion exclusion chromatographierte Proben

Retentionszeit min					
Uracil	fb	Lin	oc	spiked (lin30,oc30,fb6,EDTA20)	spiked (lin20,fb10,EDTA10)
14,522	11,721	14,608	14,48	14,718	15,392

In den Chromatogrammen kann man eine schnellere Elution für die ccc-Form in final bulk im Vergleich zur linearen und oc-Form erkennen.

3.2.6.3 Ionenstärke Studie

Aus den oben gezeigten Vorversuchen wurde abgeleitet, dass die repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen unter den verwendeten Bedingungen nicht stark genug waren, um einen nennenswerten Ionenausschluß-Effekt zu generieren. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Ionenstärke variiert. Durch Herabsetzen der Ionenstärke sollte die Dicke der elektrischen Doppelschicht an der Oberfläche der stationären Phase vergrößert werden und so das tatsächliche elektrische Potential verstärkt werden. Es sollte somit eine Verstärkung der repulsiven elektrostatischen Wechselwirkung erfolgen. Bei Erhöhen der Ionenstärke tritt der gegenteilige Effekt auf.

Es wurden einige Läufe bei zwei Salzkonzentrationen isokratisch durchgeführt.

Der Puffer A: Phosphatpuffer 5 mM, pH 7

Der Puffer B: Phosphatpuffer 5 mM, NaCl 500 mM, pH 7

Die Methode: 10% Puffer B, 25°C, Flußrate 100µl/min

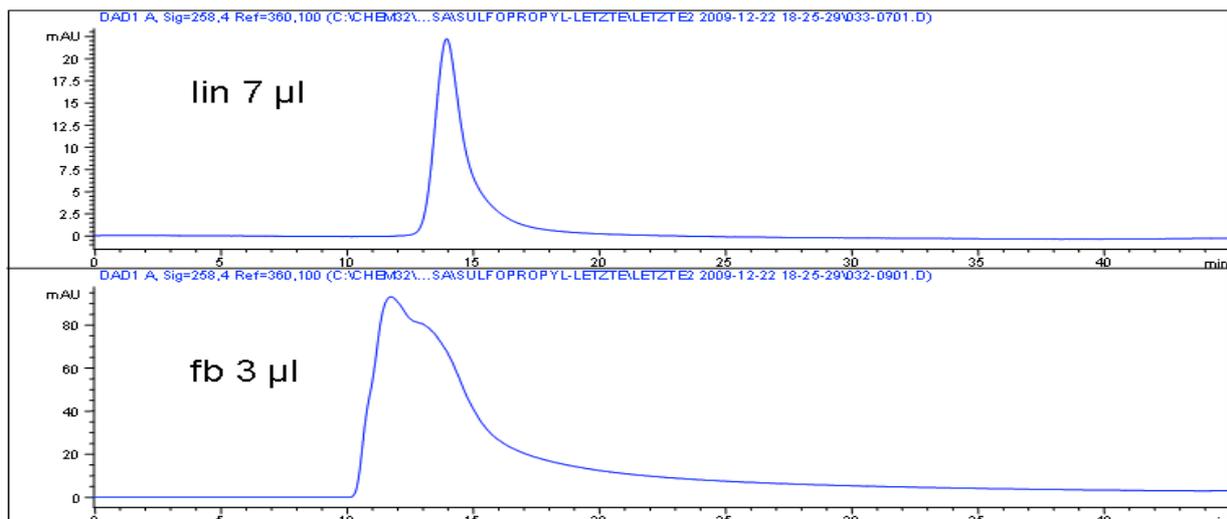


Abbildung 51: Isokratisch bei der 10% Puffer B

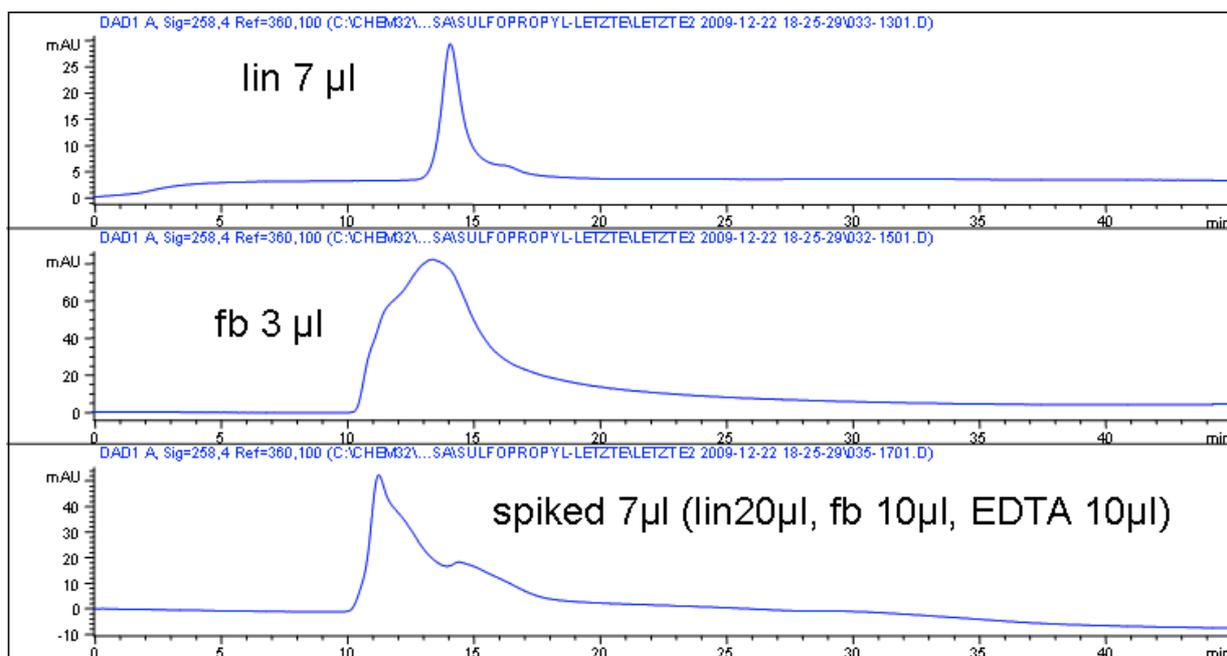


Abbildung 52: : Isokratisch bei der 50% Puffer B

Tabelle 23: Der Effekt der Ionenstärke

Puffer B%	Retentionszeit min	
	fb	lin
0	11,828	14,608
10%	11,679	13,946
50%	13,388	14

Aus den Daten ist ersichtlich, dass die ccc-Form wieder früher eluiert. Eine Verbesserung in Auflösung und Selektivität wird allerdings benötigt, wozu ein ausgedehntes Optimierungsprogramm benötigt würde.

3.2.6.4 Elution mit Wasser bei 100 µl/min

In den oben beschriebenen Versuchen war die Ionenstärke vermutlich zu hoch, sodass das Elutionsfenster äußerst eng war und damit keine ausreichende Selektivität vorhanden war. Ein kurzer Versuch mit Wasser als mobile Phase zeigte allerdings eine mögliche Selektivität zwischen den Isoformen und das Optimierungspotential.

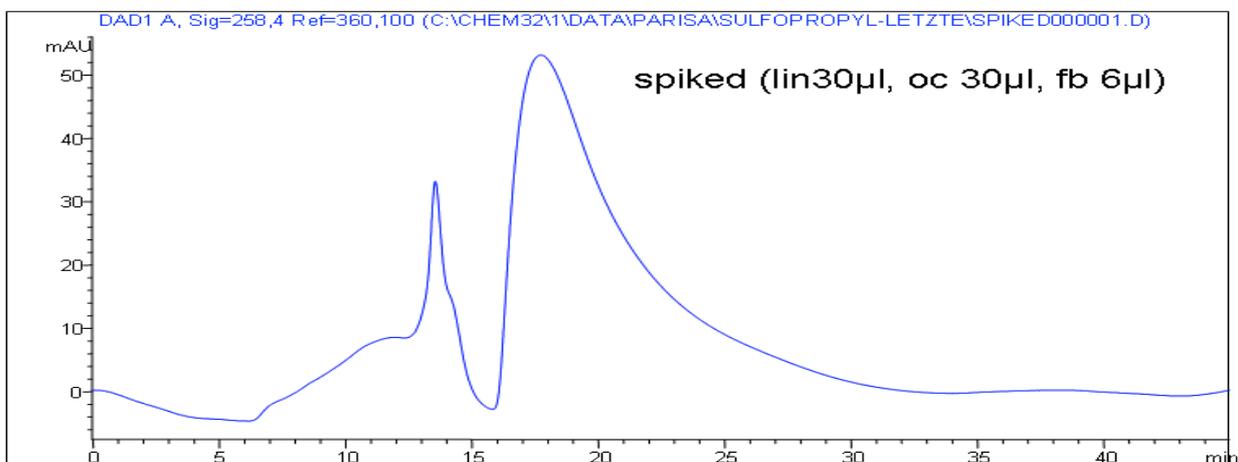


Abbildung 53: : Ionenausschlußchromatographie ohne Puffer und Salz (rein wässrig)

Tabelle 24: Retentionszeit von Peaks

Retentionszeit min	
	17
	14,5

Die beschriebenen Vorversuche zur Ionenausschluß-Chromatographie zeigen, dass es wohl schwierig sein würde eine adäquate Selektivität zu erzielen. Weitere systematische Studien sind dazu allerdings notwendig, bevor man dazu ein endgültiges Statement abgeben kann.

3.3 Optimierung der Trennung mittels Size Exclusion-Chromatographie und 2D-LC Vorversuche

Plasmide werden biotechnologisch hergestellt und die einzelnen Prozessschritte müssen einer stichprobenartigen analytischen Kontrolle unterzogen werden. In den frühen Prozessstufen des „Downstream-Processing“ sind die erhaltenen Proben für die Qualitätskontrolle noch relativ komplex und enthalten eine Vielzahl an Störkomponenten (Matrix). Insbesondere andere Biopolymere wie Nukleinsäuren und Protein können eine saubere Analytik auf einer Anionenaustauscher-Säule stören. Um eine automatische „on-line“ Vorreinigung vor der eigentlichen analytischen Trennsäule zu erhalten, wurde eine 2-dimensionale Chromatographie ins Auge gefasst, bei der die Plasmide in der ersten Dimension von den Störkomponenten (Protein und RNA) abgetrennt werden sollten.

Mit dem Ziel eine zweidimensionale Trennung auf zwei nacheinander geschalteten Säulen, wovon eine eine AEX-Säule (2.Dimension) und eine eine SEC-Säule (1. Dimension) sein sollte, zu erreichen, wurde zuerst eine Optimierung der Trennbedingungen auf der SEC-Säule durchgeführt. In weiterer Folge sollte dann eine zweidimensionale Trennung aufgesetzt werden. Auf der SEC-Säule sollten die Plasmid-Isoformen bei geeigneter Säulenauswahl aufgrund deren Größe alle im Ausschlußvolumen eluieren, während kleinere Analyte (RNA und Proteine) später eluieren sollten, da das Porenvolumen der SEC Säule für diese Analyte partiell zugänglich sein sollte. Kritisch bei der Trennung in der ersten Dimension sollte die Abtrennung der RNA sein, während Proteine viel kleiner sind und daher kaum ein Problem bereiten sollten.

Nach erfolgter Etablierung der beiden Trenndimensionen in separater Form sollten die beiden Trennsysteme miteinander gekoppelt werden und danach 5 Realproben aus einem biotechnologischen Herstellungsprozeß für die 2D-HPLC Tests verwendet werden. Die Proben stammen von verschiedenen Stufen des Reinigungsprozesses. Die Probe „Lysat“ ist einfach die Fermentationsbrühe nach Zell-Lysis. Die Proben „HIC-load“ und „HIC-pool“ sind die entsprechenden Lösungen, die für die Injektion auf die HIC-Säule vorbereitet wurden bzw. die gepoolten Fraktionen der HIC-Trennung darstellen. Die Probe „HIC-pool“ ist auch die Probe für den darauffolgenden AEX-Schritt. Die Eluate der AEX werden als nächstes auf eine SEC aufgetragen („Polishing“ Schritt) und werden im Folgenden als "SEC-load“ bezeichnet. Am Schluß hat man die reinste Probe, „SEC pool“. Es wäre sehr günstig, wenn die Schritte gleich nacheinander ohne zusätzliches Handling wie Filtrieren, Entsalzen, Ankonzentrieren etc. ablaufen könnten, deswegen ist es wichtig, dass die Chromatographieschritte aufeinander abgestimmt sind. Für analytische Arbeiten bei der Qualitätskontrolle ist es wünschenswert aufgrund der hohen Probenzahlen, wenn Probenvorbereitungsschritte automatisch ablaufen können. Aus diesem Grund sollte dafür eine 2D-HPLC entwickelt werden.

3.3.1 SEC Vorversuche: Optimierung der Trennung der 1.Dimension

Plasmide sind doppelsträngige DNA mit typischerweise ca. 2,5 bis 20 kbp. Das für die folgenden Versuchen verwendete Plasmid besteht aus 4,9 kbp. Die Plasmide sollen im Ausschlußvolumen eluieren, während die Poren der SEC Säule für die abzutrennenden Matrixkomponenten partiell zugänglich sein sollten, um eine gute Abtrennung zu erzielen. Dementsprechend wurde eine SEC Säule (SEC-TOSOH TSK-Gel G-DNA-PW, 7,8x300 mm, Partikelgröße 10 µm) ausgewählt, die einen maximalen Druck von 32 bar aushält. Die Säule wurde in ein Dionex Ultimate 3000 Inertsystem, welches 2D-Tauglichkeit besitzt, eingebaut und mit folgenden Elutionsbedingungen isokratisch betrieben.

Puffer A: Tris-HCl 0,1 M, EDTA (Fluka 03680) 1 mM, NaCl 0,3 M, pH 7,5, 25° C

Die SEC-Säule wurde isokratisch bei einer Flussrate von 500 µl/min betrieben. Die Laufzeit war 30 Minuten. Die Proben waren die bereits erwähnten Real-Proben. Die Lysat-Probe ist die Probe nach dem Zellaufschluss-Verfahren. Die ‚HIC load‘ Probe ist die Probe, die man im „Hydrophobic Interaction“ Chromatographie Verfahren injiziert. Die ‚HIC pool‘ Probe ist die Probe, die bei der ‚Hydrophoben Interaktionschromatographie‘ Reinigung gewonnen wurde. Die ‚SEC load‘ und ‚SEC pool‘ Proben beziehen sich auf das „Size Exclusion“ Chromatographie Verfahren. Es soll auch nochmals erwähnt werden, dass zwischen HIC- und SEC-Verfahren eine Anionenaustausch-Chromatographie erfolgt. Daher ist die Probe „HIC pool“ gleich „AEX load“ und die Probe „SEC load“ gleich „AEX pool“.

In den folgenden Chromatogramm-Serien werden zusätzlich zu den Chromatogrammen erhalten durch UV-Detektion bei 258 nm noch jeweils ein berechnetes Chromatogramm, erhalten durch Division der Signalspuren bei 258 nm und 280 nm und ausgewertet durch das Dionex-HPLC, gezeigt. Das Verhältnis Signal bei 258 nm / Signal bei 280 nm gibt ein Maß für die Reinheit der DNA von Proteinen. Für reine DNA und RNA ist das Verhältnis zwischen 1,8 bis 2. Dieses kann daher auch für die Identifizierung der Peaks in Real-Proben nützlich sein [12].

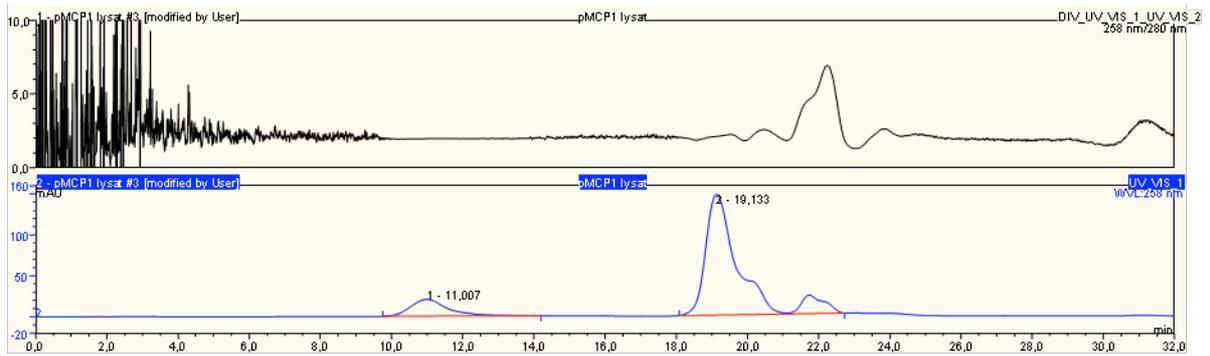


Abbildung 54: Das Chromatogramm für Lysat-Probe

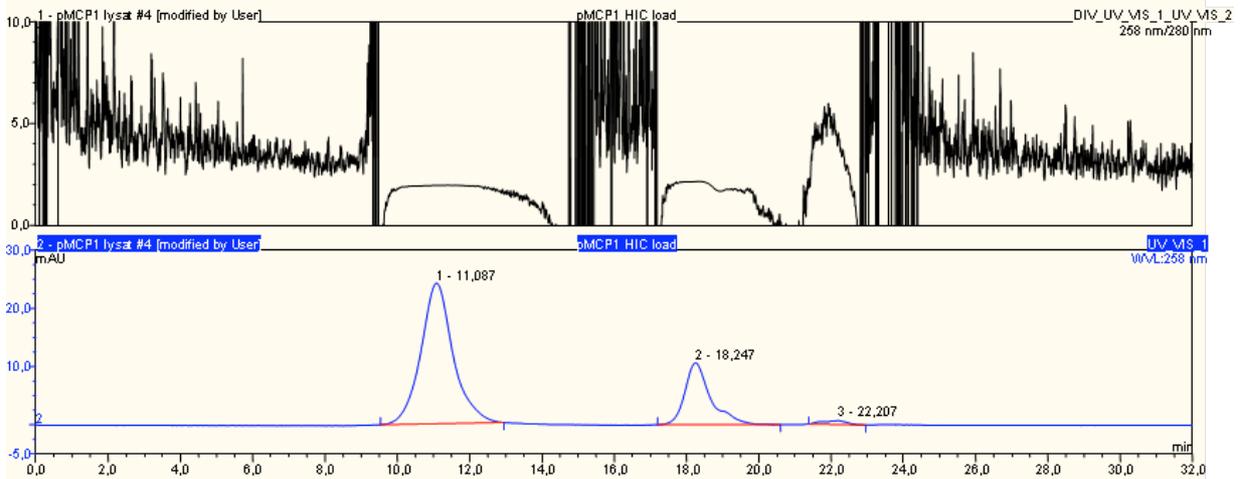


Abbildung 55: Das Chromatogramm für die Probe „HIC-load“

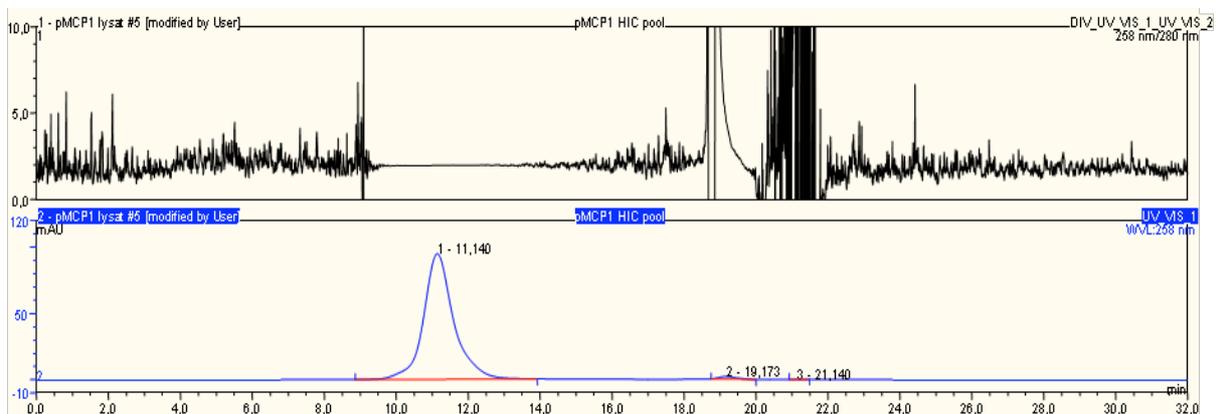


Abbildung 56: Das Chromatogramm für die Probe „HIC-pool“

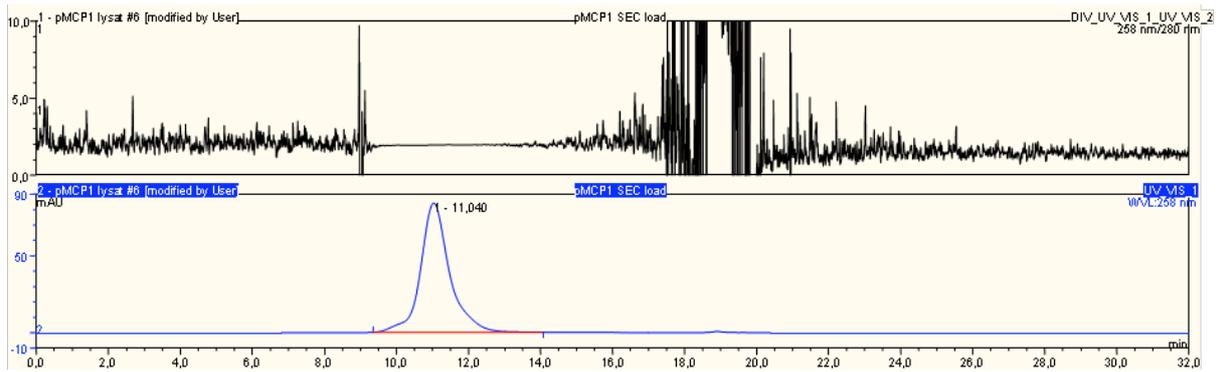


Abbildung 57: Das Chromatogramm der Probe „SEC-load“

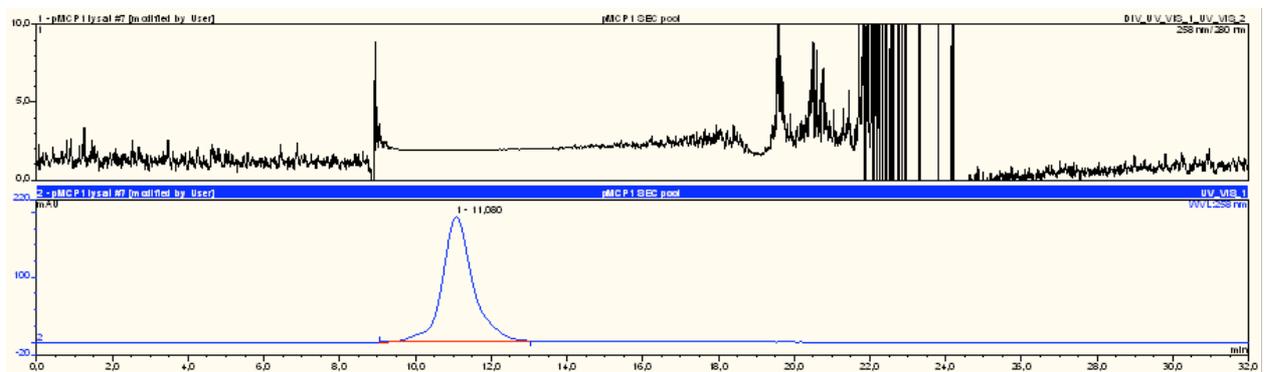


Abbildung 58: Das Chromatogramm der Probe „SEC-pool“

Tabelle 25: Ergebnisse für Plasmide durch Standard Methode

	SEC load	SEC pool	HIC pool	HIC load		Lysat	
Retentionszeit min	11,04	11,08	11,14	Plasmid	RNA	Plasmid	RNA
Peakfläche mAU*min	104,278	299,27	105,769	40,056	13,035	31,46	157,513

Aus den Chromatogrammen in den Abbildungen 55-59 wird ersichtlich, dass die Reinheit der Proben mit zunehmender Reinigungsstufe deutlich besser wird. Der Peak bei ca. 11 min. ist Plasmid. RNA (UV 250/280 ebenso ca. 2) eluiert bei ca. 18-19 min. Nach dem RNA Peak erscheinen insbesondere im Lysat noch einige Proteinpeaks, die erst später eluieren (erkenntlich an einem deutlich abweichenden Verhältnis der Signalspuren UV 250/280 von 2).

In den Chromatogrammen der Proben „HIC load“ (Abb. 56) und Lysat (Abb. 55) sind RNA-Peaks erkennbar. Zur Bestätigung wurde RNA injiziert und diese eluierte tatsächlich bei ca. 18-19 min.

3.3.2 Salz-Effekt

In der SEC will man Moleküle auf Basis von Größenunterschieden auftrennen. Zusätzlich vorhandene Wechselwirkungen der Analyte mit der stationären Phase müssen vermieden werden, da sonst ein gemischter Trennmechanismus resultiert.

Um mögliche elektrostatische Wechselwirkungen der Analyte mit der stationären Phase zu minimieren, aber auch um die Plasmide bis zu einem gewissen Grad zu kompaktieren, wurde der mobilen Phase NaCl zugesetzt. Um den Effekt der Ionenstärke auf sekundäre Wechselwirkungen und den Größenausschluß zu studieren, wurde eine Versuchsreihe bei verschiedenen Salzkonzentrationen durchgeführt. Weiters könnte der NaCl Zusatz Einfluß auf die Recovery besitzen.

Die folgenden Chromatogramme zeigen die SEC Trennungen derselben Proben zuerst in Abwesenheit von NaCl, also bei einer Salzkonzentration von 0 mM.

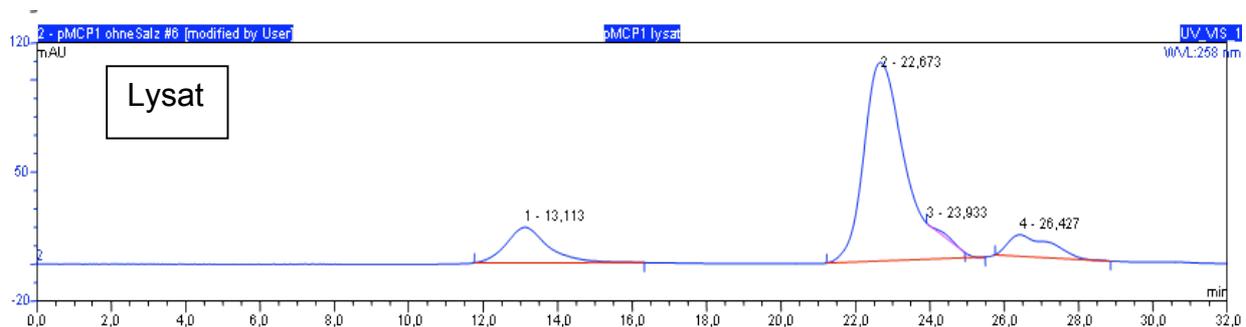


Abbildung 59: Mobile Phase ohne Salz, die Probe Lysat

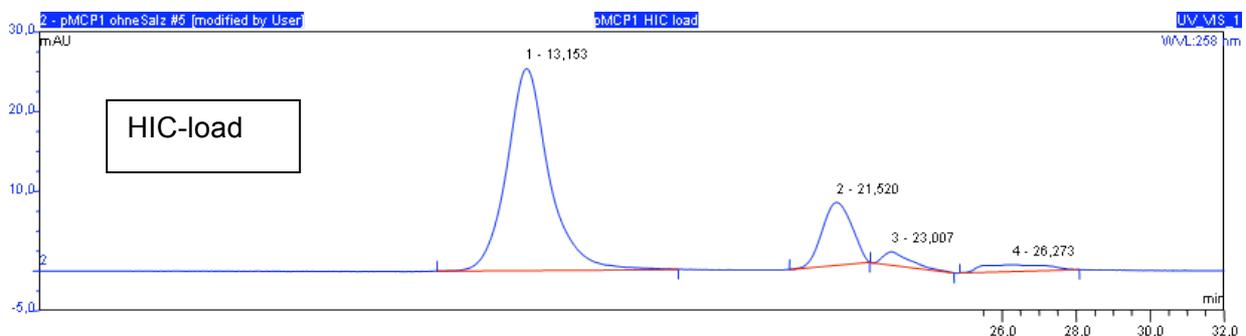


Abbildung 60: Mobile Phase ohne Salz, die Probe HIC-Load

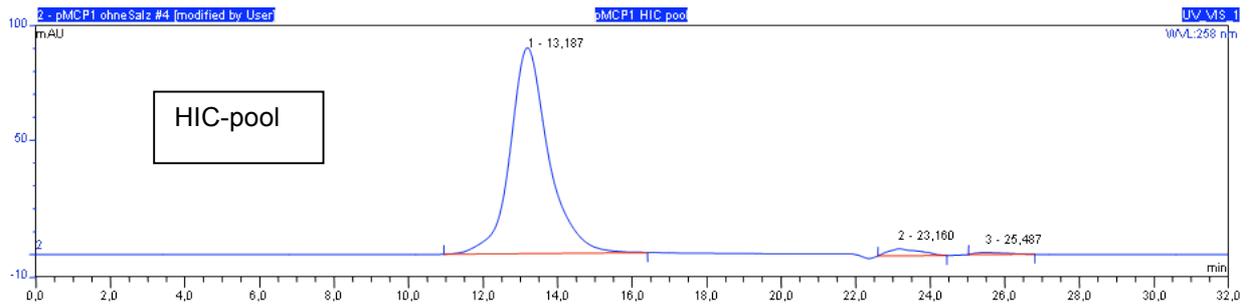


Abbildung 61: Mobile Phase ohne Salz, die Probe HIC-Pool

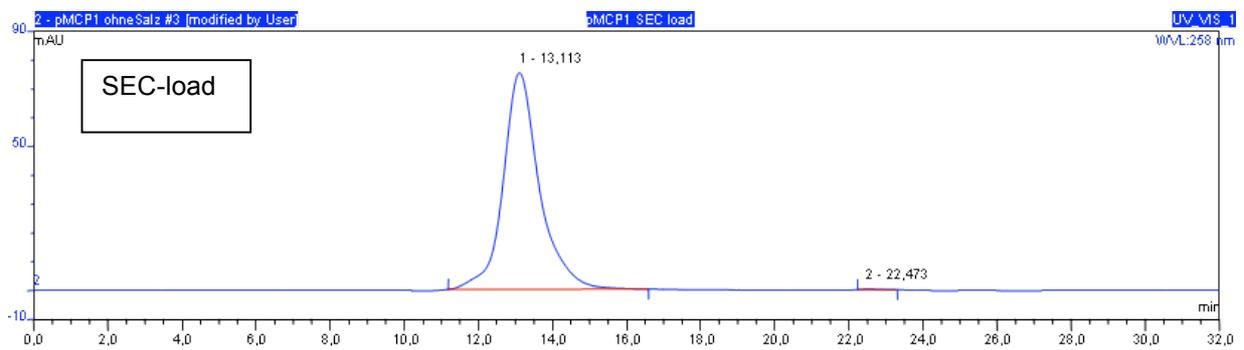


Abbildung 62: Die Mobile Phase ohne Salz, die Probe SEC-Load

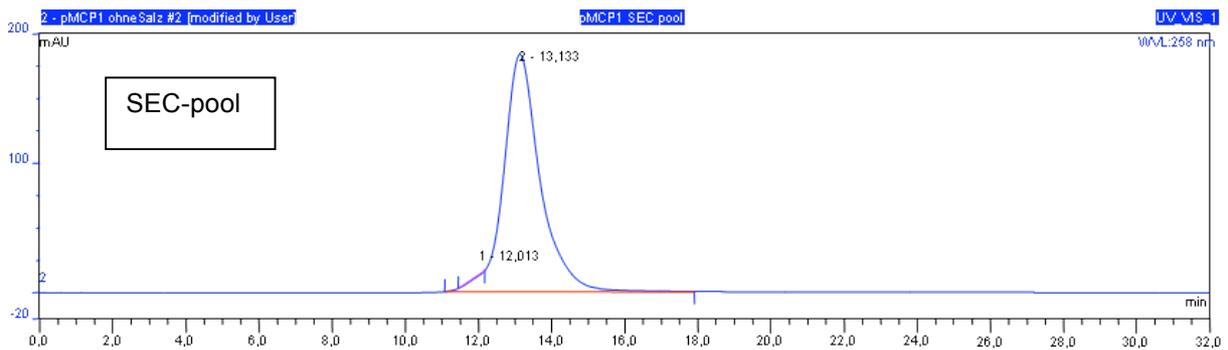


Abbildung 63: Die mobile Phase ohne Salz, die Probe SEC-pool

Die ganze Reihe wurde auch für zwei weitere Salzkonzentrationen, 0,1M und 0,2 M durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 26: Drei Läufe für die Probe „SEC load“ durch Standard-Methode (0,1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,3 M NaCl, pH 7,5; Säulentemperatur 25°C) bei 500µl/min

	Peakfläche mAU*min	Standardabweichung
1. Lauf	78,106	2,08
2. Lauf	81,768	
3. Lauf	81,649	

Tabelle 27: Salz Effekt für 5 Proben

ohne Salz	SEC load	SEC pool	HIC Pool	HIC load		Lysat	
Retentionszeit min	13,11	13,136	13,19	13,15	21,52	13,11	22,67
Peakfläche mAU*min	85,435	213,837	107,408	33,495	7,248	25,132	142,393
Salzkonz. 0,1M	SEC load	SEC pool	HIC Pool	HIC load		Lysat	
Retentionszeit min	13,13	13,15	13,26	13,21	21,77	13,17	22,73
Peakfläche mAU*min	102,563	169,498	115,746	36,495	7,577	25,296	140,444
Salzkonz. 0,2 M	SEC load	SEC pool	HIC Pool	HIC load		Lysat	
Retentionszeit min	13,15	13,15	13,23	13,2	21,86	13,15	22,79
Peakfläche mAU*min	98,134	137,617	113,063	36,079	12,04	25,823	120,835
Salzkonz. 0,3 M	SEC load	SEC pool	HIC Pool	HIC load		Lysat	
Retentionszeit min	11,04	11,08	11,14	11,09	18,25	11,01	19,13
Peakfläche mAU*min	104,278	299,27	105,769	40,056	13,035	31,46	157,513

Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass der NaCl Zusatz keine nennenswerte Auswirkung auf die Trennung und somit auch auf die Selektivität besitzt, was man von einer reinen SEC auch erwarten würde. Weniger klar ist die Auswirkung auf Peakfläche und Recovery (siehe Tabelle 29-33).

Tabelle 28: SEC load/Salzeffekt

Salzkonz. M	Peakfläche mAu*min	StAbw
0	85,435	8,5
0,1	102,563	
0,2	98,134	
0,3	104,278	

Tabelle 29: SEC pool/Salzeffekt

Salzkonz. M	Peakfläche mAu*min	StAbw
0	213,837	70,2
0,1	169,498	
0,2	137,617	
0,3	299,27	

Tabelle 30: HIC pool/ Salzeffekt

Salzkonz. M	Peakfläche mAu*min	StAbw
0	107,408	4,7
0,1	115,746	
0,2	113,063	
0,3	105,769	

Tabelle 31: HIC load/Salzeffekt

Salzkonz. M	Peakfläche mAu*min	StAbw
0	33,495	2,7
0,1	36,495	
0,2	36,079	
0,3	40,056	

Tabelle 32: Lysat/Salzeffekt

Salzkonz. M	Peakfläche mAu*min	StAbw
0	25,132	3
0,1	25,296	
0,2	25,823	
0,3	31,46	

Durch einen Vergleich der Standardabweichungen für die Peakflächen bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen für die verschiedenen Proben sieht man, dass die Standardabweichungen zwischen 2 und 8 sind. Nur bei der „SEC pool“ hat man eine StAbw von 70, eine starke Abweichung, was bei der Konzentration 0,3 M entsteht.

Aus Abbildung 65 wird ersichtlich, dass die Salzkonzentrationsänderung in dem Bereich bis 0,3 keine allzu große Wirkung haben kann. Aber bei 0,3 M hat man generell bessere Wiederfindung der Probe besonders bei der Probe „SEC-pool

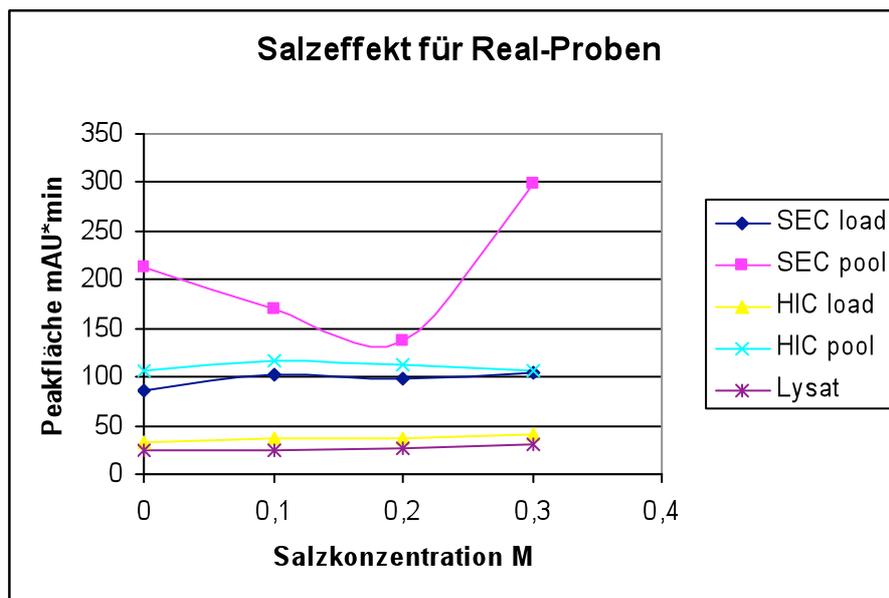


Abbildung 64: Salzeffekt auf SEC-Säule

3.3.3 Chromatographie von RNA-Probe auf SEC-Säule

Es sollte das Elutionsverhalten von RNA auf der verwendeten SEC Säule und gegebenen Elutionsbedingungen untersucht werden. Dazu wurde die SEC Standard Methode (0,1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,3 M NaCl, pH 7,5; Säulentemperatur 25°C) verwendet. Die RNA Probe hatte eine Konzentration von 10 mg/ml. Die Ergebnisse sind in Abb. 66-67 dargestellt. Die Daten in der Tabelle 34 sowie die

Chromatogramme belegen eindeutig, dass die RNA gut von der pDNA abgetrennt werden kann.

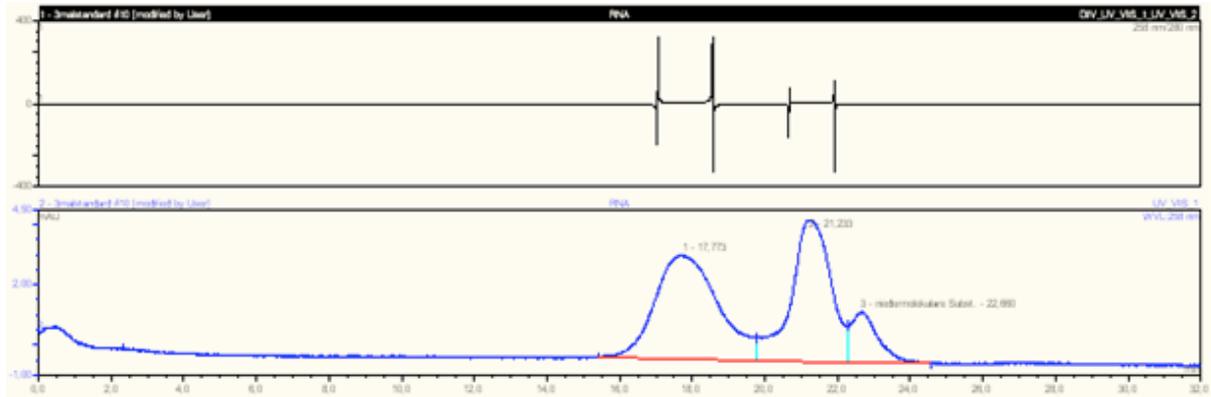


Abbildung 65: Chromatogramm für 1:10 verdünnte RNA-Probe mit SEC-Standardmethode

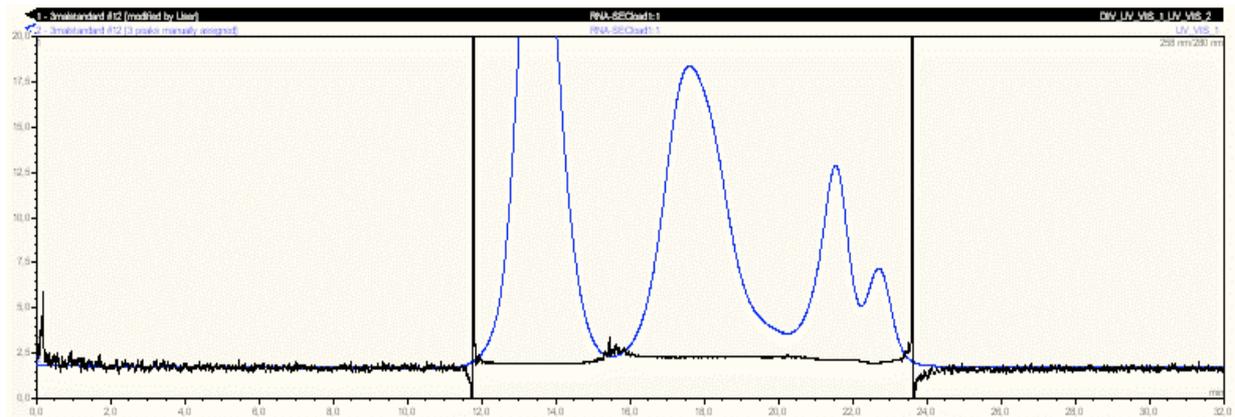


Abbildung 66: Chromatogramm für eine gespikete RNA-SECload(1:1) Probe durch SEC-Standardmethode

Tabelle 33: SEC Standardmethode für die RNA-Proben

	Retentionszeit min			
	Plasmide	RNAs	Niedermolekulare Substanzen	
RNA	keine	17,773	21,233	22,66
RNA-SEC load	13,487	17,607	21,54	22,7

3.3.4 Vorversuch für zweidimensionale Chromatographie

In einer 2D-HPLC Messanordnung soll die SEC-Trennung die erste Trenndimension darstellen und Anionenaustausch-Chromatographie die zweite Dimension. Der von der SEC Säule eluierende Plasmid Peak wird durch Umschalten eines Ventils auf die 2.Säule (AEX) injiziert („heart cut“). Für eine optimale Trennung ist es notwendig, dass die Elutionsbedingungen der ersten Dimension eine geringere Elutionskraft auf der zweiten Dimension besitzen als die mobile Phase der 2.Dimension, das die mobile Phase der ersten Dimension quasi die Probenmatrix für die 2.Dimension darstellt.

Durch zwei Versuche wird überprüft, ob die Plasmide mit den SEC Elutionsbedingungen im zweiten Schritt in der AEX-Säule eluiert werden oder nicht.

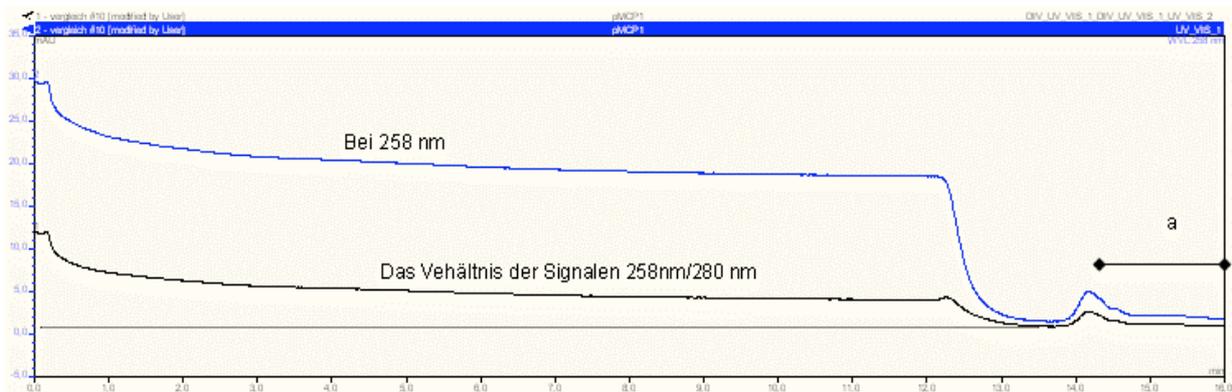


Abbildung 67: Ein Vorversuch auf AEX-Säule für 2DChromatographie.

Die AEX-Säule wurde mit SEC-Puffer (0,3 M Salzkonzentration) äquilibriert. Dann wurde die Probe-Injektion (pDNA1-fb) durchgeführt. Der SEC-Puffer wird 10 Minuten isokratisch bei 500 µl/min in die Säule gepumpt. Nachher wurde Gradientenelution entsprechend der Standard-Methode für AEX-Chromatographie mit Tris-Puffer (A) und Tris-Puffer (B) Tris-HCl/1 M NaCl durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Plasmide vom SEC-Puffer nicht eluiert wurden. Mit Hilfe des Signal-Verhältnis Diagramms kann bewiesen werden, dass die Plasmide erst ab der Minute 14 eluiert werden, wo das Signalverhältnis auf 1,8-2 kommt (Bereich a).

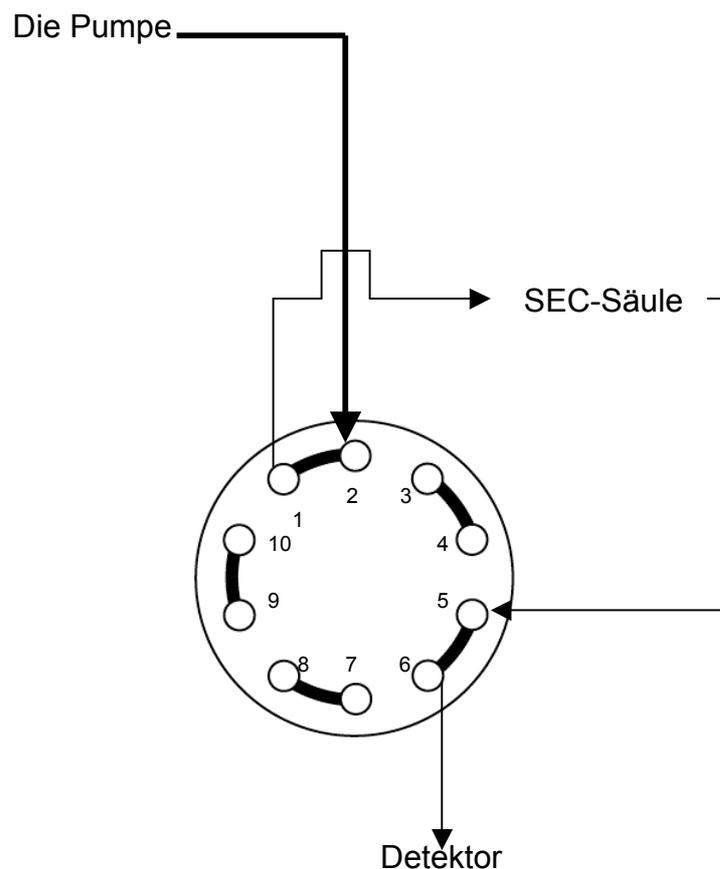
3.3.5 Zweidimensionale Chromatografie (SEC-AEX)

Im nächsten Schritt galt es die SEC online mit der AEX Chromatographie zu koppeln. Dazu wurde ein Agilent 1100 HPLC, ausgestattet mit einem 10 Port-Valve verwendet. Da nur eine Pumpe vorhanden war, handelt es sich nur um einen Vorversuch, um das Konzept und die Elutionsbedingungen zu etablieren. Später sollte mit einem Dionex Ultimate 3000 HPLC, welches zwei Pumpen sowie Schaltventile zur Verfügung hat, die eigentliche Methode etabliert werden.

Als Puffer für die SEC wurde Tris-HCl 0,1 M / NaCl 0,3 M, EDTA 1 mM, pH 7,5 verwendet, für die AEX Gradientenelution kamen Tris-HCl 20 mM, pH 9 (A) und Tris-HCl 20 mM / NaCl 1 mM pH 9 (B) zum Einsatz. Zuerst wurde die AEX-Säule mit 1:1 von beiden Puffern 10 Minuten bei der Flußrate 500 µl/ min äquilibriert. Dann wurde

die SEC-Säule isokratisch mit SEC-Puffer bei der Flußrate 500 µl/min äquilibriert. Der Prozess bestehend aus 3 Schritten wurde folgendermaßen aufgesetzt.

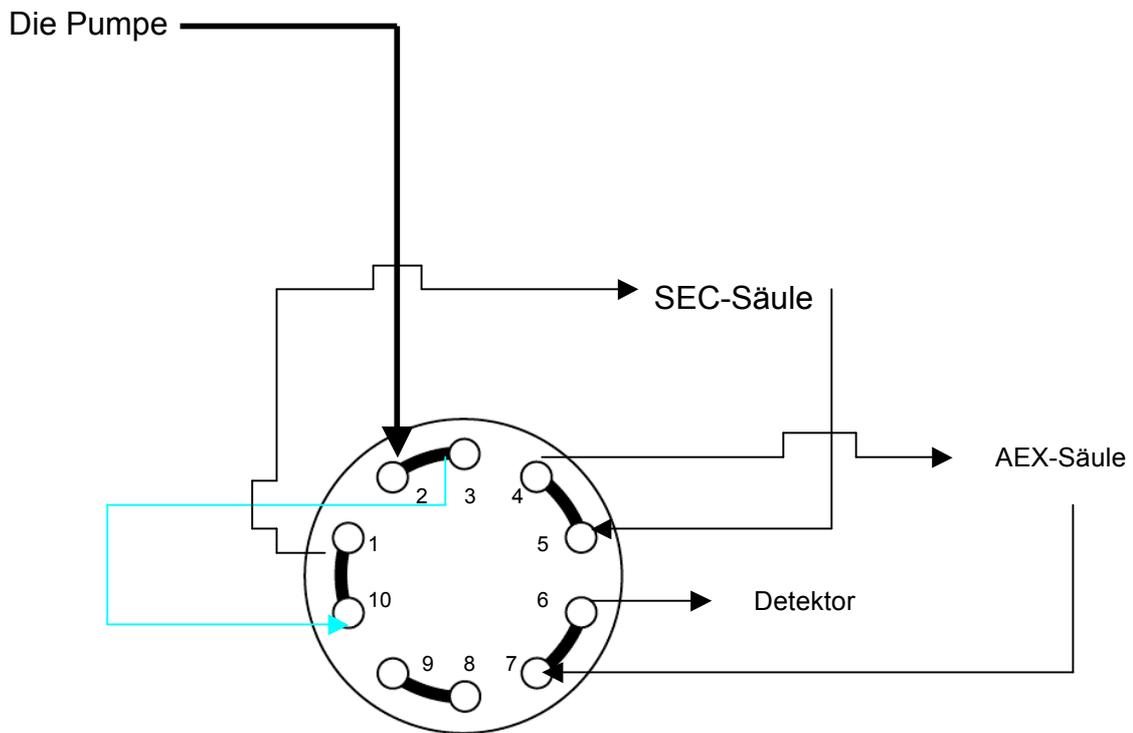
Schritt eins: Das untere Schema zeigt wie, der erste Schritt gemacht wird. Das Valve ist in Position 1-2. Die SEC-Säule hat keinen Zugang zur zweiten Säule und das Eluat wird durch den Detektor durchfließen und dort registriert. Die Flußrate ist 500 µl/min und die Wellenlänge 258 nm und 280 nm.



Nach Injektion der Probe wird in dieser Anordnung mit SEC Puffer eluiert, bis pDNA beginnt von der SEC Säule zu eluieren. Aus den Vorversuchen mit SEC-Säule alleine, weiß man, dass es ungefähr 9 Minuten dauert. Die Elution in der ersten Dimension ist isokratisch.

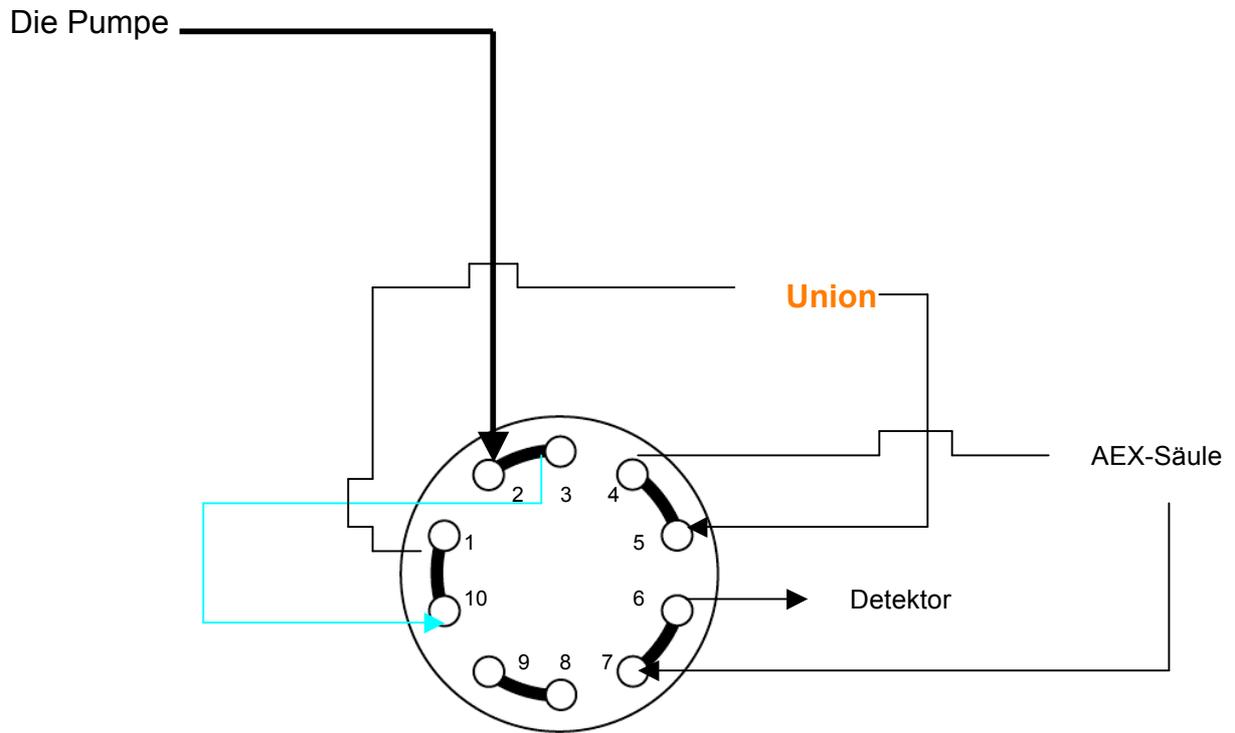
Schritt zwei: Im zweiten Schritt wird das Valve von der Position 1-2 auf 1-10 geschaltet und die weiteren Positionen gleichzeitig ebenso geschaltet wie im folgenden Schaltschema dargestellt. Auf diese Weise wird das Eluat der SEC via SEC Säule auf die AEX-Säule gebracht und danach detektiert. Diese Anordnung wird ganze 4 Minuten dauern, weil laut Standard-Läufen für „HIC-load“ zum Beispiel, die Elutionsdauer für Plasmide mit der Flußrate 500 µl/min in etwa 4 Minuten

gedauert hat. Das heißt, dieser Schritt wird beendet, wenn das gesamte Plasmid (d.h. der gesamte Plasmid Peak der SEC) auf die AEX-Säule übertragen worden ist. Die weiteren Eluate, wie RNAs und niedermolekulare Substanzen, bleiben vorerst in der SEC-Säule. Die Elution in diesem Schritt ist isokratisch mit SEC-Puffer.



Schritt Drei: Danach wurde die Pumpe gestoppt und eine neue Methode für die AEX aufgesetzt und gestartet. Die Schaltung bleibt grundsätzlich gleich (siehe folgendes Schaltschema) jedoch wurde die SEC-Säule manuell durch ein Union ersetzt, um bei der Elution mit den AEX Puffern die SEC Säule nicht zu schädigen. Anschließend wurde die AEX Methoden gestartet und mit Gradientenelution mit NaCl (50-75% des Puffers B in 5 min) die Plasmide in der 2. Dimension getrennt.

Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass es sich bei dieser Messanordnung um einen Vorversuch handelt. Bei Verfügbarkeit einer zweiten Pumpe ist es nicht notwendig, die SEC Säule manuell zu entfernen. Elution mit den NaCl-Gradienten der AEX durch die SEC Säule ist allerdings nicht ratsam, da dies die Lebensdauer der SEC Säule stark reduzieren könnte.



Die chromatographischen Ergebnisse dieser Vorversuche bei 258 nm sind in den folgenden Abbildungen ersichtlich.

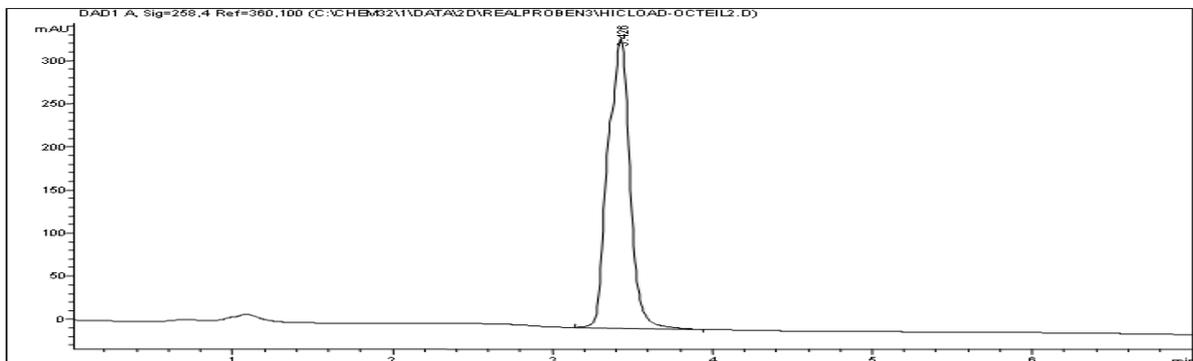


Abbildung 68: 10 µl HICload/OC-Form(2:1)

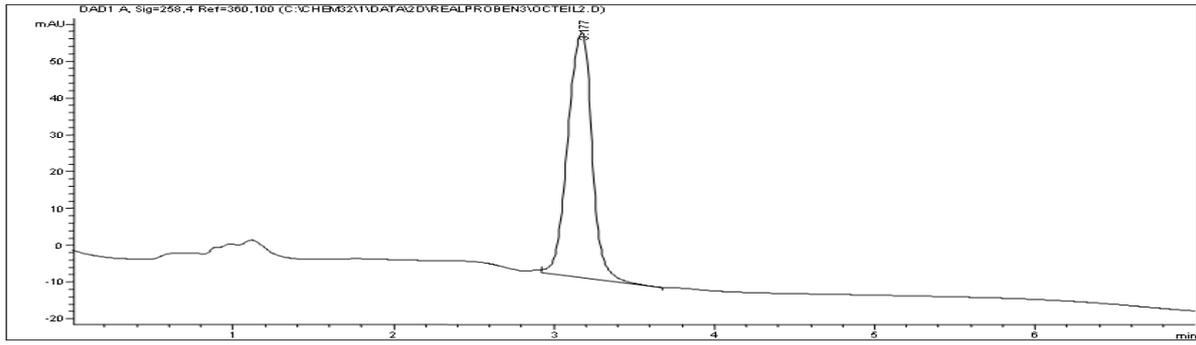


Abbildung 69: 10 µl OC-Form

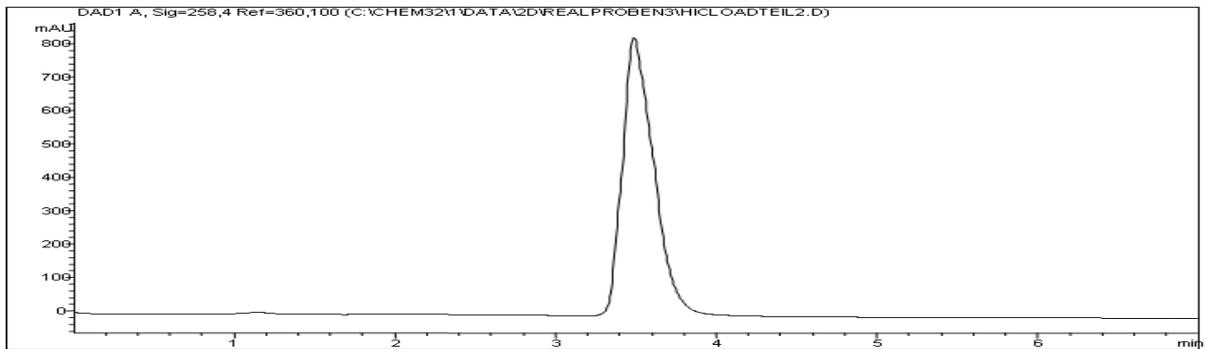


Abbildung 70: 10 µl „HIC-load“

:

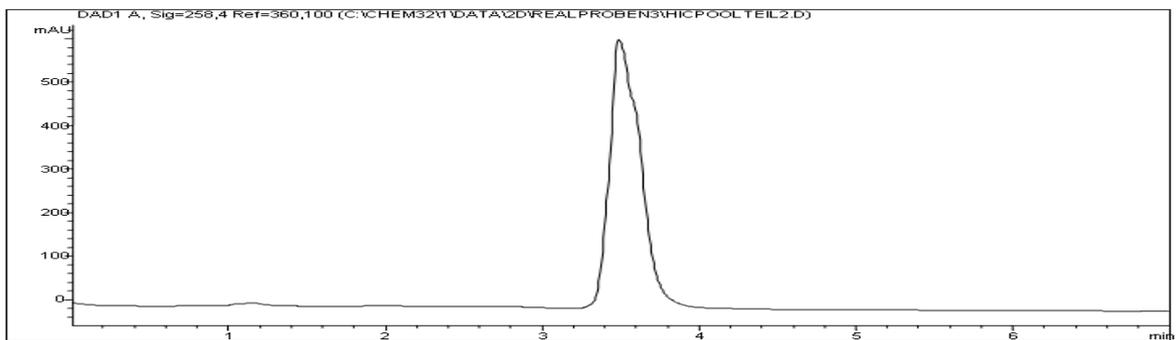


Abbildung 71: 10 µl „HIC-pool“

Tabelle 34: 2DChromatographie (SEC-AEX) mit dem Agilent 1100

Retentionszeit min			
HIC load	HIC load/OC-Form	OC-Form	HIC pool
3,5	3,426	3,177	3,55

Durch einen Vergleich zwischen Chromatogrammen von HIC-pool und HIC-load und entsprechende Standard-Messungen auf SEC-Säule kann man leicht sehen, dass in der zweiten Säule nur Plasmide sich befinden und keine RNAs und Proteine.

Die 2D-Chromatographie wurde später für Dionex-HPLC mit 2 Ventilen und 2 Pumpen geplant. Mit neuem Programm wurde das Druck-Problem auf SEC-Säule (innerhalb 4 Minuten) durch eine Verbindungskapillare auf einer der 2 beteiligten Ventilen behoben.

Die oben gezeigten Ergebnisse demonstrieren allerdings ganz klar, dass das Konzept der 2D-HPLC geeignet ist, um Proteine und RNA vom Plasmid in einer ersten Dimension abzutrennen, sodass eine Störung bei der endgültigen Analytik auf der AEX Säule nicht mehr vorkommen kann.

3.4 Bestimmung der Verwindungszahl der Topoisomeren von ccc-Plasmiden mittels Agarosegelelektrophorese

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, eine Referenz-Methode zu entwickeln, welche es erlaubt, die Anzahl der superhelikalen Verwindungen von Plasmiden zu bestimmen. Mit dieser Methode sollte dann die Verwindungszahl von chromatographisch isolierten einzelnen Topoisomeren zugeordnet werden.

Um die Anzahl der superhelikalen Windungen an ccc-Formen von verschiedenen Größen Plasmiden herauszufinden, trennt man die Topoisomere mittels Agarosegelelektrophorese auf. Man vergleicht die Migration der Topoisomere zu einer Topoisomer-Leiter, die man aus dem selben Plasmid durch Wirkung einer Topoisomerase erhalten hatte. Die Probe pDNA1 (4892 bp) und pDNA 2 (9,9 kbp) werden für diese Studie herangezogen. In diesem experimentellen Teil wurde nach einer Arbeit von W. Keller verfahren, der dieses Verfahren mit der SV40-DNA entwickelte [13]. Anstatt des TAE-Puffers (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) wurde der TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) benutzt, da der angegebene TAE Puffer eine zu geringe Elektrolytkonzentration enthielt, so dass kein durchgehender Stromfluß möglich war.

Enzyme aus der Gruppe der Topoisomerasen sind in der Lage, den topologischen Zustand der DNA zu ändern. Topoisomerasen können torsionalen Stress von supercoiled-DNA abbauen. Mechanistisch erfolgt dies durch Spaltung einer oder der beiden DNA-Stränge. Das resultierende Produkt der Wirkung des Enzyms ist relaxierte DNA mit Verwindungszahl (linking number) Lk° . Das relaxierte Produkt ist äquivalent zu der mittels Ligase geschlossenen oc-Form. Wenn man für diese relaxierte DNA eine Gelelektrophorese durchführt, bekommt man aber eine Serie von Banden. Das passiert aufgrund von thermischer Fluktuation in der DNA Helix während der Topoisomerase Aktivität, was zu einer Mischung an Topoisomeren (DNAs mit unterschiedlichen Lk) führt. Die Energiedifferenz zwischen Plasmidmolekülen mit Lk nahe zu Lk° ist geringer als die thermische Energie bei Raumtemperatur ($\sim kT$ per Molekül oder RT per Mole). So besteht die Probe aus einer Mischung von Topoisomeren, die eine statistische Verteilung von Lk -Werten haben. Die benachbarten Banden auf dem Gel gehören zu den Topoisomeren mit einer Lk -Differenz von eins. Die Verteilung ist normalverteilt oder gaußförmig [14].

Das Enzym Topoisomerase Typ 1 bewirkt, dass die Plasmide in Anwesenheit von Ethidiumbromid (EthBr) in die relaxierte Form überführt werden. Weil der Entspannungsprozess der Plasmide den durch EthBr reduzierten Windungen entsprechend war, werden die entspannten Plasmide nach der Entfernung der Topoisomerase Typ 1 und EthBr wieder bis zum gewissen Grad in natürliche negativ gewickelte Form zurückkehren. Wie viel das Plasmid in jeder Probe nach der Entfernung von EthBr wieder gewickelt wird, hängt von der EthBr-Konzentration in der Probe während des Relaxation-Prozesses ab. So hat man in jeder Probe gewisse Topoisomerenverteilung mit einer bestimmten Anzahl an Verwindungen. Je mehr EthBr in der Probe vorhanden war, desto höher wird die Anzahl der Verwindungen der entstehenden Topoisomeren sein.

Der Effekt von Intercalator kann konkret erklärt werden. Angenommen, dass das Plasmid-Topoisomer in relaxierter Form $Lk=+415$, $Tw=+415$, $Wr\approx 0$ hat. Das

vorhandene EthBr in der Probe verursacht eine Aufdrehung der Topoisomeren, zum Beispiel, für +8 Windungen ($T_w=+407$). Zur Ausgleichung wird das Molekül $W_r \approx +8$ haben. Die Wirkung von Topoisomerase führt zu einem Plasmid mit geänderten strukturellen Eigenschaften (Abnahme der T_w durch EthBr) und so zu einem entspannten Topoisomer mit $L_k=+407$, $T_w=407$ und $W_r \approx 0$. Anschließend wird die Entfernung des EthBr zu einem Anstieg des T_w und der Entstehung einer negative W_r führen. Das heißt, dass das Molekül negative Windungen bekommt: $L_k=+407$, $W_r \approx -6$, $T_w=+413$. [14]

In dem nächsten Schritt wird das im Puffer vorhandene EthBr den Topoisomeren positive Windungen verleihen. Das heißt, man erwartet für jede Probe einen Anstieg in W_r .

3.4.1 Instrumente und Materialien

Proben-Puffer: Tris-HCl (SIGMA, Trizma, 99%, T3253) 10 mM, NaCl (Fluka, 99,5%, 71381) 0,2 M, EDTA-Na₂ (Fluka, 03680) 0,2mM, Dithiothreitol (Aldrich; 15, 046-0) 0,05 mM, Glycerin (Sigma ultra, >99%, G6279) 0,5%, pH 7,9. Es wurde ein 2x-Puffer hergestellt und dieser direkt für eine 1:2 Probenverdünnung benutzt.

Der Laufpuffer TBE (Tris-Borat-EDTA), der aus Tris-HCl 40 mM, Borsäure (Riedel-de Haën, 31146) 5 mM, DinatriumEDTA 1mM, pH 8-9 besteht.

Die Bromphenolblau-Lösung muss auch hergestellt werden. Die Lösung gibt man in die Probe und dadurch werden die Laufbanden sichtbar. Es besteht aus Bromphenolblau (SIGMA, B32269) 0,1%, Glycerin (Sigma ultra, >99%, G6279) 50% und EDTA 50 mM.

Als Marker wird DNA-LADDER, 10 KB (SIGMA D0428-1VL) verwendet.

Die verwendete EthBr-Lösung ist SIGMA E1510, 10 mg/ml.

Die Agarose zur Gel-Vorbereitung ist ein Biozym LE Produkt mit der Art.Nr.840004.

Das Agarosegelelektrophorese-Gerät ist ein Bio-RAD Gerät: „Molekular Imager Gel Doc™ XR+System“ und „Molekular Imager Gel Doc™ XRS+System“.

3.4.2 Die erste Gelelektrophorese für 3 Plasmidgrößen

Als ein Referenz-Gel wird zuerst für verschiedene Plasmid-Proben eine Agarosegelelektrophorese gemacht. Die Plasmide sind pDNA1 (4892 bp), pDNA2 (9900 bp) und pDNA3 (15 kb). Die Vorbereitung der Probe erfolgt wie in Tabelle 35 angegeben. Von jeder Probe wurden 15 µl auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Agarose 1,4% vorbereitet.

Zuerst werden die Proben zum Auftragen vorbereitet.

Tabelle 35: Die unbehandelten Plasmid-Proben für das Referenz-Gel

	Analyt/Plasmid	Isoform	Konzentration µg/ml	Vol. Probe µl	Vol. Wasser µl	Endkonz. µg/ml	DNA- Menge µg
1	DNA-Ladder						
2	pDNA1	final bulk	2840	1	375	7,573	0,11
3	pDNA1	oc (enz.)	50	10	60	8,333	0,13
4	pDNA1	lin	50	10	60	8,333	0,13
5	pDNA1	oc (enz.)+lin	40	4	15	10,667	0,16
6	pDNA1	oc(enz.)- spiked fb	345,19	4	15	92,049	1,38
7	pDNA1	lin-spiked fb	345,19	4	15	92,049	1,38
8	pDNA1	full spike	235,35	4	15	62,76	0,94
9	pDNA2	final bulk	1080	2,5	375	7,2	0,11
10	pDNA2	oc (enz.)	50	10	60	8,333	0,13
11	pDNA2	lin	50	10	60	8,333	0,13
12	pDNA2	oc (enz.) + lin	40	4	15	10,667	0,16
13	pDNA2	full spike	137,67	4	15	36,713	0,55
14	pDNA3	final bulk	670	3,5	375	6,253	0,09
15	pDNA3	oc (enz.)	50	10	60	8,333	0,13
16	pDNA3	lin	50	10	60	8,333	0,13
17	pDNA3	oc(enz.) + lin	40	4	15	10,667	0,16
18	pDNA3	full spike	115,12	4	15	30,698	0,46
19	pDNA1	final bulk - alt	2840	1	375	7,573	0,11
20	DNA-Ladder						

Gelvorbereitung: Zuerst wird die entsprechende Menge von Agarose in einem 500 ml Erlenmeyer-Kolben eingewogen. Dann wird 200 ml 1xTBE Puffer langsam am Kolbenrand entlang hineingegossen. Ohne Schütteln und Schwenken stellt man den Kolben in die Mikrowelle für 2 Minuten bei 900 Watt. Dann wird der Kolben leicht geschwenkt und der Inhalt eine weitere Minute gekocht. Der Kolben muss anschließend auf etwa 40°C (20 min lang) abgekühlt werden. 20 µl Sybr Gold Lösung (Invitrogen S11494 10000x konz. In DMSO) wird dazu gegeben und gut gemischt. Nachdem man den Kamm einsetzt und den Gelrahmen eben einstellt, gießt man die ganze Lösung vorsichtig in die Gelwanne, so dass möglichst keine Luftblasen entstehen (diese können mit Pipettenspitzen weggeschoben werden). Das Gel polymerisiert bei Raumtemperatur aus. Nach dem Entfernen vom Kamm wird das Gel in den Tank gegeben, der mit genügend Puffer befüllt wurde. Die Proben werden in die Taschen pipettiert. Man füllt eventuell Puffer in den Tank nach, damit die Oberfläche des Gels während der ganzen Elektrophorese immer mit Puffer bedeckt ist. Nach der Einstellung der Laufzeit und der Spannung kann man „run“ drücken und die Elektrophorese starten. Die eingestellte Spannung ist 120 V für 6 Stunden.

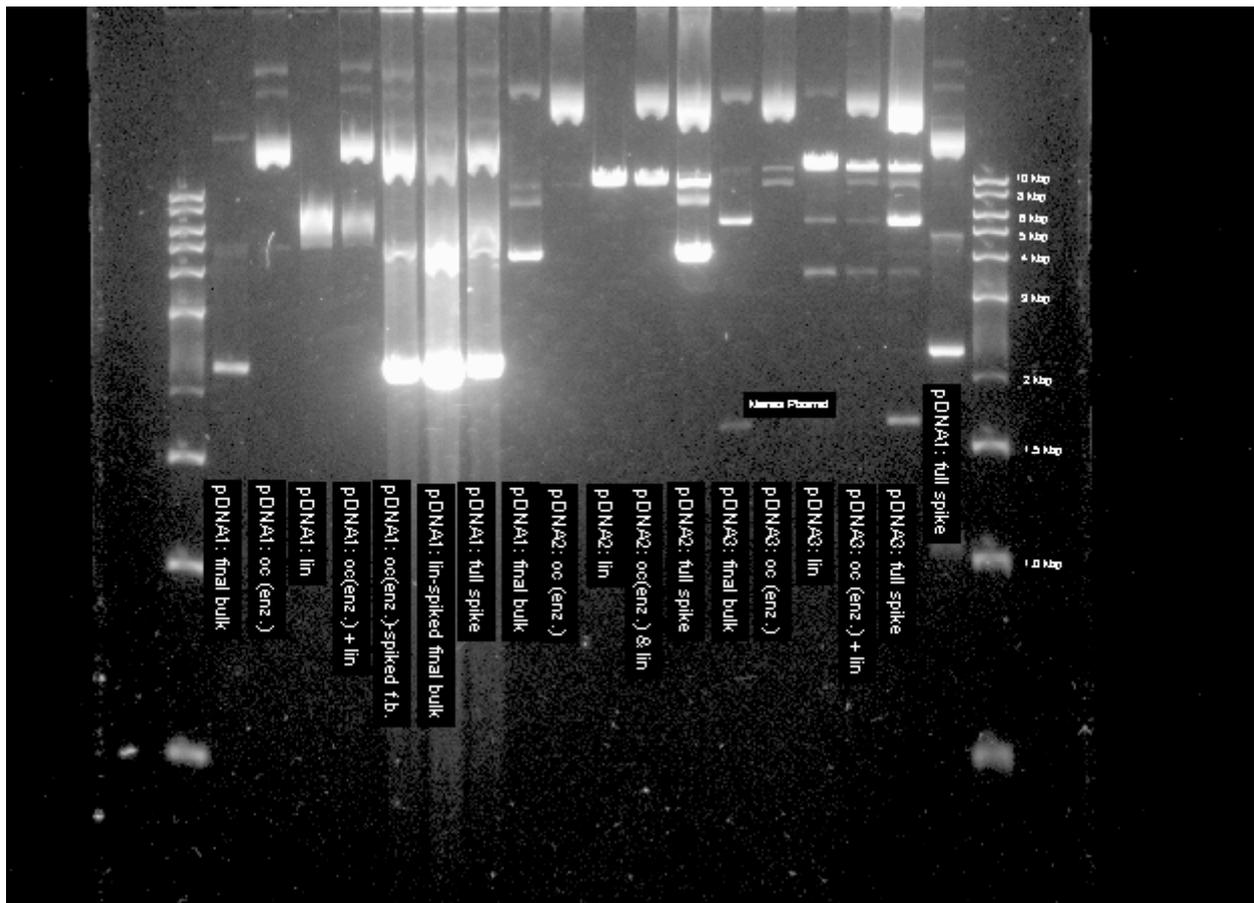


Abbildung 72: Das Referenz-Gel mit verschiedenen Plasmid-Proben

Das Referenz-Gel hilft dabei, die entsprechenden Banden in den folgenden Gelelektrophorese Experimenten zu vergleichen und die Trennungverhalten der Plasmidisofomen für jede Plasmidgröße zu wissen.

Wie es in der Abbildung 72 erscheint, ist die Migrationsstrecke nur für lineare Formen der Basenpaare-Anzahl entsprechend. Die oc-Form ist eine große zirkuläre DNA, die nicht weit wandern kann; und die ccc-Form ist aber auf Grund ihrer kompakten Struktur zu klein, dass sie weiter als ihr entsprechendes DNA-Molekül in dem Ladder wandern kann.

3.4.3 Elektrophorese für Topoisomerase behandelte pDNA1 (4892 bp)-Proben

Um relaxierte Plasmide aus der ccc-Isoform herzustellen, benutzt man das Enzym Topoisomerase 1(SIGMA, from wheat germ, T7428, bei -70°C) 10 U/µl. 1 U von Topoisomerase 1 ist für pGEM90Zf definiert und 4 U Topoisomerase 1 ist für pBR322 (4,36 kb) definiert. Die Funktion des Enzyms wurde bereits erklärt.

Im ersten Versuch hat man für 7,5 µl fb (2,84 µg/µl) 0,5 µl Enzym eingesetzt. Das heißt 5 Units Enzym für 21,3 µg Substrat. Laut Enzymspezifikation soll für 1 µg

Plasmid-DNA mit der Größe ~5 kb 4 Units Enzym eingesetzt werden. Im nächsten Versuch wurde dies korrigiert. 5 Units Enzym wurden mit 1,3 µg Plasmid eingesetzt.

Zusammensetzung der Proben bei der ersten Topoisomerase-Reaktion– „A-Proben“

Tabelle 36: Der erste Versuch(A) für enzymatische Behandlung der Plasmide für einen 50 µl Ansatz. Allerdings ist das Verhältnis Enzym/Substrat 16 mal geringer gewählt worden!

	Probe 1A	Probe 2A	Probe 3A	Probe 4A	Probe 5A	Probe 6A	Probe 7A	Probe 8A	Probe 9A	Probe 10A	Probe 11A
Der Puffer	25 µl										
pDNA1 fb	7,5 µl										
Enzym	0,5 µl										
H2O µl	17	16	15	13	12	11	10	9	7	5	3
EthBr (10 mg/ml) µl	0	1	2	4	5	6	7	8	10	12	14
EtBr Konz. in der Probe M	0	$0,5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$	$7 \cdot 10^{-6}$

Die Proben werden nach der enzymatischen Reaktion mit einer gesättigten Lösung von Phenol in Wasser 30 Minuten bei 37°C extrahiert, damit die Proteine entfernt werden. Danach werden die Proben mit Chloroform bei 37°C extrahiert. Anschließend wird der wässrige Überstand in ein frisches Gefäß pipettiert und für die Analyse verwendet.

Zusammensetzung der Proben bei der zweiten Topoisomerase-Reaktion, „B-Proben“

Bei den-Proben wurde das Verhältnis von Topoisomerase:pDNA richtig gewählt, es gab keine unrelaxierte ccc-Form

Tabelle 37: Die Zusammensetzung in der 50 µl Probe zur enzymatischen Behandlung der Plasmide

	Probe 1B	Probe 2B	Probe 3B	Probe 4B	Probe 5B
Der Puffer	25 µl				
pDNA1 fb(1:16)	7,5 µl				
Das Enzym Topoisomerase	0,5 µl				
H2O µl	17	15	11	9	5
EtBr (10 mg/ml) µl	0	2	6	8	12
EtBr Konz. in der Probe M	0	$1 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$

Die Proben werden nach der enzymatischen Reaktion mit einer gesättigten Lösung von Phenol in Wasser 30 Minuten bei 37°C extrahiert, damit die Proteine entfernt werden. Danach werden die Proben mit Chloroform bei 37°C extrahiert.

Anschließend wird der wässrige Überstand in ein frisches Gefäß pipettiert und für die Analyse verwendet.

Gelvorbereitung für alle folgenden Gele: das ganze Verfahren ist gleich wie im Kapitel 3.4.2 beschrieben mit 2 Ausnahmen: Erstens, das Sybr Gold wird nicht schon vor dem Gießen des Gels in die Gelwanne hinzugefügt, sondern nach der Elektrophorese wird das Gel für 2 Stunden in einer Lösung von 5µl SYBR Gold in 150 ml Wasser geschüttelt. Zweitens: die Elektrophorese erfolgt bei 110 V für 16 Stunden.

Nach der Elektrophorese und Behandlung mit Sybr Gold-Lösung kann man das Gel in die Gelkammer legen und unter UV-Bestrahlung die DNA-Banden sehen und anschließend davon eine Aufnahme speichern.

3.4.3.1 Gel 1, Agarose 1,4%, EthBr 20 µg/l

1 µl von jeder Probe zusammen mit 14 µl Wasser, sowie 5 µl Ladder (Marker) wurden jeweils mit 5µl Bromphenolblau-Puffer gut vermischt. Zu dem Lauf-Puffer, aus dem auch das Gel zubereitet wurde, wurde das entsprechende Volumen einer EthBr-Stocklösung bis zur Konzentration 20 µg/l zugegeben.

Tabelle 38: Die Vorbereitung der A-Proben

	Marker	Die Proben 1A,2A,3A,4A,5A,6A,7A,8A,9A,10A,11A	pDNA1 fb	Fraktion -2	Marker
	5 µl	1 µl	2 µl	15µl	5 µl
Bromphenolblau Lösung µl	5	5	5	5	5
Wasser µl	-	14	13		-

Die Probe mit der Bezeichnung „Fraktion -2“ bezieht sich auf ein Chromatogramm, in dem die ccc-Topoisomere chromatographisch auf der Säule MMP24 unter den unten angegebenen Bedingungen aufgetrennt wurden [15].

Puffer A: 50mM PO₄, pH 7.0

Puffer B: 50mM PO₄, 10% IPA, 0.6M NaCl, pH 7.0

Gradientenmethode: 10 – 60%B in 30min, 60°C, 0.7ml/min

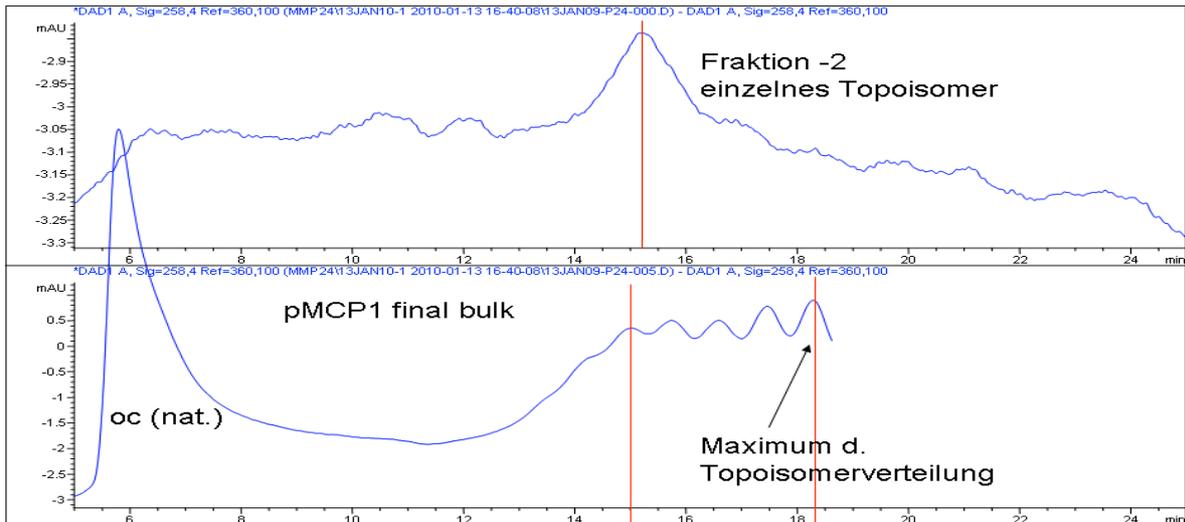


Abbildung 73: Die Herkunft der Fraktion -2 und ihr Zusammenhang mit der ccc-Form im final bulk

Die sogenannte Fraktion „-2“ ist ein einzelnes Topoisomerpräparat, das sich um 4 Windungen vom Verteilungsmaximum der im final bulk vorhandenen ccc-Plasmide unterscheidet. Das Auftragen dieser Probe bietet die Möglichkeit der genauen Bestimmung eines definierten Topoisomers.

Fürs 1,4% Gel wird 2,8 g Agarose in 200 ml Puffer, wie im Kapitel 3.4.3 beschrieben, gelöst.

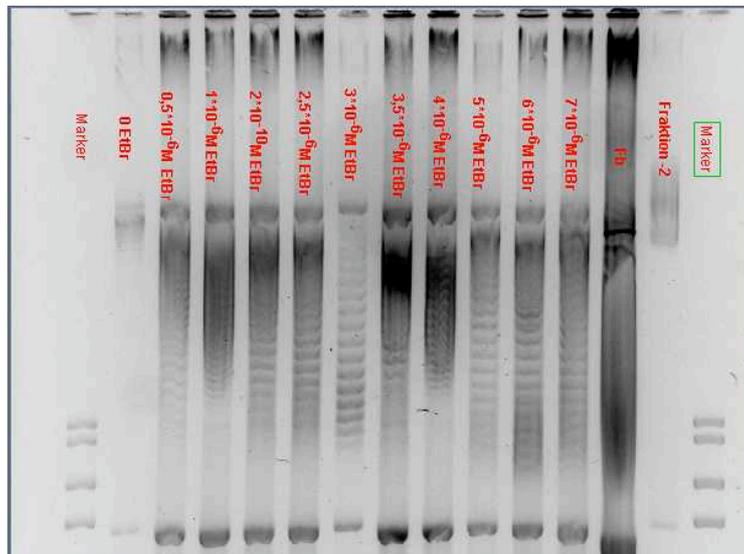


Abbildung 74: Das Gel 1 , Agarose1,4% , EtBr 20 µg/l

3.4.3.2 Gel 2 , Agarose 1,4%, kein EthBr

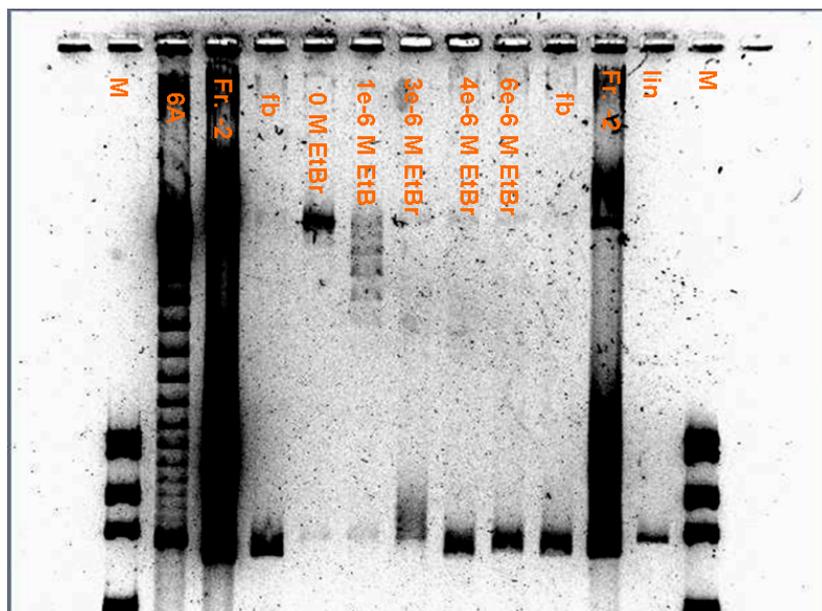
Hier wird das Gel wieder mit 2,8 g Agarose vorbereitet. Der Puffer enthält aber kein EthBr. Die Proben wurden wie in der Tabelle 40 angeführt vorbereitet.

Zu den B-Proben wurde zusätzlich auch die Probe 6A aufgetragen. Die Probe 6A wurde bereits in vorigen Versuchen mit guter Auflösung getrennt und daher kann diese hilfreiche Informationen liefern.

Tabelle 39: pDNA1-Ansätze zum Auftragen auf das Gel 2 (Agarose1,4% , kein EtBr)

	Marker	Probe6A	Fraktion -2	pDNA1 fb 1:376	Die Proben 1B,2B,3B,4B,5B	pDNA1 fb 1:376	pDNA1 lin (1:6)	Marker
	5 µl	1 µl	15 µl	1µl	1 µl	1 µl	1 µl	5 µl
Bromphenolblau Lösung µl	5	5	5	5	5	5	5	5
Wasser µl		14		14	14	14	14	

Abbildung 75: Das Gel 2 , Agarose 1,4% , kein EtBr



Hier sieht man, dass die aufgetragene Menge bei der Fraktion -2 zu hoch, und bei den Proben 1,2,3,4,5,fb zu niedrig war.

3.4.3.3 Gel 3 , Agarose 1,4% , kein EthBr

Um schärfere Banden zu bekommen werden neue Ansätze für die Proben im neuen Experiment vorbereitet.

Tabelle 40: Das Gel 3, Agarose 1,4%, kein EtBr

	Marker	Probe 6A	pDNA1 fb 1:3760	Fraktion -2	Die Proben 1,2,3,4,5	Fraktion -2	pDNA1 fb 1:3760	pDNA1 lin (1:6)	Marker
	5 µl	1 µl	2 µl	15 µl	2,5 µl	15 µl	2 µl	2 µl	5 µl
Bromphenolblau-Lösung µl	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Wasser µl		14	13		12,5		13	14	

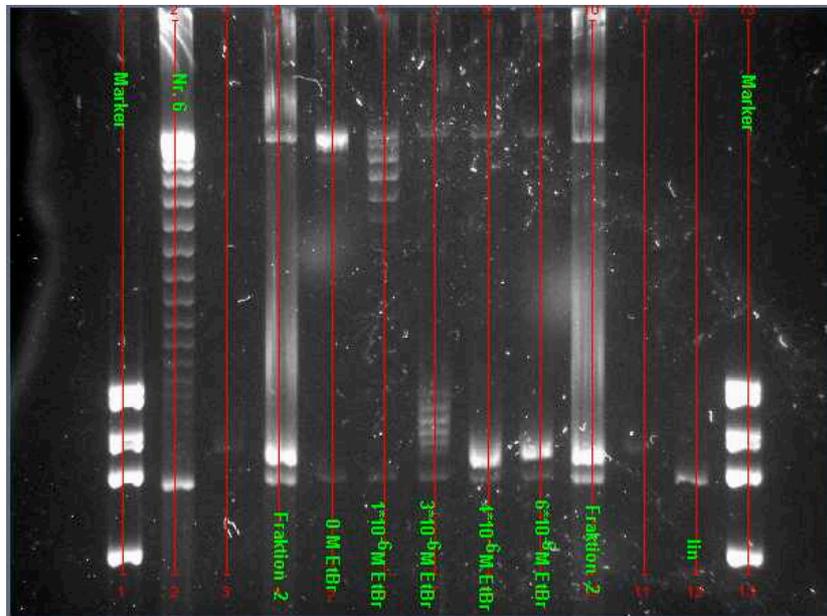


Abbildung 76: Das Gel 3, Agarose 1,4% , kein EtBr

Wie man hier sieht, ist die Probe 6A beim Zählen der Banden zwischen Proben 1e-6 M und 3e-6 M sehr hilfreich.

3.4.3.4 Das Gel 4, Agarose 1,4%, EthBr 10 µg/l

Der Puffer wird diesmal mit 10 µg/l EtBr hergestellt. Aufgrund dessen werden die Vewindungszahlen positiver. Alle Plasmide werden räumlich betrachtet größer, da sich die Ethidiumbromid-Moleküle in die Doppelhelix einschieben.

Tabelle 41: Die Ansätze für das Gel 4

	Marker	pDNA1 fb 1:376	Fraktion -2	Die Proben 1,2,3,4,5	Probe 6A, Fraktion -2 6A1,5µl, Fr. (-2)1,5 µl	pDNA1 fb (1:376)	pDNA1 lin (1:6)	Marker
	5 µl	1 µl	3 µl	2,5 µl		1µl	2 µl	5 µl
Bromphenolblau Lösung µl	5	5	5	5	5	5	5	5
Wasser µl		14	12	12,5	11	14	14	

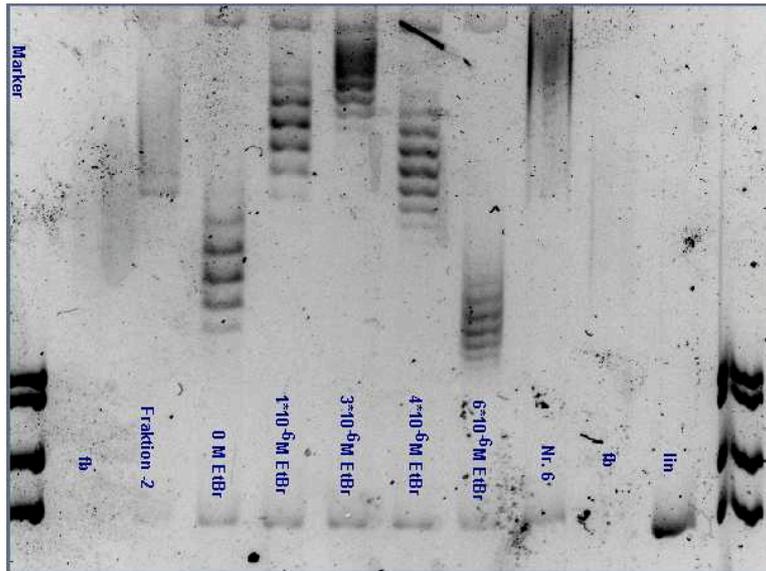


Abbildung 77: Das Gel 4, Agarose 1,4% , EthBr 10 µg/l

Alle Proben sind gegenüber dem vorigen Gel nach oben verschoben, da die Plasmide räumlich anspruchsvoller sind. Man kann ebenfalls die gaußförmige Verteilung der Banden sehen. Die Topoisomere der Probe 3e-6 M besitzen einen optischen Wendepunkt, wo die negativen Windungen im Plasmid durch EtBr-Wirkung exakt ausgeglichen werden. Rechts von dieser Probe sind alle Plasmid-Topoisomere negativ superspiralisiert, auf der linken Seite sind alle Plasmid-Topoisomere positiv superspiralisiert.

3.4.3.5 Gel 5 , Agarose 1,4% , EthBr 5 µg/l

Um weitere direkte Verbindungen zwischen den Topoisomer-Proben zu haben, wird der Puffer mit der Konzentration 5µg/l EtBr vorbereitet.

Tabelle 42: Die Ansätze fürs Gel 5

	Marker	pDNA1 fb 1:376	Fraktion -2	Die proben 1B,2B,3B,4B,5B	Fraktion -2	Probe 6A	pDNA1 lin (1:6)	pDNA1 fb (1:376)	Marker
	5 µl	5 µl	3 µl	2,5 µl	3 µl	1 µl	2 µl	2 µl	5 µl
Bromphenolblau Lösung µl	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Wasser µl		10	12	12,5	11	14	14	13	

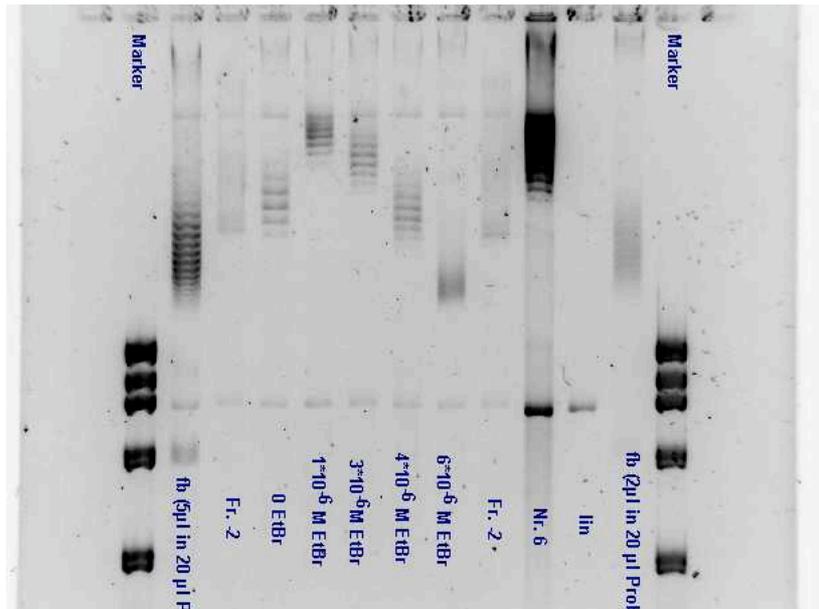


Abbildung 78: Das Gel 5, Agarose 1,4% , EtBr 5 µg/l

Dieses Gel lieferte die Verbindung zwischen 3e-6 M und 4e-6 M.

3.4.3.6 Auswertung

Für die Auswertung der Verwindungszahl für Fraktion -2, die sich vom Maximum der Topoisomerenverteilung im final bulk durch 4 Verwindungen unterscheidet (Abbildung 73), braucht man zuerst einen Null-Marker in der Probe. So ein Marker ist die Probe 0 M EthBr beim Gel ohne EthBr-Zugabe, da hier die Topoisomerase die ccc-Plasmide in eine vollkommen relaxierte Form bringt (0 supercoils). Wenn alle benachbarten Topoisomere im gleichen Drehsinn superspiralisiert sind, sieht man eine gaußförmige Verteilung. In diesem Fall aber gibt es aufgrund der Änderung des Drehsinns der Superspiralisierung nur drei Banden für die Probe 0 M EthBr. In der ersten Bande befinden sich Plasmide ohne Supercoils. Die zweite Bande besteht aus -1 und +1 Supercoils. Die Dritte besteht demnach aus +2 und -2 Supercoils.

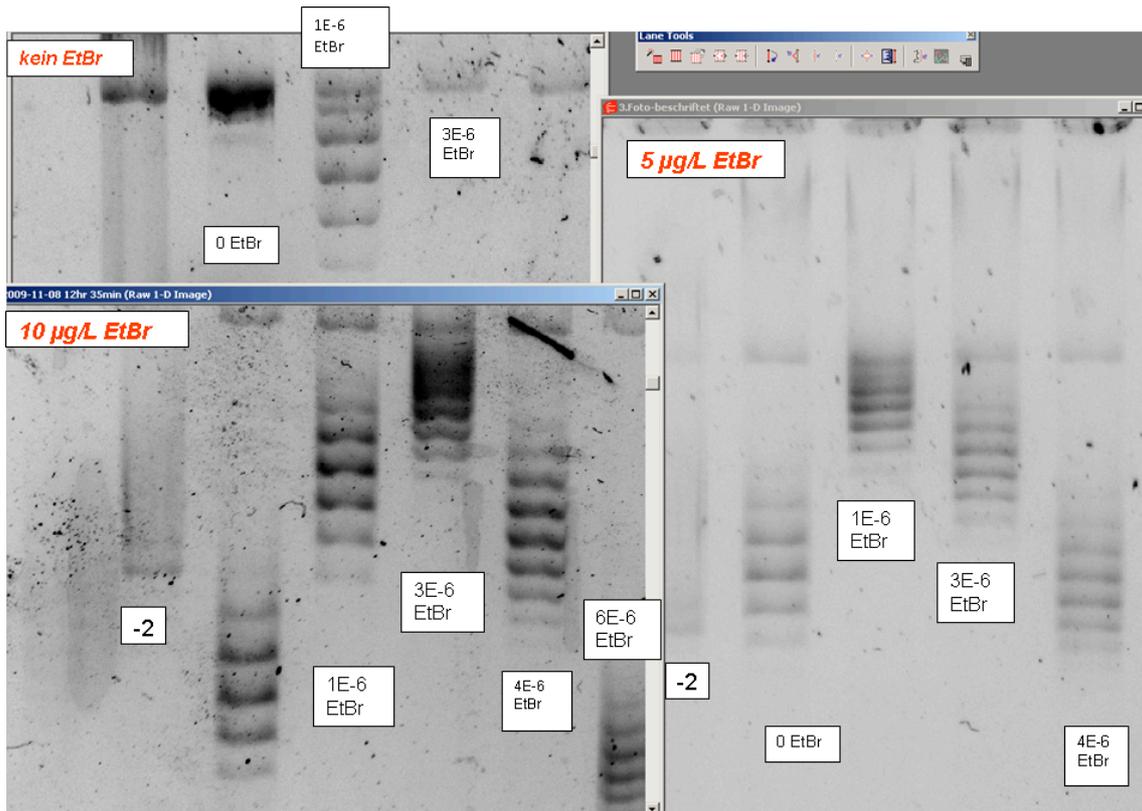


Abbildung 79: Die zur Auswertung benutzten Teile der Gelen

Da die dritte Bande in der Probe 0 EtBr, eine entsprechende Bande (mit gleichem Abstand von dem Start-Punkt) in der Banden-Serie von der Probe mit EtBr $1e-6$ M gemeinsam hat, haben diese Banden den gleichen Grad an Superspiralisierung. Dies ist die erste Verbindung zum Weiterzählen der Banden, die Topoisomere darstellen. Die nacheinander stehenden Banden haben immer einen Verwindungszahl-Unterschied von genau *eins*. So kommt man bis zu der Zahl 6. Um eine Verbindungsbanden zwischen Probe $1e-6$ M und $3e-6$ M zu haben, ist die Probe 6A sehr geeignet.

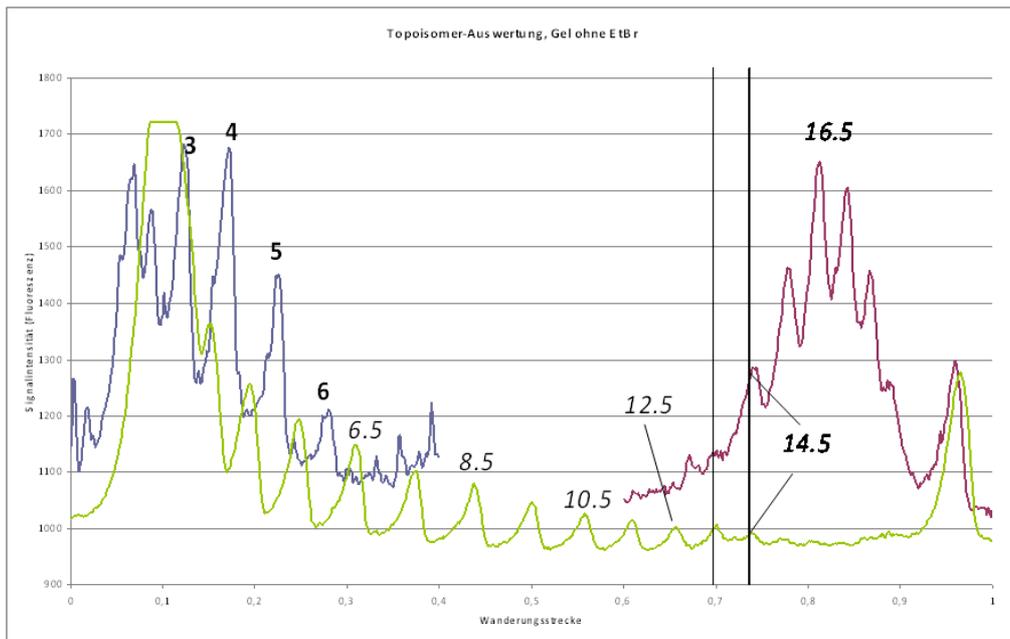


Abbildung 80: Probe 6A (Grün) und Probe 1e-6 (blau), die Probe 3e-6 (Violett). Vom Gel ohne EthBr

Bis jetzt wurden 16,5 Verwindungen mit Hilfe des ersten Gels bis zur Probe 3e-6 M gezählt. Das System zur Auffindung der Verwindungszahl der Fraktion -2 basiert nur auf dem Abzählen der Verwindungszahldifferenzen zwischen den einzelnen Proben der Topoisomerleiter. Das EthBr, das während der Topoisomerasereaktion dabei ist, dient dazu, dass sich die Banden-Verteilungen für einzelne Proben verschieben. Die dadurch entstehenden Banden dienen als Verbindungen zwischen dem Null-Marker und der zu bestimmenden Probe (Fraktion -2). Man muss darauf achten, dass die Banden mit gleicher Migrationsstrecke in zwei verschiedenen Proben auch gleichen Drehsinn der Superspiralisierung aufweisen, da die Richtung positiv oder negativ sein kann. Bei Aufträgen von Proben mit unmittelbar aufeinanderfolgenden Verteilungen ist dies nur der Fall wenn sich zwischen den Proben eine Probe mit dem Wendepunkt befindet.

Zwischen den Proben 3e-6 M und 4e-6 M gibt es gemeinsame Banden (Topoisomere), die man im Gel mit EthBr 5 µg/l sehen kann. Die Probe Fraktion -2 überlappt mit einer Bande von der Probe 4e-6 M.

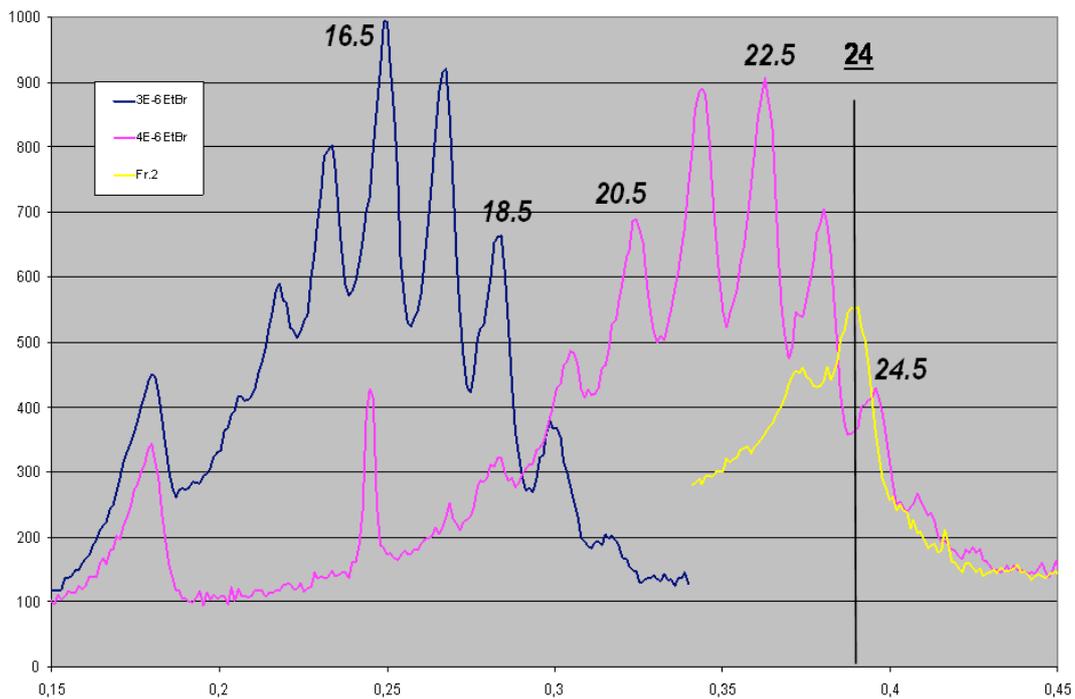


Abbildung 81: Die Auswertungen für das Gel mit 5µg/l EtBr

Durch einzelne Überlagerung von überlappenden Elektropherogrammen kommt man auf eine Verwindungszahl 24 für die Fraktion -2. Da die Fraktion -2 in der Abbildung 75, einen Verwindungszahl-Unterschied zur ccc-Form in Final bulk von vier hat, hat das natürlich vorkommende Plasmid pDNA1 ein Verteilungsmaximum bei 28 Verwindungen.

Damit kann man den Grad der Superspiralisierung berechnen:
 $4892\text{bp} / 10,4 \text{ bp/Wdg} = 470,4$ Windungen im relaxierten Zustand einer B-DNA
 $28 \text{ Supercoils} / 470,4 \text{ Wdg.} = 0,0595$

Der Grad der Superspiralisierung beträgt -6,0 %.

Erfahrungsgemäß wird beim Heranziehen eines jeden weiteren Gels mit einer Unsicherheit von +/- 1 Supercoil gerechnet. Da für die Analyse 3 Gele herangezogen wurden, besitzt die Fraktion „-2“ 24 ± 2 Supercoils.

Im final bulk ist das Verteilungsmaximum dementsprechend mit 28 ± 2 anzugeben, wobei der Grad der Superspiralisierung $-6,0 \pm 0,4\%$ beträgt.

3.4.4 Die Anzahl der Supercoils bei der pDNA2 (9900 bp) ccc-Form

Alle Materialien und das Instrument beschrieben im Kapitel 3.4.3 gelten auch für die Experimente mit pDNA2 (9900 bp).

Das Enzym ist wieder Topoisomerase Typ 1. Das Plasmid pDNA2 ist 9,9 kbp groß, deshalb braucht es doppelt soviel Enzym im Vergleich zum pDNA1. Unter Berücksichtigung der Konzentration von pDNA2 (9900 bp), 1,08 µg/µl, werden 8 Units Enzym für ~9 µg Plasmid eingesetzt.

Tabelle 43: Die enzymatische Behandlung der Plasmide für 50 µl Ansatz

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10	Probe 11
2xPuffer	30 µl										
pDNA2 fb	2 µl										
Enzym	0,8 µl										
H ₂ O µl	17	16	15	13	12	11	10	9	7	5	3
EtBr (10 mg/ml) µl	0	1	2	4	5	6	7	8	10	12	14
EtBr Konz. in der Probe in mol/l	0	0,5*10 ⁻⁶	1*10 ⁻⁶	2*10 ⁻⁶	2,5*10 ⁻⁶	3*10 ⁻⁶	3,5*10 ⁻⁶	4*10 ⁻⁶	5*10 ⁻⁶	6*10 ⁻⁶	7*10 ⁻⁶

Alle Gelvorbereitungen und Elektrophoreseverfahren werden mit gleichen Bedingungen wie im vorigen Abschnitt (3.4.3) durchgeführt.

3.4.4.1 Das Gel 1 , Agarose 0,8% , kein EthBr

Fürs 0,8% Gel, wird 1,6 g Agarose in 200 ml Puffer gelöst. Es ist zu beachten, dass die fb- und lin-Proben im Gel 1 pDNA1 (4892 bp)-Plasmide sind.

Tabelle 44: Die pDNA2 Probe-Vorbereitung fürs Auftragen auf Gel1

	Marker	pDNA2 fb* (1:356)	Die proben 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	pDNA2 linear* (1:6)	Marker
	5 µl	5 µl	2 µl	2µl	5 µl
Bromphenolblau Lösung µl	5	5	5	5	5
Wasser µl	-	10	13	13	-

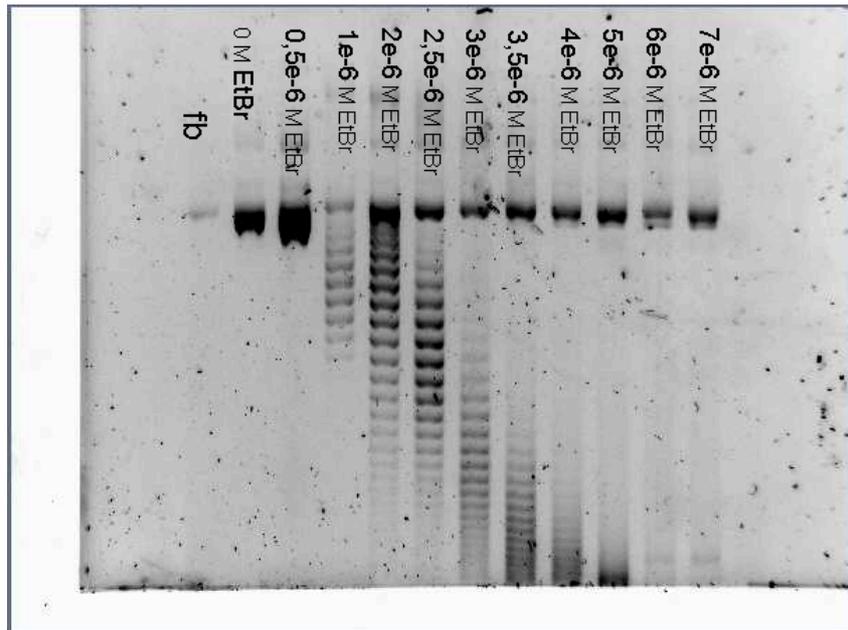


Abbildung 82: Agarose 0,8% , kein EthBr

Durch das Gel 1 kann man von der Probe 0,5e-6 (in der Auswertung p1 genannt) bis zur Probe 3e-6 (p6) mit Hilfe der Verbindungsbanden zwischen Proben alle möglichen Topoisomeren zählen.

Da die Proben so weit wanderten, dass die in den Puffer ankamen, werden im nächsten Versuch durch Zugabe von EthBr, Gele mit kürzeren Lauflängen erwartet.

3.4.4.2 Das Gel 2 , Agarose 0,8% , EtBr 5µg/l

Für das Gel wird wieder 1,6 g Agarose in 200 ml TBE-Puffer gelöst. Der Puffer ist mit EthBr 5 µg/l hergestellt.

Tabelle 45: Die Proben-Vorbereitung zum Auftragen aufs Gel 2

	Marker	pDNA2 fb (1:356)	Die Proben 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	pDNA2 linear (1:6)	Marker
	5 µl	5 µl	2 µl	2µl	5 µl
Bromphenolblau- Lösung µl	5	5	5	5	5
Wasser µl	-	10	13	13	-

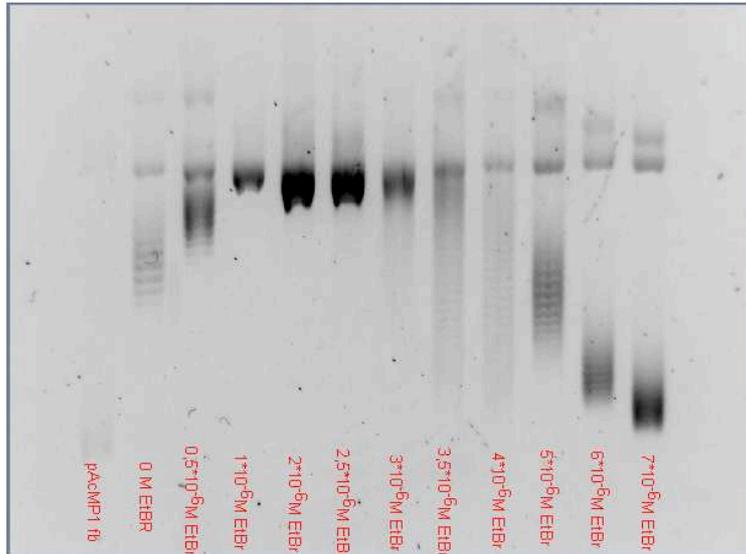


Abbildung 83: Das Gel 0,8% und EtBr 5 µg/l

In diesem Gel werden die Topoisomeren zwischen 4×10^{-6} (in Auswertung p7 genannt) und 5×10^{-6} (p8) gezählt.

3.4.4.3 Das Gel 3 , Agarose 0,6% , 10 µg/l

Für das Gel 0,6% wird 1,2 g Agarose in 200 ml TBE-Puffer gelöst.

Tabelle 46: Das Die Proben-Vorbereitung zum Auftragen aufs Gel 3

	Marker	pDNA2 fb (1:356)	Die Proben 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	pDNA2 linear (1:6)	Marker
	5 µl	5 µl	2 µl	2µl	5 µl
Bromphenolblau Lösung µl	5	5	5	5	5
Wasser µl	-	10	13	13	-

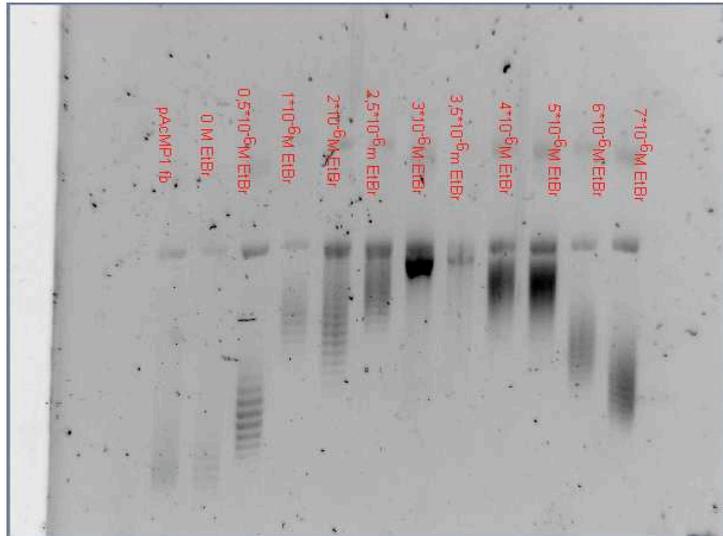


Abbildung 84: Das Gel 0,6%, EthBr 10 µg/l

Das Gel gibt die Möglichkeit, die Topoisomeren zwischen $6e-6$ (in Auswertung p9 genannt) und $7e-6$ (p10) zu zählen .

3.4.4.4 Das Gel 4, Agarose 0,6% , EthBr 13µg/l

Für das Gel 0,6% wird 1,2 g Agarose in 200 ml TBE-Puffer gelöst. Die Proben-Vorbereitung ist in der Tabelle 47 beschrieben.

Tabelle 47: Die Proben-Vorbereitung zum Auftragen aufs Gel 4

	Marker	pDNA2 fb (1:356)	Die proben 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	pDNA2 fb (1:356)	Marker
	5 µl	5 µl	2 µl	5µl	5 µl
Bromphenolblau Lösung µl	5	5	5	5	5
Wasser µl	-	10	13	10	-

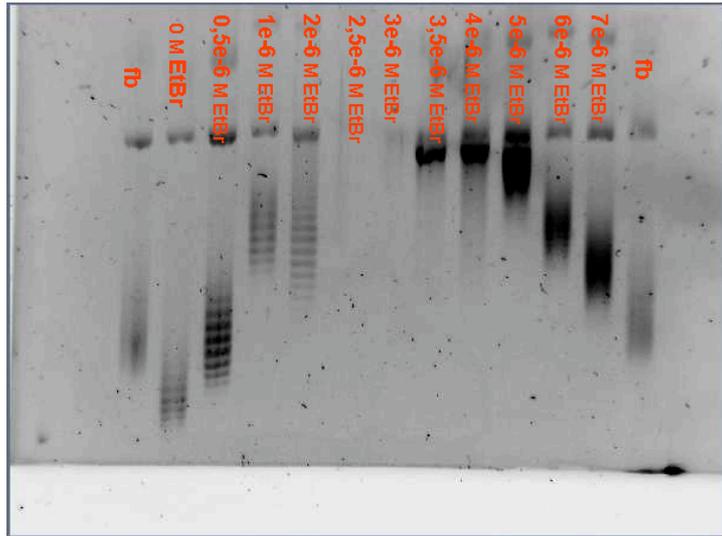


Abbildung 85: Das Gel 0,6%, EthBr 13 µg/l

Die Topisomeren zwischen der Probe 0 EtBr (in Auswertung p0 genannt) bis 1,5e-6 (p1) und zwischen den Proben 7e-6 (p10) und fb werden durch dieses Gel zählbar.

3.4.4.5 Das Gel 5, Agarose 0,8%, EthBr 3 µg/l

Tabelle 48: Das Die Proben-Vorbereitung zum Auftragen aufs Gel 5

	Marker	pDNA2 fb (1:356)	Die proben 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	pDNA2 fb (1:356)	Marker
	5 µl	5 µl	2 µl	5µl	5 µl
Bromphenolblau Lösung µl	5	5	5	5	5
Wasser µl	-	10	13	10	-

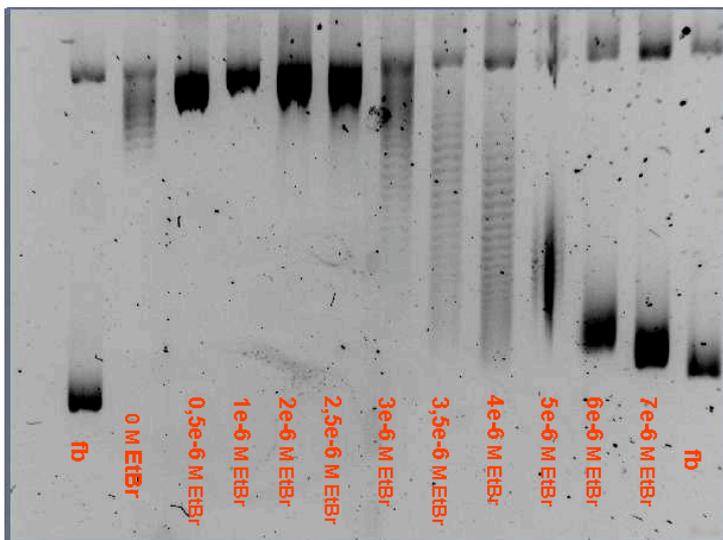


Abbildung 86: Das Gel 0,8% , EthBr 3 µg/l

Das Gel 0,8%, 3 µg/l EtBr gibt die Möglichkeit, die gleichen Topoisomeren zwischen den Proben 3,5e-6 M (in Auswertung p6 genannt) und 4e-6 M (p8) identifiziert zu werden.

3.4.4.6 Die Auswertungen

Bei den folgenden Auswertungen werden die Proben zur Vereinfachung folgendermaßen genannt:

	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
EthBr-Konzentration µg/l	0	5,00E-07	1,00E-06	2,0E-06	2,50E-06	3,0E-06	3,50E-06	4,00E-06	5,00E-06	6,00E-06	7,00E-06

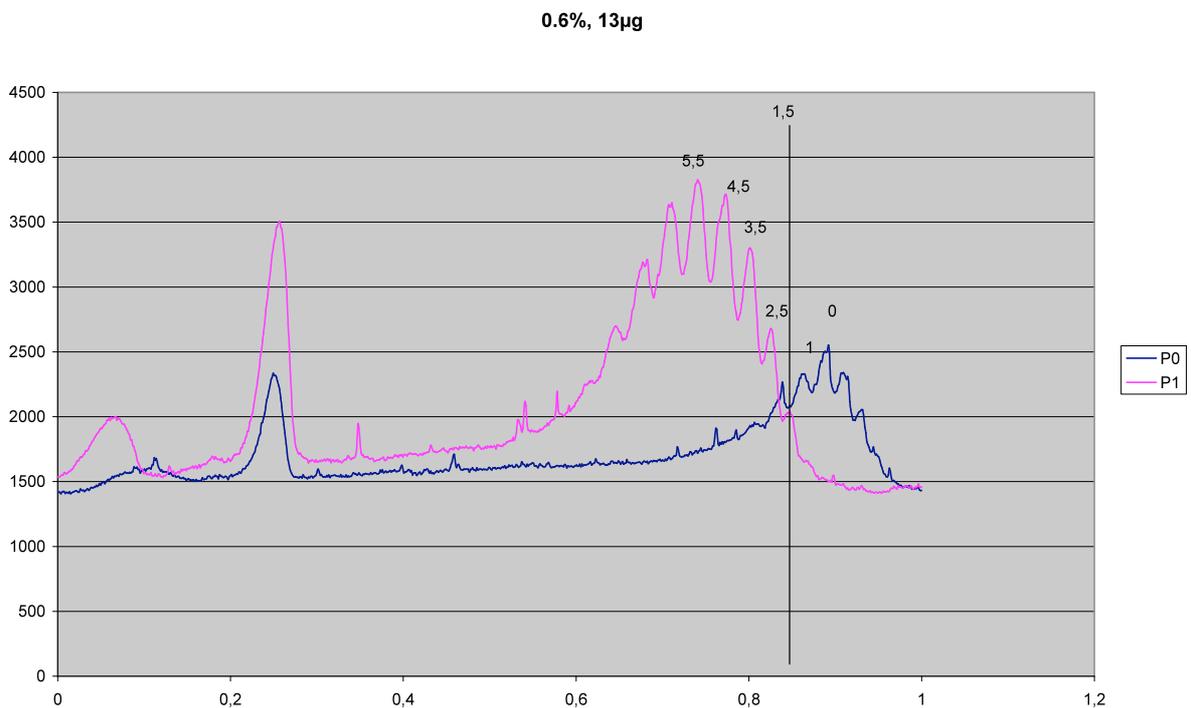


Abbildung 87: Agarose 0,6% , 13 µg/l EthBr

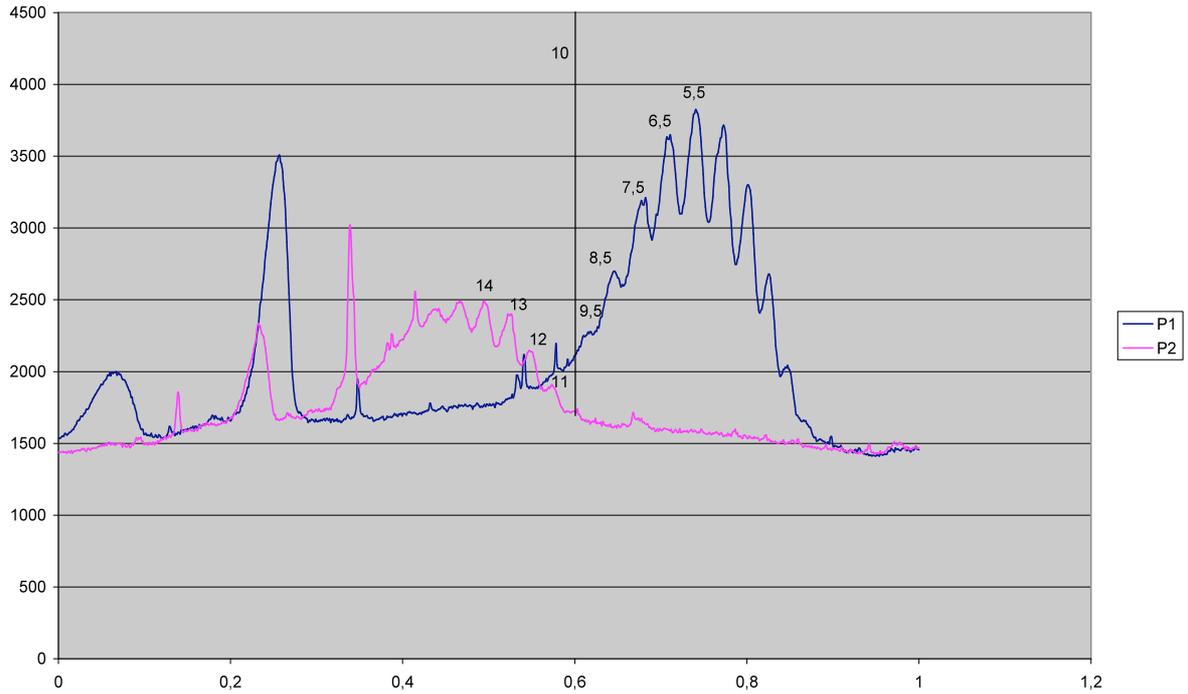


Abbildung 88: Agarose 0,6% , EthBr 13 µg/l

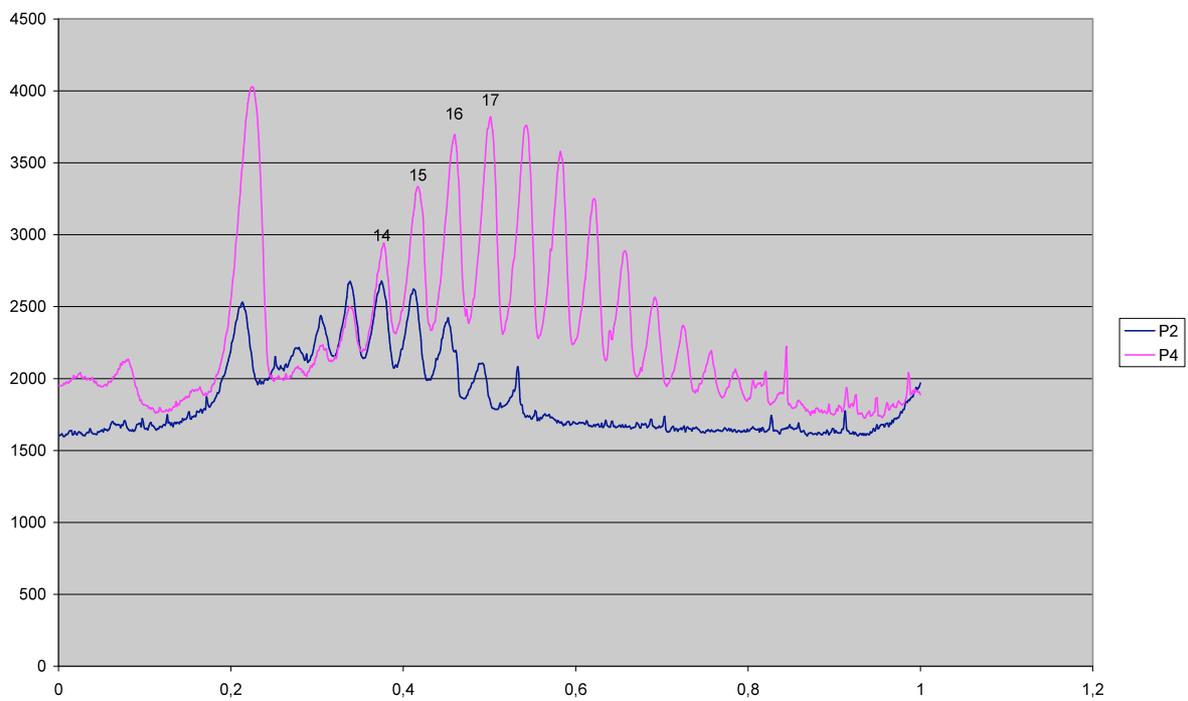


Abbildung 89: Agarose 0,8% , kein EthBr

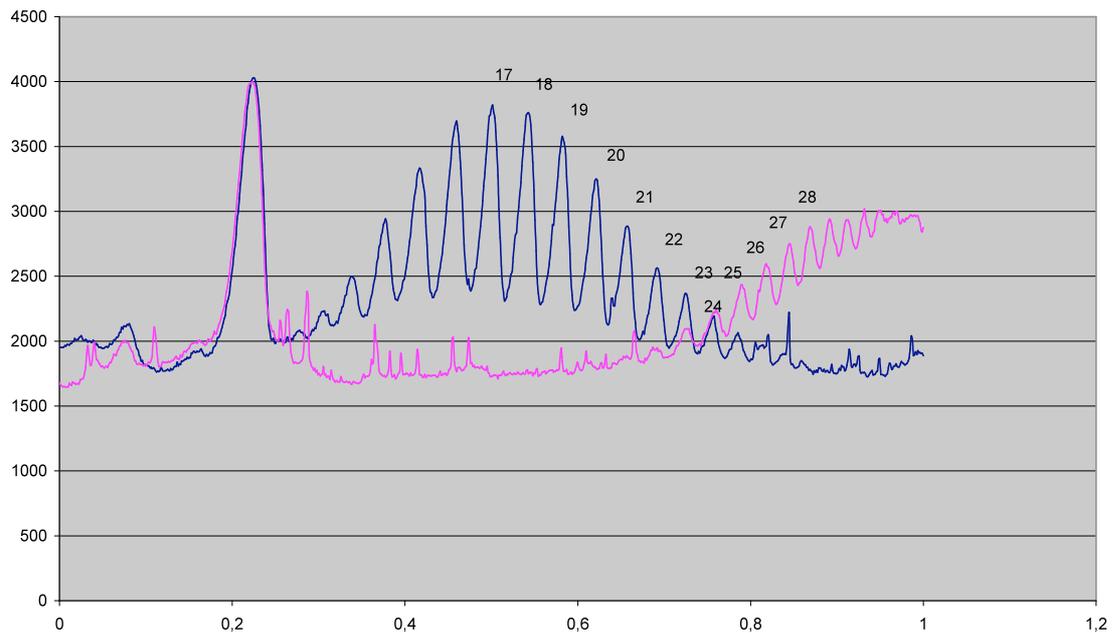


Abbildung 90: Agarose 0,8% , kein EthBr

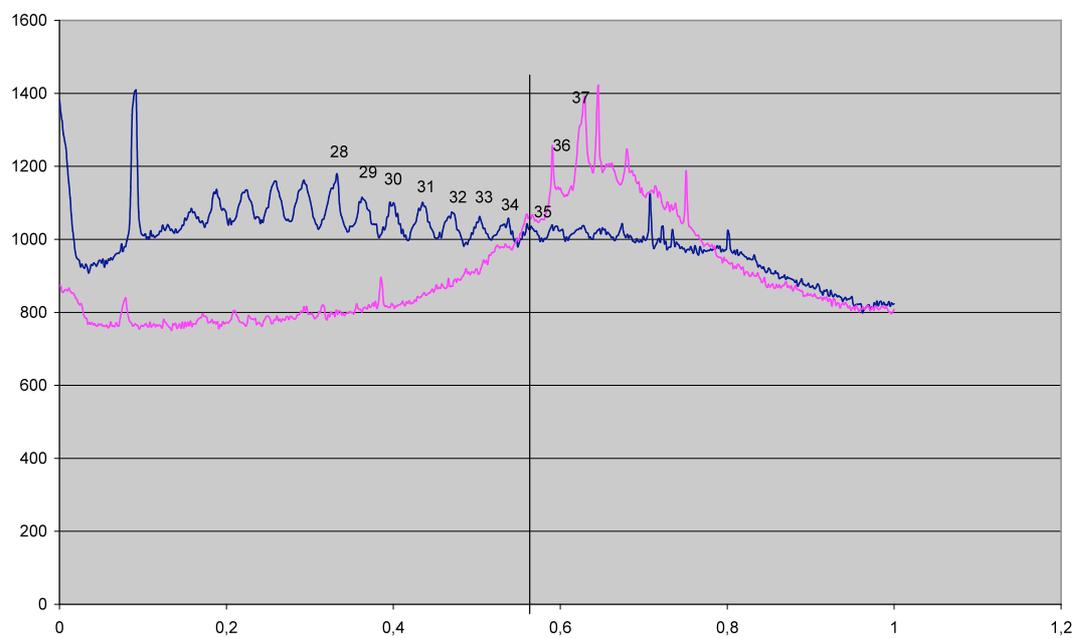


Abbildung 91: Agarose 0,8% , 3 µg/L EthBr

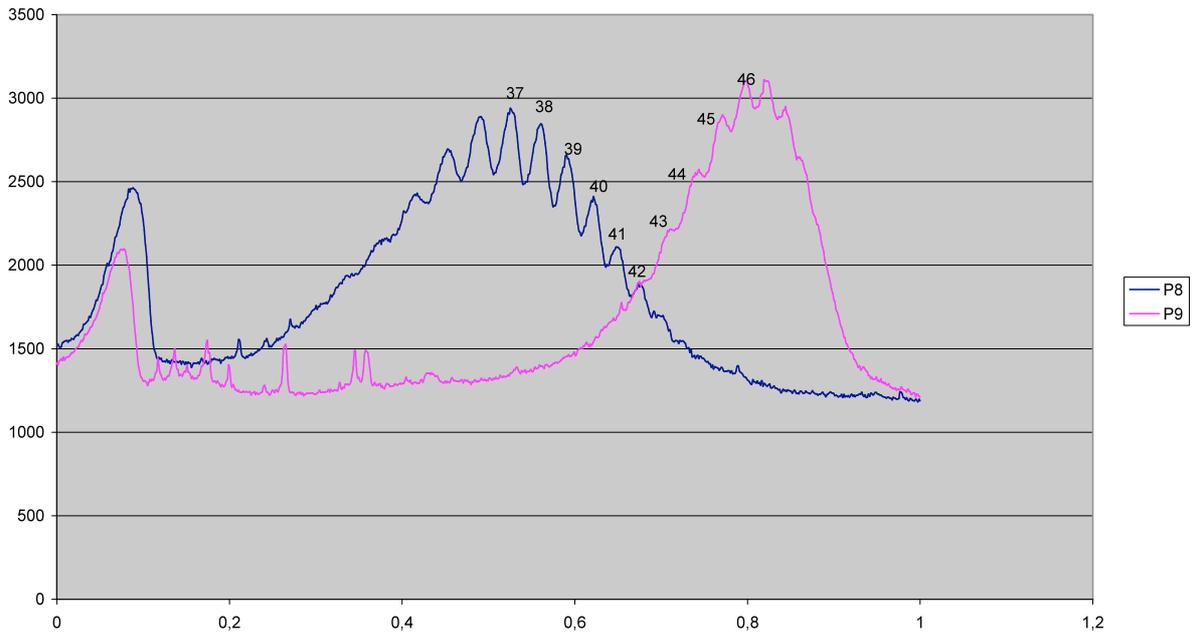


Abbildung 92: Agarose 0,8% , 5 µg/L EthBr

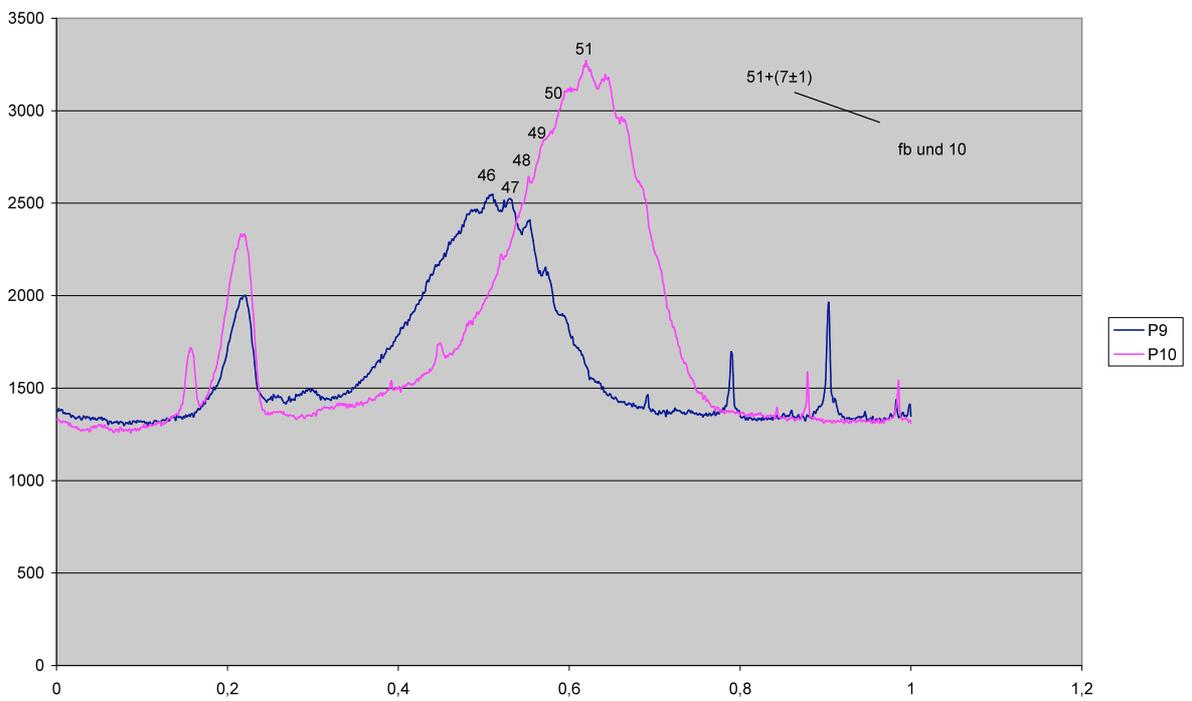


Abbildung 93: Agarose 0,6% , EthBr 10 µg/L

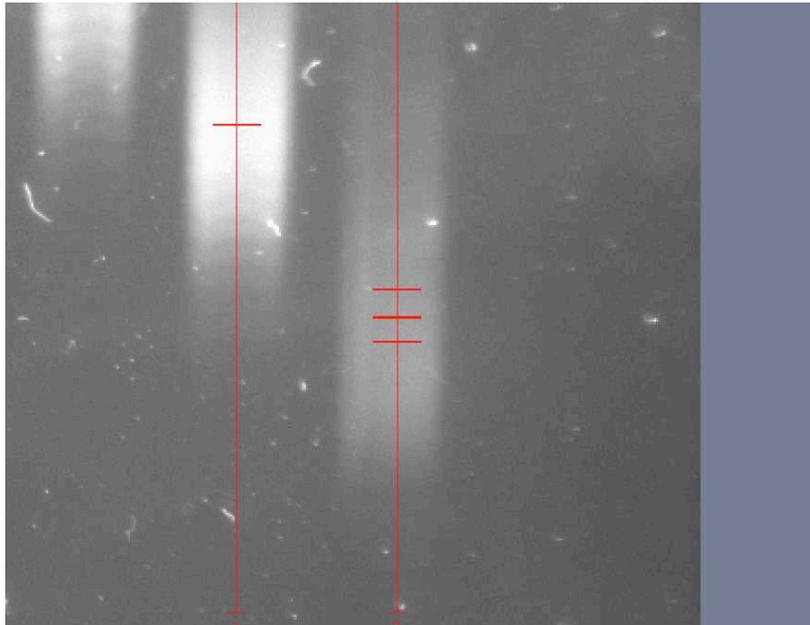


Abbildung 94: Agarose 0,6% , 10 µg/L EthBr. Rechts fb und links Probe 11

Die ccc-Form von Plasmid pDNA2 (9900 bp) hat im final bulk eine gaußförmige Topoisomer-Verteilung, die ein Maximum bei 58 Verwindungen aufweist. Der Grad des Supercoilings beträgt -6,1% und ist damit gleich wie beim pDNA1 (4892 bp)-Plasmid.

$$9900\text{bp} / 10,4 \text{ bp/Wdg.} = 951,9 \text{ Windungen}$$

$$58 \text{ Supercoils} / 951,9 \text{ Wdg.} = 0,0609$$

Für diese Auswertung wurden 7 Gele herangezogen, und damit sind alle Angaben zu Verwindungszahlen mit ± 6 anzugeben

Das Maximum der Verteilung der ccc-Form beträgt 58 ± 6 Supercoils. Der Grad der Superspiralisierung beträgt $-6,1 \pm 0,6 \%$.

Zusammenfassung

Plasmide sind meist cyclische doppelsträngige DNA Moleküle, die hauptsächlich in Bakterien aber auch in Eukaryoten vorkommen. Plasmide besitzen große Bedeutung in der Molekularbiologie und für genetisches Engineering als Vektoren, um DNA in Organismen einzuschleusen. Von zunehmendem Interesse ist auch deren Verwendung für die genetische Vakzinierung.

Für die Produktion von pharmazeutisch geeigneten Plasmid-DNAs, müssen die Plasmid-Endprodukte eine hohe Reinheit (>90%) bzw. Homogenität hinsichtlich ccc-Form („covalently closed circular“ Form, beide DNA-Doppelstränge intakt), welche die aktive Form darstellt, besitzen. Im Gegensatz dazu sind die anderen Isoformen, insbesondere die oc-Form („open-circular“ Form, bei der ein DNA Doppelstrang aufgebrochen ist), die lin-Form („linear“ Form, bei der beide Doppelstränge an der selben Stelle gespalten wurden) sowie multimere Formen der zuvor genannten Isoformen als Verunreinigungen anzusehen. Für den Nachweis dieser Homogenität werden effiziente analytische Methoden benötigt, die eine sehr gute Selektivität bezüglich Auftrennung zwischen den einzelnen Isoformen und eine hohe Wiederfindung aufweisen.

Um eine verbesserte Anionenaustausch (AEX)-Trennmethode für Plasmidisoformen (ccc-, oc- und lin-Form) zu entwickeln, die bessere Selektivität und höhere Wiederfindung liefert, wurden im ersten Teil der Arbeit einige Optimierungsstrategien studiert.

Zuerst wurden Anionenaustausch-Standardmethoden mit DNA-NPR bzw. Genpak-FAX (beides schwache Anionenaustauscher auf Basis von Diethylaminoethyl-Gruppen und 2.5 µm nichtporösem Polymethacrylat-Träger) für drei HPLC-Systeme implementiert, damit man für weitere Experimente ein Maß zum Vergleichen hatte. Durch Variation der Gradientenprofile konnten verbesserte Methoden mit erhöhter Selektivität für die Plasmidisoformen erhalten werden, leider auf Kosten einer etwas längeren Laufzeit. Durch Einsetzen eines flachen Gradienten wird eine bessere Selektivität zwischen lin-Form und ccc-Form festgelegt, während beide durch Standardmethode koeluiieren. Allerdings die längere Laufzeit ist in industrieller Hinsicht weniger erwünscht. Die erfolgte Temperatur-Studie deutete klar darauf hin, dass die Interaktion zwischen Plasmiden und stationärer Phase endothermisch bzw. entropisch dominiert ist.

Als weitere Variable neben Gradientenprofil und Temperatur wurden verschiedene Additive zur mobilen Phase hinsichtlich deren Effekt auf die Trennung der Plasmidisoformen getestet. Als Additive wurden verschiedene Polykationen untersucht. Zum Prüfen, ob die positiv geladenen Amine als Polykationen, die zu einer Kompaktierung von pDNA führen können, in der Lage sind, eine bessere Selektivität für die Plasmidisoformen-Trennung zu liefern, wurden eine Reihe von Experimenten durchgeführt. Triethylentetramin und Spermidin waren die Amine der Wahl. Es wurde bewiesen, dass die Zugabe dieser Amine in die mobile Phase in niedrig millimolaren Konzentration zu einer früheren Elution der Plasmide führen. Eine bessere Selektivität wurde aber durch die Zugabe der Amine nicht erreicht.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Ionenausschluss-Chromatographie für die Trennung der Plasmidisoformen getestet. Die Methode beruht auf Verwendung

von Ionenaustauschern, die die gleiche Ladung aufweisen wie die Analyte, und der Ausnützung von repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen. Die Analyte mit höherer Ladungsdichte werden stärker von der geladenen Oberfläche abgestoßen und stärker von den Poren ausgeschlossen als Analyte mit geringerer Ladungsdichte, für die die Poren partiell zugänglich sind. Als stationäre Phase wurde Kieselgel mit Porendurchmesser 3100 Angstrom ausgewählt, deren Poren für Plasmide zugänglich sein sollten, und mit Sulfopropyl-Resten modifiziert. In mehr oder weniger erfolgreichen Vorversuchen wurde gefunden, dass die repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen (zumindest unter den gewählten Bedingungen) wohl nicht stark genug sind, um eine adäquate Selektivität zwischen den Isoformen zu generieren. Durch Herabsetzung der Inonenstärke hat man versucht, die elektrische Doppelschicht an der Oberfläche der stationären Phase zu verstärken. Bei höherer Ionenstärke hatte man eine spätere Elution für die Plasmide erwartet, da die elektrische Doppelschicht abgeschwächt wird und somit repulsive elektrostatische Wechselwirkungen weniger stark ausgeprägt sind. Dies wurde auch experimentell bestätigt, allerdings ohne nennenswerten Effekt auf die Selektivität. Unter allen durchgeführten Bedingungen wurde die ccc-Form vor den oc- und lin-Formen eluiert, was grundsätzlich mit der Ionenausschluß-Theorie in Einklang steht. Um eine verbesserte Auflösung und Selektivität zu erreichen, soll ein Optimierungsprogramm entworfen werden. Ein kurzer Versuch mit Wasser als mobile Phase zeigte eine mögliche Selektivität zwischen Plasmidisoformen.

In einem anderen Teil der Arbeit mit dem Ziel, Proben aus dem Downstream-Prozess mit anderen Biopolymeren als Störkomponenten, wie Nukleinsäuren und Proteine, online analysieren zu können, wurde eine 2-dimensionale Chromatographie angedacht, damit die Analytik automatisiert ohne zusätzliches Handling wie Filtrieren, Entsalzen und Ankonzentrieren nacheinander ablaufen können. Die verwendeten Proben waren in diesem Teil die Real-Proben („SEC-load“, „SEC-pool“, „HIC-load“, „HIC-pool“, „Lysat“). In der ersten Dimension wurde eine „Size exclusion“ Chromatographie (SEC)-Säule eingesetzt und für die zweite Dimension wurde eine AEX-Säule eingebaut. Zuerst wurden Standardversuche mit der SEC-Säule durchgeführt. Es wurde überprüft, ob Salzkonzentrationsänderung einen Einfluß auf die Trennung und Wiederfindung in der 1. wie auch 2. Dimension hat. Aber es wurde keine nennenswerte negative Auswirkung der verwendeten Salzkonzentration in der SEC (1.Dimension) auf die AEX-Trennung in der 2.Dimension festgestellt.

Ein 2D-Chromatographie-System wurde für HPLC-Agilent 1100 mit 2 Schaltventilen und eine Pumpe als ein Vorversuch etabliert, die ausführlich beschrieben worden ist. Die Ergebnisse zeigen ganz klar, dass das Konzept der 2D-Chromatographie geeignet ist, um Proteine und RNA von Plasmid-Proben in einer ersten Dimension abzutrennen, sodass eine Störung bei der endgültigen Analytik auf der AEX Säule nicht mehr vorkommen kann.

Anschließend wurde im letzten Teil der Arbeit die Anzahl der superhelikalen Verwindungen von zwei Plasmiden durch Agarosegelelektrophorese bestimmt. Die Plasmide pDNA1 5kbp und pDNA 2 10kbp wurden für diese Studie herangezogen. Durch Wirkung des Enzyms Topoisomerase Typ 1 werden die Plasmide von torsionalen Stress der supercoiled-DNA vollkommen befreit. Sollte der Prozess in Anwesenheit von Ethidiumbromid EthBr durchgeführt werden, wird das Plasmid nach der Entfernung des Enzyms eine gewisse Differenz in der superhelikalen

Verwindungszahl im Vergleich mit der ursprünglichen Form aufweisen. Durch eine effektive Auftrennung der nahestehenden Topoisomeren einzelner Proben (Proben mit unterschiedlichen EthBr-Konzentrationen) kann man die Verwindungszahl des Plasmids bestimmen.

Für das Plasmid pDNA 1 5kbp wurde das Maximum der Supercoil-Verteilung der ccc-Form dementsprechend mit 28 ± 2 berechnet und somit der Grad der Superspiralisierung mit $-6,0 \pm 0,4\%$ bestimmt. Für das Plasmid pDNA 2 10kbp hat das Maximum der Verteilung der ccc-Form 58 ± 6 Supercoils und einen Grad der Superspiralisierung von $-6,1 \pm 0,6\%$ ergeben. Für größere Plasmide wird die Bestimmung der Verwindungszahlen aufwändiger.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Trennung verschiedener Plasmid-Formen und zwar Isoformen und Topoisomere beschrieben. Die Trennung dieser verschiedenen Formen ist eine große Herausforderung, da das Ladungs-zu-Masse Verhältnis für diese Makromoleküle nahezu gleich ist. Dies macht die Trennung schwierig und gezielte molekulare Interaktionsmechanismen scheinen notwendig bzw. die erfolgversprechendste Variante zur Auftrennung dieser Biopolymer-Varianten. Weiterführende Studien dazu sind notwendig.

Abbildungsliste

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Plasmids mit Antibiotikaresistenzgenen (1,2) und Replikationsursprung 3	6
Abbildung 2: Die chromosomale DNA (1) und die Plasmid-DNA (2) in einer Bakterienzelle	6
Abbildung 3: Das Plasmid pUC19 mit drei Regionen AMP, ori, lacZ und die Enzym-Schnittstellen	7
Abbildung 4: Plasmidkonformationen im elektronenmikroskopischen Bild.....	8
Abbildung 5: A) Ethidiumbromid (EthBr) ein Interkalator, B) Einlagerung der EthBr-Moleküle zwischen den Basenpaaren verursacht eine gewisse Entspannung in der DNA-Helix.....	9
Abbildung 6: Gelelektrophorese mit Plasmid-DNA (Enzyklopädie Chemgapedia)....	13
Abbildung 7: CGE-Elektropherogramm (Der Lehrstuhl für Fermentationstechnik an der Universität Bielefeld)	14
Abbildung 8: Dionex-HPLC , 3 Läufe mit 3 µl der Probe pDNA1 (4892 bp) fb	16
Abbildung 9: Dionex-HPLC; fb- , oc- und linear-Proben; Die 3 pDNA1-Isoformen....	17
Abbildung 10: Agilent 1200-HPLC, Die AEX-Chromatographie von 3 Plasmidisoformen	18
Abbildung 11: Agilent1100-HPLC,Standard Methode für drei Plasmidosiformen	19
Abbildung 12: Dionex HPLC-Chromatogramm bei unterschiedlichen Temperaturen	20
Abbildung 13: Chromatogramme für Änderung der Flußrate, Säule GenpakFax DNA-NPR (Lab.Nr. 46) , Dionex 3000-HPLC	21
Abbildung 14: Abhängigkeit der Retentionszeit von Flußrate.....	22
Abbildung 15: Elution der pDNA1 fb bei verschiedenen Flußrate auf der Säule Gen Pak Fax (Lab.Nr. 51) und mit dem Agilent-HPLC 1100.....	23
Abbildung 16: Agilent 1100-HPLC, Flußrate-Studie	23
Abbildung 17: Agilent1100-HPLC , Abhängigkeit der Trennung v. final bulk von der Salzkonzentration	25
Abbildung 18: log k vs. Log 1/C.....	26
Abbildung 19: Der Gradient 50-60% B in 9 min.....	27
Abbildung 20: Der Gradient 53-65% B in 9min.....	27

Abbildung 21: Der Gradient 50-65% B in 15 min.....	28
Abbildung 22: Der Gradient 60-65% B in 15 min, bei 35°	29
Abbildung 23: Chromatogramme der Temperaturstudie beim Gradient 55-63% B...30	
Abbildung 24: Temperaturstudie beim Gradient 55-63% mit der Rampe 9 min	31
Abbildung 25: Der Gradient 50-65% B in 15 min.....	33
Abbildung 26: Triethylentetramin.....	34
Abbildung 27: Spermidin	34
Abbildung 28: Tetramin 0,1 mM , klassische Methode , 500 µl/min	35
Abbildung 29: Tetramin 0,2 mM, klassische Methode, 500 µl/min	36
Abbildung 30: Tetramin 0,5 mM, klassische Methode, 500µl/min	36
Abbildung 31: Tetramin 0,6 mM, klassische Methode, 500µl/min	37
Abbildung 32: Tetramin 0,8 mM, klassische Methode, 500µl/min	37
Abbildung 33: Tetramin 1,5 mM, klassische Methode, 500 µl/min	38
Abbildung 34: Tetramin 2mM, klassische Methode, 500 µl/min	39
Abbildung 35: Der Triethylenamin-Einfluss auf die Elution von ccc-Form.....	40
Abbildung 36: Der Triethylenamin-Einfluss auf die Elution der lin-Form	40
Abbildung 37: Der Triethylenamin-Einfluss auf die Elution der oc-Form	41
Abbildung 38: Spermidin 0,01 mM, klassische Methode, 500 µl/min	42
Abbildung 39: Spermidin 0,025 mM, klassische Methode, 500 µl/min	42
Abbildung 40: Spermidin 0,5 mM, klassische Methode, 500 µl/min	43
Abbildung 41: t-Butyl Benzol (t0 Marker).....	45
Abbildung 42: Anilin.....	45
Abbildung 43: Nitrobenzol	45
Abbildung 44: Phenol	45
Abbildung 45: Toluol.....	46
Abbildung 46: Die Flußrate-Studie für pDNA1 final bulk	50
Abbildung 47: Chromatogramm von Uracil-Elution	51

Abbildung 48: Chromatogrammen von Elution der 2 Plasmidisoformen	51
Abbildung 49: Chromatogramm von oc-Form	51
Abbildung 50: Chromatogramm der gespikten Probe	52
Abbildung 51: Isokratisch bei der 10% Puffer B	53
Abbildung 52: : Isokratisch bei der 50% Puffer B	53
Abbildung 53: : Ionenauschlußchromatographie ohne Puffer und Salz (rein wässrig)	54
Abbildung 54: Das Chromatogramm für Lysat-Probe.....	57
Abbildung 55: Das Chromatogramm für die Probe „HIC-load“	57
Abbildung 56: Das Chromatogramm für die Probe „HIC-pool“	57
Abbildung 57: Das Chromatogramm der Probe „SEC-load“	58
Abbildung 58: Das Chromatogramm der Probe „SEC-pool“.....	58
Abbildung 59: Mobile Phase ohne Salz, die Probe Lysat.....	59
Abbildung 60: Mobile Phase ohne Salz, die Probe HIC-Load	59
Abbildung 61: Mobile Phase ohne Salz, die Probe HIC-Pool.....	60
Abbildung 62: Die Mobile Phase ohne Salz, die Probe SEC-Load	60
Abbildung 63: Die mobile Phase ohne Salz, die Probe SEC-pool.....	60
Abbildung 64: Salzeffekt auf SEC-Säule	63
Abbildung 65: Chromatogramm für 1:10 verdünnte RNA-Probe mit SEC- Standardmethode	64
Abbildung 66: Chromatogramm für eine gespikte RNA-SECload(1:1) Probe durch SEC-Standardmethode	64
Abbildung 67: Ein Vorversuch auf AEX-Säule für 2DChromatographie.	65
Abbildung 68: 10 µl HICload/OC-Form(2:1)	68
Abbildung 69: 10 µl OC-Form.....	69
Abbildung 70: 10 µl „HIC-load“	69
Abbildung 71: 10 µl „HIC-pool“	69
Abbildung 72: Das Referenz-Gel mit verschiedenen Plasmid-Proben	74

Abbildung 73: Die Herkunft der Fraktion -2 und ihr Zusammenhang mit der ccc-Form im final bulk.....	77
Abbildung 74: Das Gel 1 , Agarose1,4% , EtBr 20 µg/l	77
Abbildung 75: Das Gel 2 , Agarose 1,4% , kein EtBr	78
Abbildung 76: Das Gel 3, Agarose 1,4% , kein EtBr	79
Abbildung 77: Das Gel 4, Agarose1,4% , EthBr 10 µg/l	80
Abbildung 78: Das Gel 5, Agarose 1,4% , EtBr 5 µg/l	81
Abbildung 79: Die zur Auswertung benutzten Teile der Gelen.....	82
Abbildung 80: Probe 6A (Grün) und Probe 1e-6 (blau), die Probe 3e-6 (Violett). Vom Gel ohne EthBr.....	83
Abbildung 81: Die Auswertungen für das Gel mit 5µg/l EtBr	84
Abbildung 82: Agarose 0,8% , kein EthBr	86
Abbildung 83: Das Gel 0,8% und EtBr 5 µg/l.....	87
Abbildung 84: Das Gel 0,6%, EthBr 10 µg/l.....	88
Abbildung 85: Das Gel 0,6%, EthBr 13 µg/l.....	89
Abbildung 86: Das Gel 0,8% , EthBr 3 µg/l.....	89
Abbildung 87: Agarose 0,6% , 13 µg/l EthBr	90
Abbildung 88: Agarose 0,6% , EthBr 13 µg/l	91
Abbildung 89: Agarose 0,8% , kein EthBr	91
Abbildung 90: Agarose 0,8% , kein EthBr	92
Abbildung 91: Agarose 0,8% , 3 µg/L EthBr.....	92
Abbildung 92: Agarose 0,8% , 5 µg/L EthBr.....	93
Abbildung 93: Agarose 0,6% , EthBr 10 µg/L	93
Abbildung 94: Agarose 0,6% , 10 µg/L EthBr. Rechts fb und links Probe 11	94

Literaturliste

1. Urthaler, J.; Buchinger, W.; Necina, R.; ACTA BIOCHIMICA POLONICA; 2005; Vol. 52; 703-711.
2. Schleef, M.; Plasmide for Therapy and vaccination, WILEY-VCH Verlag; 2001; The Biology of plasmids und Structures of plasmid DNA.
3. Lottspeich, F; Engels, Joachim W.; Bioanalytik; Spektrum Akad. Verlag; 2009; Nukleinsäureanalytik.
4. Bates, A.D.; Maxwell, A.; DNA TOPOLOGY, OXFORD university press; 2005; DNA structure, DNA supercoiling.
5. Bjornsti, M.; Osheroff, N.; DNA Topoisomerase Protocols-DNA Topology and Enzymes; HUMANA PRESS; 1999; Volume 94; Introduction to DNA Topoisomerases, Resolution of DNA Molecules by one dimensional Agarose-Gel Electrophoresis.
6. Smith, C.; DePrince, R.; Dackor, J.; Weigl, D.; Griffith, J.; Persmark, M.; JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B; 2007; 15175.
7. Glod, B.; NEUROCHEMICAL RESEARCH, 1997; Vol. 22; No.10; 1237-1248.
8. Schmidt, T.; Fries, K.; Schleef, M.; Voss, C.; Flaschel, E.; ANALYTICAL BIOCHEMISTRY; 1999; 274; 235-240.
9. Giacomoni, P.; Journal of Photochemistry Photobiology B; 1995; Biology 29; 83-85.
10. Sykfont Snygg, a.; Hung, M.; Elmroth, S.; JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY;2007; 101; 1153-1164
11. Nogueira, R.; Lämmerhofer, M.; Maier, N.M.; Lindner, W.; ANALYTICA CHIMICA ACTA; 2005; 533; 179-183.
12. Middaugh, C.R.; Evans, R.K.; Montgomery, D.L.; Casimiro, D.R.; JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES; 1998; Vol. 87; No. 2.
13. Keller, W.; BIOCHEMISTRY; 1975; Vol. 72; No. 12; 4876-4880.
14. Bates, A.D.; Maxwell, A.; DNA TOPOLOGY, OXFORD university press; 2005; DNA structure, DNA supercoiling.
15. Mag. M. Mahut, Dissertation 2010.
16. Stadler, J.; Lemmens, R.; Nyhammer, T.; THE JOURNAL OF GENE MEDICINE; 2004; 6: 54-66.
17. Skoog, D.A.; Leary, J.J.; Instrumentelle Analytik; Springer Verlag

Lebenslauf

Name: Parisa Ghazidezfuli
Geburtsdatum: 07.06.1972
Geburtsort: Iran
Wohnhaft: Rosasgasse 36/2/3, 1120 Wien

1978-1990	Grundschule und Gymnasium
1991-1996	Studium der Angewandten Chemie an der staatlichen Universität in Teheran
1997-1998	Praktikum am Institute of Standards & Industrial Research of Iran
1998-2003	Arbeit beim Forschungszentrum des National-Museums (Identifizierung der Antikproben) Chemie-Lehrerin
2004-2008	Chemie Bakkalaureatsstudium an der Universität Wien
2008-2010	Chemie Masterstudium an der Universität Wien