

Untersuchungen zum inneren Transport bei der
Proteinadsorption an poröse Medien mittels
konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie

**Adsorption von Rinderserumalbumin (BSA) und
Immunglobulin G (IgG) an den porösen Kationentauscher
SP-Sepharose FF**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Thomas Linden
aus Köln

Köln, 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der **Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Referentin: Prof. Dr. M.-R. Kula

Korreferenten: Prof. Dr. H. Weiss
Prof. Dr. E. Flaschel

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2001

Diese Dissertation wird u. a. in elektronischer Form auf dem WWW-Server der Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf veröffentlicht:

www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2001/linden.html

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Frau Prof. Dr. M.-R. Kula und Herrn Priv. Doz. Dr. Jörg Thömmes angefertigt. Ein Teil der experimentellen Arbeiten wurde bei der Forschungs- und Entwicklungsabteilung von Amersham Pharmacia Biotech in Uppsala, Schweden durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Prof. Dr. M.-R. Kula für die freundliche Aufnahme an Ihrem Institut und Übernahme des Hauptreferates. Herrn Prof. Dr. Weiss und Herrn Prof. Dr. Flaschel für die Übernahme des ersten und zweiten Korefererates.

Herrn PD Dr. Jörg Thömmes für die intensive Betreuung und der Arbeitsgruppe „Down Stream Processing“ für die stete Diskussionsbereitschaft. Jörg, das war wirklich eine supergute Zusammenarbeit. Herrn Markus Halfar für die tatkräftige Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten und Beistand in guten wie auch schlechten Tagen. Markus, unsere nächtlichen Streifzüge durch das „Jülicher Nachtleben“ werde ich nie vergessen.

Frau Barbara Jantsch, Herrn Thorsten Rosenbaum und Herrn Dipl.-Ing (FH) Franz Nellen für die Unterstützung im Labor und bei Programmierarbeiten.

Meinem Squashpartner Herrn Dr.-Ing. Jürgen Hubbuch für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Herrn Dipl.-Ing Jochen Brenneisen von der Universität Kaiserslautern für die Unterstützung bei der Aufnahme von Titrationskurven.

Den Herren Anders Ljunglöf, Dr. Karol Lacki und Dr. Lars Hagel von der Forschungs- und Entwicklungsabteilung von Amersham Pharmacia Biotech in Uppsala, Schweden für die sehr gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft.

Frau Dipl. Biol. Mara Bönitz, Frau Dipl. Biol. Petra Heim und Herrn Dipl. Biol. Shukry Naamnieh für schöne Tage und Nächte nicht nur im Institut.

Herrn Rainer Bauszat im Rahmen der Arbeit für die Unterstützung bei der Erstellung des Layouts und privat für eine lange Freundschaft.

Den Fussballern vom „FC Flying Albatros“, den Kegelbrüdern der „Kegelfamily“, meinen Freunden und Bekannten dafür, dass sie mich in dieser Zeit ertragen haben.

Meiner Freundin Frau Dipl. Chem. Nadja Nettelstroth für Ihren Beistand in guten und in schlechten Zeiten

Meiner Familie für weit mehr.

Köln, 2001

I Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie zur Bestimmung von Prozessparametern	1
1.2 Zielsetzung	4
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
2.1 Die Modellproteine und ihre Eigenschaften.....	5
2.1.1 <i>Rinderserumalbumin (BSA)</i>	5
2.1.2 <i>Immunglobulin G (IgG)</i>	6
2.1.3 <i>Proteintitration</i>	8
2.2 poröse stationäre Phasen (Struktur der Agarose).....	10
2.3 Adsorption und Adsorptionsgleichgewichte.....	12
2.3.1 <i>Grundbegriffe der Adsorption</i>	12
2.3.2 <i>Ionenaustauschchromatographie</i>	13
2.3.3 <i>Thermodynamik der Adsorption (Adsorptionsisothermen)</i>	14
2.3.3.1 Allgemeine Beschreibung	14
2.3.3.2 Adsorptionsisothermenmodell nach Langmuir.....	15
2.3.3.3 „Steric-Mass-Action“-Adsorptionsisothermenmodell	17
2.4 Adsorptionskinetik und Transport in poröse Medien	18
2.4.1 <i>Allgemein</i>	18
2.4.2 <i>Triebkräfte</i>	18
2.4.3 <i>Stofftransportwiderstände</i>	19
2.4.4 <i>Innerer Transportmechanismus durch Porendiffusion</i>	22
2.4.5 <i>Innerer Transportmechanismus durch Oberflächendiffusion</i>	24
2.4.6 <i>Bestimmung von Transportkoeffizienten</i>	25
2.4.6.1 Bestimmungsprinzipien	25
2.4.6.2 „Shrinking Core“ Adsorptionsmodell.....	28
2.4.6.3 „Homogeneous Diffusion“ Adsorptionsmodell	30
2.5 Fluoreszenz und Konfokale Laser Raster Mikroskopie	31
2.5.1 <i>Physik der Fluoreszenz und Desaktivierungsprozesse</i>	31
2.5.2 <i>Fluoreszenzfarbstoffe</i>	37
2.5.3 <i>Fluoreszenzspektroskopie und limitierende Faktoren</i>	37
2.5.3.1 Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers	37
2.5.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der messbaren Fluoreszenzintensität	38

2.5.4	<i>Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie</i>	40
2.5.4.1	Komponenten eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops.....	40
2.5.4.2	Prinzipien der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie	40
2.5.4.3	Parallele Detektion mehrerer Fluorophore.....	42
2.5.4.4	Laterale und axiale Auflösung	43
2.5.5	<i>Informationsgehalt der Konfokalbilder poröser Adsorberpartikel</i>	45
2.5.5.1	Konfokalbilder und Fluoreszenzintensitätsprofile.....	45
2.5.5.2	Auswertung der Intensitätsprofile	47
2.5.6	<i>Stand der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie in der Biotechnologie und Materialforschung</i>	49
3.	MATERIAL UND METHODEN	53
3.1	Geräte und Gebrauchsartikel.....	53
3.2	Chemikalien und Lösungen	54
3.2.1	<i>Chemikalien</i>	54
3.2.2	<i>Lösungen und Puffer</i>	55
3.3	Allgemeine biochemische Charakterisierungsmethoden.....	56
3.3.1	<i>Bestimmung der isoelektrischen Punkte durch isoelektrische Fokussierung (IEF) im Agarosegel</i>	56
3.3.2	<i>Reinheitskontrolle durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Silberfärbung</i>	57
3.3.3	<i>Bestimmung der K_{av}-Werte und des Molekulargewichts mittels kalibrierter Gelpermeationschromatographie</i>	59
3.3.4	<i>Bestimmung des Molekulargewichts durch Massenspektroskopie</i>	60
3.3.5	<i>Konzentrationsbestimmungen für Proteine</i>	61
3.3.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV/VIS-Spektroskopie.....	61
3.3.5.2	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford	62
3.3.5.3	Bestimmung der IgG2a-Antikörperkonzentration mittels kalibrierter HPLC-Analytik (High Performance Liquid Chromatography).....	63
3.3.6	<i>Bestimmung einer charakteristischen Retentionszeit durch HPLC-Elutionsstudien im linearen Salzgradienten</i>	64
3.4	Proteine und Proteinaufarbeitung	65
3.4.1	<i>Proteine</i>	65
3.4.2	<i>Aufarbeitung eines monoklonalen IgG2a Antikörpers aus Hybridomaüberstand</i>	66

3.5	Fluoreszenzfarbstoffe und Proteinmarkierung	69
3.5.1	<i>Fluoreszenzfarbstoffe</i>	69
3.5.2	<i>Proteinmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen</i>	70
3.6	Konfokale Messtechnik und Methoden	71
3.6.1	<i>Fluoreszenzspektroskopische Analyse der Proteinadsorption</i>	71
3.6.1.1	Konfokalmikroskope und Fluoreszenzspektrometer	71
3.6.1.2	Messtechnik und Quasi-Simultane Detektion verschiedener Farbstoffe	72
3.6.2	<i>Intensitätsexperimente</i>	74
3.6.3	<i>Batchadsorptionskinetiken im Rührreaktor</i>	76
3.6.3.1	Prinzip	76
3.6.3.2	Einkomponentenadsorption	77
3.6.3.3	Zweikomponentenadsorption im Acetatpuffersystem	78
3.6.3.4	Zweikomponentenadsorption im Hybridomaüberstand	78
3.6.4	<i>Multicoloranalyse der Proteinadsorption</i>	79
3.6.4.1	Prinzip	79
3.6.4.2	Experimentelle Durchführung	80
3.6.5	<i>Auswertung der experimentellen Daten</i>	82
3.6.5.1	Ermittlung der relativen Kapazität Q_{rel} aus der Partikelphase	82
3.6.5.2	Ermittlung der absoluten Kapazität $Q_{abs}(t)$ aus der Flüssigphase	84
3.6.5.3	Ermittlung einer charakteristischen Adsorptionsrate $AUR_{300}(D)$	84
3.7	Adsorptionsisothermen	86
3.7.1	<i>Versuchsprinzip</i>	86
3.7.2	<i>Herstellung der „Adsorberplaques“ mit einem definierten Volumen</i>	86
3.7.3	<i>Einkomponentenadsorption monoklonaler Antikörper oder BSA</i>	87
3.7.4	<i>Zweikomponentenadsorption monoklonaler Antikörper und BSA</i>	88
3.8	Proteintitration	89
4.	EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE	91
4.1	Validierung des experimentellen Systems	91
4.1.1	<i>Biochemische- und chromatographische Charakterisierung der Proteinkonjugate</i>	91
4.1.1.1	Problematik	91
4.1.1.2	Vergleich der isoelektrischen Punkte (Isoelektrische Fokussierung)	92
4.1.1.3	Vergleich der K_{av} -Werte und des Molekulargewichts M_w (Gelpermeationschromatographie)	93
4.1.1.4	Vergleich der charakteristischen Retentionszeiten R_t (Ionenaustauschchromatographie)	95

4.1.2	<i>Optische Charakterisierung der Fluoreszenzfarbstoffe und Proteinkonjugate</i>	96
4.1.2.1	Problematik	96
4.1.2.2	Spektrale Eigenschaften der Fluorophore bei pH 5,0	97
4.1.2.3	Einfluss der Adsorbermatrix auf die spektralen Eigenschaften	98
4.1.2.4	Einfluss der Gegenwart anderer Fluorophore (selektive Detektion)	99
4.2	Intensitätsexperimente und Konzentrationsabhängigkeit	103
4.2.1	Problematik	103
4.2.2	<i>Abhängigkeit der relativen Kapazität Q_{rel} von der Fluorophorkonzentration im Adsorberpartikel</i>	105
4.3	Adsorption von Rinderserumalbumin an SP-Sepharose FF	111
4.3.1	Problematik	111
4.3.2	<i>Adsorptionskinetik von Rinderserumalbumin (BSA) im Rührreaktor</i>	112
4.3.2.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik von BSA	112
4.3.2.2	Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorptionskinetik von BSA	118
4.3.2.3	Kalibrierung der Einkomponentenadsorptionen von BSA	121
4.3.3	<i>Adsorptionsgleichgewichte BSA (Isothermen)</i>	122
4.3.3.1	Adsorptionsgleichgewichte von BSA an SP-Sepharose FF	122
4.3.4	<i>Gegenüberstellung und Zusammenfassung der BSA-Daten</i>	127
4.4	Adsorption des IgG2a Antikörpers (mIgG) an SP-Sepharose FF	129
4.4.1	Problematik	129
4.4.2	<i>Adsorptionskinetik des monoklonalen Antikörpers (mIgG) im Rührreaktor</i>	129
4.4.2.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik von mIgG	129
4.4.2.2	Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorptionskinetik von mIgG	134
4.4.2.3	Kalibrierung der Einkomponentenadsorptionen von mIgG	137
4.4.3	<i>Adsorptionsgleichgewichte von mIgG an SP-Sepharose FF</i>	139
4.4.4	<i>Gegenüberstellung und Zusammenfassung der mIgG-Daten</i>	142
4.5	Zweikomponentenadsorption im Rührreaktor	144
4.5.1	Problematik	144
4.5.2	<i>Zweikomponentenadsorption im Acetatpuffersystem</i>	144
4.5.2.1	Einfluss des pH-Wertes auf die parallele Adsorption von BSA und mIgG	144
4.5.2.2	Einfluss der Ionenstärke auf die parallele Adsorption von BSA und mIgG	151
4.5.2.3	Einfluss des Konzentrationsverhältnisses auf die parallele Adsorption von BSA und mIgG	153
4.5.3	<i>Experimente im Hybridomaüberstand</i>	155
4.5.4	<i>Zweikomponentenadsorptionsgleichgewichte (Isothermen)</i>	158

4.6	Multicoloranalyse der Proteinadsorption	162
4.6.1	<i>Adsorption von BSA</i>	162
4.6.2	<i>Adsorption von IgG</i>	167
4.6.3	<i>Vergleich der Adsorptionsmuster und Quantifizierung</i>	169
4.7	Titrationenkurven	171
5.	DISKUSSION	176
5.1	Validierung des experimentellen Systems	176
5.2	Intensitätsexperimente	181
5.3	Einkomponentenadsorption	186
5.4	Zweikomponentenadsorption	197
5.5	Multicoloranalyse der Proteinadsorption	203
5.6	Ausblick	206
6.	ZUSAMMENFASSUNG	209
7.	LITERATUR	212

Anhang A: Strukturformeln der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Anhang B: Listings der Auswerteprogramme Convert und Analyse

Anhang C: Experimentelle Daten zur Einkomponentenadsorption im Rührreaktor

Anhang D: Experimentelle Daten und Micromath Scientist-Programm zur
Bestimmung der Einkomponentenisothermenparameter

Anhang E: Experimentelle Daten zur Zweikomponentenadsorption im Rührreaktor

Anhang F: Experimentelle Daten und Micromath Scientist-Programm zur
Bestimmung der Zweikomponentenisothermenparameter

Anhang G: Experimentelle Daten zur Multicoloranalyse der Proteinadsorption

Lebenslauf

II Formelzeichen und Abkürzungen

Arabische Zeichen

a	[kg m ⁻³]	Aktivität
B	[nm ⁻¹]	matrixspezifische Proportionalitätskonstante
B _i	[m ² s ⁻¹]	Mobilität
c	[kg m ⁻³]	Konzentration
D	[m]	Eindringtiefe
D _{ax}	[m ² s ⁻¹]	Axialer Dispersionskoeffizient
D _i	[m ² s ⁻¹]	Diffusionskoeffizient in freier Lösung
D _P	[m ² s ⁻¹]	Porendiffusionskoeffizient („Shrinking Core“)
D _H	[m ² s ⁻¹]	Porendiffusionskoeffizient („Homogeneous Diffusion“)
D _S	[m ² s ⁻¹]	Oberflächendiffusionskoeffizient
d _p	[m]	Partikeldurchmesser
d _{Pore}	[m]	Porendurchmesser
d _{xy}	[m]	Laterale Auflösung
d _z	[m]	Axiale Auflösung
E	-	Transfereffizienz
F	[C mol ⁻¹]	Faraday Konstante
F(t)	-	„Fractional approach to equilibrium“
G	[J mol ⁻¹]	Freie Enthalpie
H	[J mol ⁻¹]	Enthalpie
h	[J s]	Plancksche Konstante
I	[app. Einheiten]	Intensität
I _{integr.} ^{Schale}	[arb. units]	Schalenvolumenintensität
J	[mol s ⁻¹ m ⁻²]	Stoffstromdichte
K	-	Gleichgewichtskonstante (Massenwirkungsgesetz)
K _a	[m ³ kg ⁻¹]	Langmuir Assoziationsgleichgewichtskonstante
K _i	-	Gleichgewichtskonstante
k _B	-	Übergangsrate „Photobleaching“
k _{IC}	-	Übergangsrate interne Konversion
k _{IS}	-	Übergangsrate „Intersystem crossing“
k _F	-	Übergangsrate Fluoreszenz
k _f	[m s ⁻¹]	Stoffübergangskoeffizient für den Filmtransport
k _Q	-	Übergangsrate Fluoreszenzlöschung „Quench“
k _T	-	Übergangsrate Fluoreszenz Resonanz Energietransfer

l_D	[m]	Debye Länge
\ln		Logarithmus
m	[kg]	Masse
M_w	[Da]	Molekulargewicht
NA	-	numerische Apertur
n	-	Anzahl der Versuche
n_B	-	Brechungsindex
Q	[kg m ⁻³]	Kapazität
Q_{abs}	[kg m ⁻³]	absolute kapazität
Q_{max}	[kg m ⁻³]	Maximale Kapazität
Q_{rel}	[arb units m ⁻³]	Relative Kapazität
R	[J K ⁻¹ mol ⁻¹]	Allgemeine Gaskonstante
R^*	-	Gleichgewichtsparameter
R_T	[m]	Mittlerer Abstand
R_{0T}	[m]	Charakteristischer Abstand
r	[r]	Radius
r_{Airy}	[m]	Radius der „Airy disk“
r_{Pore}	[m]	Porenradius
r_a	[m]	Radiale Position (außen)
r_i	[m]	Radiale Position (innen)
r_p	[m]	Partikelradis
S	[J mol ⁻¹ K ⁻¹]	Entropie
T	[K]	Temperatur
t	[s]	Zeit
V	[m ³]	Volumen
V_{Gel}	[m ³]	Gelvolumen
V_p	[m ³]	Partikelvolumen
V_{sys}	[m ³]	Flüssigkeitsvolumen im System
x	[m]	Ortskoordinate
z	-	Ladung
z_i	-	Charakteristische Ladung („Steric mass action“)

Griechische Zeichen

δ	[m]	Filmdicke
ε	[l mg ⁻¹ cm ⁻¹]	Extinktionskoeffizient
$\varepsilon(\text{molar})$	[M ⁻¹ cm ⁻¹]	Extinktionskoeffizient
ε_p	-	Hohlraumanteil im Partikel
ϕ_F	-	Quantenausbeute
φ	-	Faservolumenanteil
λ	[nm]	Wellenlänge
μ	[J mol ⁻¹]	Chemisches Potential
ν	[s ⁻¹]	Frequenz
θ	[Grad]	Halbwinkel der Objektivlichtkegel
ρ	[kg m ⁻³]	Dichte
ρ_i	-	Sterischer Faktor („Steric mass action“)
τ	-	Stöchiometrische Zeit
τ_D	[s]	Fluoreszenzlebensdauer des Donors
τ_F	[s]	Tatsächliche Fluoreszenzlebensdauer
τ_P	-	Totuositätsfaktor
τ_R	[s]	Intrinsische Fluoreszenzlebensdauer

Indizes

abs	Absolut
ads	Adsorption
0	Standardzustände
ch	Messkanal
eq	Gleichgewicht („equilibrium“)
eff	Effektiv
Em.	Emission (Fluoreszenz)
Exc.	Anregung (Fluoreszenz)
ges	Gesamt
i,j	Stoffkomponente i, j
korr	Korrigiert
P	Pore
p	Partikel

rad	Radiale Position
Salz	Puffer
tot	Total
-	Dimensionslos
Abkürzungen	
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
FAD	Flavinadenindinukleotid
FITC	Fluoreszein
FF	Fast Flow
FRAP	„Fluorescence Recovery After Photobleaching“
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FWHM	„Full Width at Half Maximum“
IgG	Immunglobulin G
mAb	Monoklonaler Antikörper
mIgG	Monoklonales Immunglobulin G
n.b.	Nicht bestimmt
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidiert)
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NMR	Kernmagnetische Resonanz
Q	Quartäres Aminomethyl
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Sulfopropyl
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
v/v (%)	Volumenprozent
w/w (%)	Gewichtprozent
XL	Extra Load

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Problematik der Proteinchromatographie mit porösen Trägern und Prinzip zum experimentellen Zugang des intrapartikulären Konzentrationsprofils	2
Abbildung 2: Modellierte 3D-Struktur des Rinderserumalbumins BSA. (A) Sekundärstrukturen (blau und grün zur Übersicht) mit einzeln aufgelösten Cysteinen und Disulfidbrücken (gelb). (B) Oberflächenstruktur mit markierten potentiell geladenen Aminosäuren (Aspartat, Glutamat; rot); (Lysin, Arginin, Histidin; blau).....	5
Abbildung 3: Dreidimensionale Röntgenstruktur eines IgG2a-Antikörpers (Mab231) mit einer Auflösung von 2,8 Å. Modifiziert nach (Harris et al. 1997).....	7
Abbildung 4 Disaccharidgrundbaustein des Agarosepolymers (β -1,3-D-Galaktose und α -1,4-,3,6-anhydro-L-Galaktose).....	11
Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines 2%-igen Agarosegels. Breite der Aufnahme ca. 2000 nm (Janson und Ryden 1998).....	11
Abbildung 6: Grundbegriffe der Adsorption. Modifiziert nach (Kümmel und Worch 1990)	12
Abbildung 7: Exemplarische Isotherme vom Langmuirtyp mit den beiden Parametern K_a und Q_{max}	16
Abbildung 8: Stofftransportlimitierungen beim Transport von Proteinen in poröse Medien. Modifiziert nach (Cowan et al. 1989).....	20
Abbildung 9: Prinzip des Porentransports und theoretische Konzentrations-, bzw. Beladungsprofile in der Flüssig-, bzw. Festphase. Modifiziert nach (Kümmel und Worch 1990).....	23
Abbildung 10: Prinzip des Oberflächentransports und theoretische Konzentrations-, bzw. Beladungsprofile in der Flüssig-, bzw. Festphase. Modifiziert nach (Kümmel und Worch 1990).....	24
Abbildung 11: chromatographische Prinzipien zur Bestimmung von Transportkoeffizienten (A) Durchbruchkurvenanalyse; (B) Isokratische Elution (Puls-Antwort Experiment); (C) statische Adsorption im Rührreaktor	26
Abbildung 12: Prinzip des „Shrinking Core“ Modells. Modifiziert nach (Ruthven 1984)	29
Abbildung 13 Prinzip des „Homogeneous Diffusion“ Modells	30
Abbildung 14: Jablonski Diagramm. Modifiziert nach (Cantor und Schimmel 1980).....	32
Abbildung 15: Mechanismus des Singulett Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET), bzw. Förster Transfers.....	35
Abbildung 16: Exemplarischer Aufbau eines typischen Fluoreszenzspektrometers (MC Monochromator; SP Spalt; PM Photomultiplier	38

Abbildung 17: simulierte Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Fluorophorkonzentration.....	39
Abbildung 18: Komponenten eines typischen Konfokalmikroskops. Modifiziert nach http://www.cs.ubc.ca/spider/ladic/overview.html	40
Abbildung 19: Erzeugung einer konfokalen Auflösung mit Hilfe einer konfokalen Lochblende	41
Abbildung 20: Schematischer Strahlengang zur Trennung von Fluoreszenzemissionen verschiedener Wellenlängen.....	42
Abbildung 21: Laterale Auflösung und numerische Apertur NA. Modifiziert nach (Pawley 1995).....	43
Abbildung 22: Bestimmung der axialen Auflösung d_z . FWHM (Full width at half maximum). 45	
Abbildung 23: optische Schnittebenen durch einen Adsorberpartikel. Modifiziert nach http://www.mih.unibas.ch/Booklet/Booklet96/Chapter1/Chapter1.html	46
Abbildung 24: Konfokalbild und Fluoreszenzintensitätsprofil eines SP-Sepharose FF Partikels, der für 20 h mit einer Antikörperlösung, die zum Teil mit fluoreszenzmarkierten Antikörper versetzt war, inkubiert wurde. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde dabei der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green eingesetzt.....	47
Abbildung 25: Berechnung der Schalenvolumenintensitäten und der relativen Kapazität aus Fluoreszenzintensitätsprofilen	48
Abbildung 26: Exemplarisches 0,8%iges IEF-Agarosegel (coomassiegefärbt) im pH Bereich 3-7.....	57
Abbildung 27: Auftragung der Kav-Werte gegen den dekadischen Logarithmus von Proteinen bekannten Molekulargewichts zur Kalibrierung der Superdex G-200 Gelfiltration (Standardabweichung der bestimmten Kav-Werte als Fehlerbalken abgetragen; n: 3 – 6)	60
Abbildung 28: Exemplarisches Massenspektrum des isolierten mIgG2a Antikörpers.....	61
Abbildung 29: HPLC-Gradientenprogramm und Parameter zur Bestimmung der IgG2a-Antikörperkonzentration.....	63
Abbildung 30: HPLC-Messprogramm für Proteinproben (SP-Sepharose FF Säule).....	65
Abbildung 31: Aufreinigungsschema zur mIgG2a Aufarbeitung	67
Abbildung 32: Exemplarisches SDS-Elektrophoresegel (silbergefärbt) zur mIgG2a Aufarbeitung. (MM1 Prestained SeeBlue Marker; A Auftrag; D Durchlauf; W Waschfraktion; E1 Eluat Affinitätschromatographie; E2 Eluat Gelfiltration; L Lyophilisat; Std. IgG2a Standard; MM2 Mark12 wide range Marker).....	68

Abbildung 33: Reaktionsmechanismus der Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an primäre Aminogruppen der Proteine	70
Abbildung 34: Exemplarische Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffklassen	73
Abbildung 35: Prinzipielle Durchführung einer Batchadsorptionskinetik im thermostatisierten Rührreaktor	77
Abbildung 36: Konzentrationsverlauf in der Flüssigphase während einer konsekutiven Inkubation mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Spezies eines Proteins.....	80
Abbildung 37: Kalibrierung der Detektionskanäle des Konfokalmikroskops mit Hilfe eines SP-Sepharose FF Partikels, der mit allen drei BSA-Farbstoffkonjugaten in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 inkubiert wurde (A) Konfokalbilder der einzelnen Kanäle und Überlagerung (B) Resultierende Fluoreszenzintensitätsprofile.....	81
Abbildung 38: Reaktionsführung einer Multicoloranalyse	81
Abbildung 39: Bestimmung des molaren Adsorptionsrate $AUR_{300}(D)$	85
Abbildung 40: Aufbau des Microcube 96 zur Darstellung von 0,035 mL Adsorbtabletten..	87
Abbildung 41: Anregungs- und Emissionsspektren der reinen Fluoreszenzfarbstoffe (A) Oregon Green TM 488, (B) Alexa TM 488, (C) Cy3 und (D) Cy5 in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0. Die Anregungsspektren sind gestrichelt markiert	97
Abbildung 42: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Konfokalbildern, die 15-20h mit BSA Lösungen in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 inkubiert wurden. Als markiertes Proteinkonjugat wurde bei (A) BSA-Alexa; (B) BSA-Oregon; (C) BSA-Cy3 und (D) BSA-Cy5 verwendet.....	99
Abbildung 43: Auftragung der Anregungs- gegen die Emissionswellenlänge für eine mIgG-Proteinlösung in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0, die drei Proteinkonjugate in gleichem Konzentrationsverhältnis enthält (mIgG-Alexa; mIgG-Cy3 und mIgG-Cy5).....	100
Abbildung 44: Konfokalbilder und Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln nach 20 stündiger Inkubation mit BSA und hIgG im Konzentrationsverhältnis 1:2 (w/w) in verschiedenen Protein/Farbstoffkombinationen. (A) hIgG markiert mit Oregon Green und BSA mit Cy5; (B) hIgG markiert mit Cy5 und BSA mit Oregon Green; (C) hIgG markiert mit Cy5 und BSA unmarkiert; (D) hIgG unmarkiert und BSA markiert mit Cy5	101
Abbildung 45: Abhängigkeit (A) der Fluoreszenzintensität eines BSA-Konjugats in der Flüssigphase und (B) der relativen Kapazität $Q_{rel}(\text{Festphase})$ von der Konzentration an Alexa TM 488 Farbstoff	103

- Abbildung 46: Konzentrationsabhängigkeit der relativen Kapazität Q_{rel} ermittelt mit BSA-Oregon Green bei drei verschiedenen Laserintensitäten (100%, 50%, 30%). Die Linien zeigen uneingeschränkte Linearität zwischen den beiden Größen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der bestimmten relativen Kapazitäten ($n = 3$). Zur Berechnung der Regressionsgeraden wurden nur Werte bis zu einer Farbstoffkonzentration von 0,4 mM herangezogen 105
- Abbildung 47: Konzentrationsabhängigkeit der relativen Kapazität Q_{rel} ermittelt mit BSA-Cy3 bei drei verschiedenen Laserintensitäten (100%, 50%, 30%). Die Linien zeigen uneingeschränkte Linearität zwischen den beiden Größen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der bestimmten relativen Kapazitäten ($n = 3$). Zur Berechnung der Regressionsgeraden wurden nur Werte bis zu einer Farbstoffkonzentration von 0,3 mM herangezogen..... 107
- Abbildung 48: Konzentrationsabhängigkeit der relativen Kapazität Q_{rel} ermittelt mit BSA-Cy5 bei drei verschiedenen Laserintensitäten (100%, 50%, 30%). Die Linien zeigen uneingeschränkte Linearität zwischen den beiden Größen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der bestimmten relativen Kapazitäten ($n = 3$). Zur Berechnung der Regressionsgeraden wurden nur Werte bis zu einer Farbstoffkonzentration von 0,2 mM herangezogen..... 108
- Abbildung 49: Exemplarische Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln, die mit vier verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von markiertem Protein (BSA-Cy5) und unmarkiertem Protein 15 h inkubiert wurden. Die Fluorophorkonzentrationen der Konjugatverdünnungen sind (0,15 mM hellgrau, 0,3 mM grau gestrichelt; 0,6 mM dunkelgrau gestrichelt und 1,5 mM schwarz gestrichelt)..... 109
- Abbildung 50: Exemplarische Fluoreszenzintensitätsprofile bei drei verschiedenen Laserintensitäten. 30 % (schwarz); 50 % (grau); 100 % (hellgrau). Detektionsbereich bei (A) 660 – 800 nm; (B) 730 – 800 nm..... 110
- Abbildung 51: Konfokalbilder von SP-Sepharose FF-Partikeln im zeitlichen Verlauf einer Inkubation mit BSA (BSA-Cy5 als Proteinkonjugat) in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 113
- Abbildung 52: Fluoreszenzintensitätsprofile der Konfokalbilder von SP-Sepharose FF Partikeln, die mit BSA-Cy5 in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 inkubiert wurden und resultierende Auftragung der bestimmten relativen und absoluten Kapazitäten Q_{rel} (hellgraue Punkte) und Q_{abs} (schwarze Kreuze) gegen die Zeit 114

- Abbildung 53: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln, die zu verschiedenen Zeiten aus den Konfokalbildern im Verlauf von BSA-Adsorptionskinetiken bei unterschiedlichen pH-Werten in 50 mM Acetatpuffer generiert wurden. (A) pH 4,5 [Zeiten: 5 Min, 15 Min, 30 Min, 45 Min, 63 Min, 90 Min, 2 h, 6 h, 17 h, 24 h]; (B) pH 5,0 [Zeiten: 5 Min, 10 Min, 16 Min, 33 Min, 60 Min, 93 Min, 3 h, 10 h]; (C) pH 5,5 [Zeiten: 5 Min, 32 Min, 66 Min, 2 h, 3 h, 39 h, 59 h]..... 115
- Abbildung 54: Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik von BSA in 50 mM Acetatpuffer in Abhängigkeit vom pH-Wert (4,5 – 5,5). (A) „Fractional Approach to Equilibrium“ (Q_{rel}/Q_{rel}^{∞}) und die Parameter, die zur Anpassung der Daten mit dem „Shrinking Core“ Modell verwendet wurden. (B) Aus A ermittelte effektive Diffusionskoeffizienten $D_P(\text{eff})$ 117
- Abbildung 55: Konfokalbilder von SP-Sepharose FF Partikeln, die im Verlauf von Inkubationen mit BSA-Cy5 bei einem pH-Wert von 5,0 mit verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen aufgenommen wurden..... 118
- Abbildung 56: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln, die zu verschiedenen Zeiten aus den Konfokalbildern im Verlauf von BSA-Adsorptionskinetiken bei pH 5,0 mit unterschiedlichen Pufferkonzentrationen generiert wurden. (A) 10 mM [Zeiten: 5 Min, 30 Min, 90 Min, 2 h, 4 h, 6 h, 15 h, 22 h]; (B) 50 mM [Zeiten: 5 Min, 10 Min, 16 Min, 33 Min, 60 Min, 93 Min, 3 h, 10 h]; (C) 100 mM [Zeiten: 5 Min, 15 Min, 45 Min, 60 Min, 90 Min, 2 h, 3 h, 15 h]; (D) 150 mM [Zeiten: 5 Min, 15 Min, 75 Min, 2 h, 63 h] 119
- Abbildung 57: Einfluss der Acetatpufferkonzentration auf die Adsorptionskinetik von BSA. (A) „Fractional Approach to Equilibrium“ (Q_{rel}/Q_{rel}^{∞}) und die Parameter, die zur Anpassung der Daten mit dem „Shrinking Core“ Modell verwendet wurden. (B) Aus A ermittelte, effektive Diffusionskoeffizienten $D_P(\text{eff})$ in Abhängigkeit von der Acetatpufferkonzentration (10 mM; 50 mM; 100 mM; 150 mM)..... 120
- Abbildung 58: Auftragungen der relativen Kapazität Q_{rel} gegen die korrespondierenden absoluten Kapazitäten Q_{abs} der Adsorption von BSA an SP-Sepharose FF unter verschiedenen experimentelle Bedingungen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichungen der bestimmten Größen von der Grundgesamtheit 122
- Abbildung 59: Isothermen der BSA-Adsorption an SP-Sepharose FF in 50 mM Acetatpuffer bei den drei verschiedenen pH-Werten 4,5 5,0 und 5,5. Die experimentellen Daten sind an das Langmuir-(grau) und an das SMA-Adsorptionsmodell (schwarz) angepasst ... 123

- Abbildung 60: Isothermen der BSA-Adsorption an SP-Sepharose FF in 50 mM Acetatpuffer bei den vier verschiedenen Pufferkonzentrationen 10 mM, 50 mM, 100 mM und 150 mM Acetat pH 5,0. Die experimentellen Daten sind an das Langmuir- und mit Ausnahme der 10 mM Isotherme mit dem SMA-Adsorptionsmodell angepasst 125
- Abbildung 61: Exemplarische Konfokalbilder von SP-Sepharose FF-Partikeln zu verschiedenen Zeiten im Verlauf einer Inkubation mit mIgG (blau) in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0. Als Fluoreszenzfarbstoffkonjugat wurde bei dieser Serie mIgG-Oregon verwendet..... 130
- Abbildung 62: Korrespondierende Fluoreszenzintensitätsprofile der Inkubation von SP-Sepharose FF mit mIgG in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 der Konfokalbilder von Abbildung 61 130
- Abbildung 63: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln, die zu verschiedenen Zeiten aus den Konfokalbildern im Verlauf von mIgG-Adsorptionskinetiken in 50 mM Acetatpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten generiert wurden. (A) pH 4,5 [Zeiten: 5 Min, 31 Min, 60 Min, 2 h, 4 h, 13 h 30 Min, 22 h 30 Min, 26 h, 42 h]; (B) pH 5,0 [Zeiten: 5 Min, 15 Min, 45 Min, 2 h 10 Min, 4 h, 5 h 10 Min, 8 h, 16 h, 27 h]; (C) pH 5,5 [Zeiten: 2 Min, 8 Min, 15 Min, 30 Min, 60 Min, 2 h, 20 h]..... 131
- Abbildung 64: Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik von mIgG. (A) „Fractional Approach to Equilibrium“ (Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}) und die Parameter, die zur Anpassung der Daten mit dem „Shrinking Core“- (schwarz) und dem „Homogeneous Diffusion“ Modell (grau) verwendet wurden. (B) Aus A ermittelte, effektive Diffusionskoeffizienten („Homogeneous Diffusion“ Modell $D_H(eff)$ in Abhängigkeit vom pH-Wert (pH 4,5; 5,0 und 5,5)..... 133
- Abbildung 65: Konfokalbilder von SP-Sepharose FF Partikeln, die im Verlauf von Inkubationen mit mIgG bei einem pH-Wert von 5,0 mit drei verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen 50 mM; 100 mM und 150 mM aufgenommen wurden. Als markiertes Proteinkonjugat wurde jeweils mIgG-Cy5 verwendet..... 135
- Abbildung 66: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln, die zu verschiedenen Zeiten aus den Konfokalbildern im Verlauf von mIgG-Adsorptionskinetiken bei pH 5,0 mit unterschiedlichen Acetatpufferkonzentrationen generiert wurden. (A) 50 mM [Zeiten: 5 Min, 15 Min, 45 Min, 2 h 10 Min, 4 h, 5 h 10 Min, 7 h 50 Min, 16 h, 27 h]; (B) 100 mM [Zeiten: 6 Min, 10 Min, 15 Min, 30 Min, 45 Min, 60 Min, 1 h 45 Min, 3 h, 4 h, 24 h]; (C) 150 mM [Zeiten: 5 Min, 10 Min, 15 Min, 30 Min, 60 Min, 17 h]..... 136

- Abbildung 67: Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorptionskinetik von mIgG. (A) „Fractional Approach to Equilibrium“ (Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}) und die Parameter, die zur Anpassung der Daten mit dem „Homogeneous Diffusion“ Modell (grau) verwendet wurden. (B) Aus A ermittelte, effektive Diffusionskoeffizienten („Homogeneous Diffusion“ Modell) $D_H(eff)$ in Abhängigkeit vom pH-Wert (pH 4,5; 5,0 und 5,5)..... 137
- Abbildung 68: Auftragungen der relativen Kapazität Q_{rel} gegen die korrespondierenden absoluten Kapazitäten Q_{abs} der Adsorption von mIgG an SP-Sepharose FF unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ($n = 6$). Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichungen der bestimmten Größen von der Grundgesamtheit 138
- Abbildung 69: Isothermen der mIgG-Adsorption an SP-Sepharose FF in 50 mM Acetatpuffer bei den drei verschiedenen pH-Werten 4,5 5,0 und 5,5. Die experimentellen Daten sind an das Langmuir- (grau) und an SMA-Modell (schwarz)angepasst..... 139
- Abbildung 70: Isothermen der mIgG-Adsorption an SP-Sepharose FF in 50 mM Acetatpuffer bei den vier verschiedenen Pufferkonzentrationen 50 mM, 100 mM und 150 mM Acetat pH 5,0. Die experimentellen Daten sind an das Langmuir- und dem SMA-Adsorptionsmodell angepasst..... 141
- Abbildung 71: Konfokalbilder von SP-Sepharose FF Partikeln im Verlauf einer Inkubation mit einer equimolaren Mischung von mIgG (rot) und BSA (grün) in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 145
- Abbildung 72: Fluoreszenzintensitätsprofile der Zweikomponentenadsorption von mIgG (grau) und BSA (schwarz) über dem halben Partikeldurchmesser im equimolaren Konzentrationsverhältnis in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5. Die Profile resultieren aus den Konfokalbildern in Abbildung 46 146
- Abbildung 73: Zeitverlauf der relativen Kapazitäten Q_{rel} von BSA (Quadrate) und mIgG (Kreise) bei Adsorption in 50 mM Acetatpuffer an SP-Sepharose FF. Die Kapazitätswerte zu den Abb. 46 und Abb. 47 gezeigten Daten sind ausgefüllt dargestellt 147
- Abbildung 74: Paritätsplot der Zweikomponentenadsorption von BSA und mIgG an SP-Sepharose FF in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5. Die Fehlerbalken bezeichnen die absoluten Standardabweichungen der relativen (Q_{rel} : $n = 6$) und absoluten (Q_{abs} : $n = 2$) Kapazitäten 148
- Abbildung 75: Molare Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ des BSA und mIgG in 50 mM Acetatpuffer bei den pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5 149

Abbildung 76: Molare Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ des BSA und mlgG bei den drei verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen 50 mM; 100 mM und 150 mM	152
Abbildung 77: Molare Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ des BSA und mlgG bei den drei verschiedenen molaren Konzentrationsverhältnissen von 4+1; 1+1 und 1+4	154
Abbildung 78: Exemplarische Konfokalbilder der Inkubationen von SP-Sepharose FF Partikeln mit Hybridomaüberständen bei drei verschiedenen pH Werten (4,5; 5,0 und 5,5). BSA-Alexa ist bei allen drei Serien grün und mlgG-Cy5 rot dargestellt	156
Abbildung 79 Molare Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ des BSA und mlgG in 1:2 verdünntem Hybridomaüberstand bei drei verschiedenen pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5	157
Abbildung 80: Simulierte SMA-Isothermen für (A) 50 mM Acetatpuffer pH 4,5; (B) 50 mM Acetatpuffer pH 5,0; (C) 50 mM Acetatpuffer pH 5,5. mlgG-Isothermen (rot); BSA-Isothermen (blau). Zur Simulation wurden die Parameter aus Tabelle 23 verwendet..	161
Abbildung 81: Konfokalbilder einer konsekutiven Inkubation von SP-Sepharose FF Partikeln mit verschiedenen BSA Protein/Fluoreszenzfarbstoffkonjugaten (Spalten 1-3) und einem Einzelkonjugatkontrollexperiment in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 (BSA-Alexa, grün; BSA-Cy3, blau; BSA-Cy5, rot)	162
Abbildung 82: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener BSA/Farbstoffkonjugate in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 (BSA-Alexa, schwarz; BSA-Cy3, grau; BSA-Cy5, hellgrau)	164
Abbildung 83: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener BSA/Farbstoffkonjugate in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 (BSA-Alexa, schwarz; BSA-Cy3, grau; BSA-Cy5, hellgrau)	165
Abbildung 84: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener BSA/Farbstoffkonjugate in 50 mM Acetatpuffer pH 5,5 (BSA-Alexa, schwarz; BSA-Cy3, grau; BSA-Cy5, hellgrau)	165
Abbildung 85: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener BSA/Farbstoffkonjugate in 150 mM Acetatpuffer pH 5,0 (BSA-Alexa, schwarz; BSA-Cy3, grau; BSA-Cy5, hellgrau)	166
Abbildung 86: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener mlgG/Farbstoffkonjugate in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 (mlgG-Alexa, schwarz; mlgG-Cy3, grau; mlgG-Cy5, hellgrau)	167
Abbildung 87: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener mlgG/Farbstoffkonjugate in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 (mlgG-Alexa, schwarz; mlgG-Cy3, grau; mlgG-Cy5, hellgrau)	168

Abbildung 88: Exemplarischer Vergleich der Summenspektren (schwarz gestrichelt) aus der konsekutiven Inkubation mit den Fluoreszenzintensitätsprofilen (grau) des zugehörigen Kontrollexperimentes (nur BSA-Cy3) einer Adsorption von BSA in 150 mM Acetatpuffer pH 5,0.....	170
Abbildung 89: Paritätsplots der konsekutiven Inkubationen von (A) BSA und (B) mIgG. Auftragung der relativen Kapazität Q_{rel} gegen die zugehörigen absoluten Kapazitäten $Q_{abs}(t)$	171
Abbildung 90: Titrationskurven einer wässrigen BSA-Proteinlösung. Vergleich mit den experimentellen Daten von Tanford (Tanford et al. 1955). Der pH-Bereich 4,0 bis 6,0 ist zur genaueren Übersicht herausvergrößert.	172
Abbildung 91: Titrationskurven einer wässrigen Proteinlösung des monoklonalen Antikörpers mIgG. Untersucher pH-Bereich von 4,0 bis 6,0 ist herausvergrößert	174
Abbildung 92: Prozentuale Abweichungen der einzelnen Farbstoffkonjugate des monoklonalen Antikörpers und BSA im Elutionsverhalten von Superdex 200 (isokratische Elution) und SP-Sepharose FF (Elution im linearen Salzgradienten). Fehlerbalken zeigen den prozentualen Standardabweichungen der Bestimmungsmethode (n = 2 – 6); (n.b. = nicht bestimmt).....	178
Abbildung 93: Konfokalbilder von SP-Sepharose Partikeln, die im Verlauf von Inkubationen mit Lysozym in 50 mM Glycinpuffer pH 9,0 zu verschiedenen Zeiten erzeugt wurden [3 Min, 15 Min, 45 Min, und 60 Min]. (A) SP-Sepharose FF; (B) SP-Sepharose XL Als fluoreszierender Marker wurde in den Experimenten Cy5 eingesetzt.....	193

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: pK_a -Werte potentiell geladener funktioneller Gruppen in Aminosäuren und Proteinen. Die einzelnen Gruppen repräsentieren den Ladungszustand der Aminosäuren bei pH 7,0. *Die pK_a^* -Werte sind mit einem mathematischen Modell bestimmt worden, in dem der Einfluss der beiden α -Funktionen der Aminosäuren auf die Titrationskurve der Seitenketten vernachlässigt wurde. Modifiziert nach (Cantor und Schimmel 1980).....	9
Tabelle 2: Extinktionskoeffizienten ε für die verwendeten Proteine. *Angaben von Amersham Pharmacia Biotech (nicht publiziert).....	62
Tabelle 3: verwendete Proteine und Daten (M_w = Molekulargewicht in Dalton; pI = isoelektrischer Punkt) ¹ Sequenzdaten Swissprot Datenbank (http://www.expasy.ch/swissprot); ² (Skavril 1992) ; ³ (Canfield 1963), ⁴ Massenspektroskopie (s. 3.3.4); ⁵ Isoelektrische Fokussierung (s. 3.3.1), ⁶ (Rämsch 2000).	66
Tabelle 4: Exemplarische Bilanz der Antikörperaufarbeitung	68
Tabelle 5: Spektrale Eigenschaften und Molekulargewichte M_w der verwendeten Fluorophore. Angaben beziehen sich auf den reinen Fluoreszenzfarbstoff nach Angaben der Hersteller. * s. 3.3.5.1 Gl. 36.....	69
Tabelle 6 Spektrale Einstellungen zur Detektion der verschiedenen Fluorophore mit dem Konfokalmikroskop und dem Fluoreszenzspektrometer.....	74
Tabelle 7: Verdünnungsreihen der verschiedenen BSA-Farbstoffkonjugate und resultierende Farbstoffkonzentration im SP-Sepharose FF-Partikel nach Inkubation ins Adsorptionsgleichgewicht. *Resultierende Farbstoffkonzentration	76
Tabelle 8: Pufferkonzentrationen, pH-Werte und die daraus resultierenden Leitfähigkeiten der Puffer.....	77
Tabelle 9: Leitfähigkeiten der Hybridomaüberstände bei verschiedenen pH-Werten.....	79
Tabelle 10: Isoelektrische Punkte pI verschiedener BSA/Farbstoffkonjugate und prozentuale Abweichungen im Vergleich mit unmarkiertem BSA.	93
Tabelle 11: K_{av} -Werte und berechnete Molekulargewichte M_w aus den Gel-filtrationsexperimenten für verschiedene Protein/Farbstoffkonjugate ($n=2$).....	94
Tabelle 12: Retentionszeiten R_t verschiedener Protein/Farbstoffkonjugate nach Elution im linearen Salzgradienten von SP-Sepharose FF	95
Tabelle 13: Bestimmte Parameter der Isothermen von BSA in 50 mM Acetatpuffer bei den drei pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5. Zweiparameteranpassung nach Langmuir für eine Salzkonzentration und Dreiparameteranpassung nach Brooks und Cramer über drei Salzkonzentrationen (50 mM; 100 mM; 150 mM) zur Bestimmung der SMA-Parameter K_i ; ρ_i und z_i (Brooks und Cramer 1992)	124

Tabelle 14: Bestimmte Parameter der Isothermen von BSA bei pH 5,0 in 10 mM; 50 mM; 100 mM und 150 mM Acetatpuffer. Zweiparameteranpassung nach Langmuir für eine Salzkonzentration und Dreiparameteranpassung nach Brooks und Cramer über drei Salzkonzentrationen (50 mM; 100 mM; 150 mM) zur Bestimmung der SMA-Parameter K_i ; ρ_i und z_i (Brooks und Cramer 1992).....	126
Tabelle 15: Datengegenüberstellung Einkomponentenadsorptionsuntersuchung von BSA an SP-Sepharose FF: „Shrinking Core“ Porentransportkoeffizient $D_P(\text{eff})$, initiale Konzentration c_i , Langmuirparameter Q_{max} und K_a ; SMA-Konstanten K_i , ρ_i und z_i ; und Gleichgewichtsparameter R^* für die beschriebenen Adsorptionskinetiken und Isothermen.	128
Tabelle 16: Bestimmte Parameter der Isothermen von mIgG in 50 mM Acetatpuffer bei den drei pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5. Zweiparameteranpassung nach Langmuir für eine Salzkonzentration und Dreiparameteranpassung nach Brooks und Cramer über drei Salzkonzentrationen (50 mM; 100 mM; 150 mM) zur Bestimmung der SMA-Parameter K_i ; ρ_i und z_i (Brooks und Cramer 1992).....	140
Tabelle 17: Bestimmte Parameter der Isothermen von mIgG bei pH 5,0 in 50 mM; 100 mM und 150 mM Acetatpuffer. Zweiparameteranpassung nach Langmuir für eine Salzkonzentration und Dreiparameteranpassung nach Brooks und Cramer über drei Salzkonzentrationen (50 mM; 100 mM; 150 mM) zur Bestimmung der SMA-Parameter K_i ; ρ_i und z_i	142
Tabelle 18: Datengegenüberstellung Einkomponentenadsorptionsuntersuchung von mIgG an SP-Sepharose FF: „Homogeneous Diffusion“ und „Shrinking Core“ Transportkoeffizient $D_H(\text{eff})$ und $D_P(\text{eff})$, initiale Konzentration c_i , Langmuirparameter Q_{max} und K_a ; SMA-Konstanten K_i , ρ_i und z_i ; und Gleichgewichtsparameter R^* für die beschriebenen Adsorptionskinetiken und Isothermen	143
Tabelle 19: Übersicht über die experimentellen Daten der Zweikomponentenexperimente im 50 mM Acetatpuffer bei pH 4,5 bis 5,5. Neben den Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ und den Kapazitäten $Q_{\text{abs}}^{\text{eq}}$ sind die Leitfähigkeiten und initialen Konzentrationen c_i zum Vergleich angegeben.....	150
Tabelle 20: Übersicht über die experimentellen Daten der Zweikomponentenexperimente in Acetatpuffer bei pH 5,0 (50 mM; 100 mM u. 150 mM). Neben den Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ und den Kapazitäten $Q_{\text{abs}}^{\text{eq}}$ sind die Leitfähigkeiten und initialen Konzentrationen c_i zum Vergleich angegeben	151

Tabelle 21: Übersicht über die experimentellen Daten der Zweikomponentenexperimente in Acetatpuffer bei pH 5,0 (Konzentrationsverhältnisse BSA/mIgG 4+1; 1+1; 1+4). Neben den Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ und den Kapazitäten Q_{abs}^{eq} sind die Leitfähigkeiten und initialen Konzentrationen c_i zum Vergleich angegeben	153
Tabelle 22: Übersicht über die experimentellen Daten der Zweikomponentenexperimente im Hybridomaüberstand bei pH 4,5 bis 5,5. Neben den Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ und den Kapazitäten Q_{abs}^{eq} sind die Leitfähigkeiten und initialen Konzentrationen c_i zum Vergleich angegeben.....	158
Tabelle 23: Ermittelte SMA-Parameter K_i , ρ_i und z_i aus der Zweikomponentenanpassung von experimentellen Einzel- und Zweikomponentengleichgewichtsdaten an das SMA-Modell von Brooks und Cramer	159
Tabelle 24: Operationsfenster einzelnen Fluorophore. * Fluorophorkonzentrationen berechnet nach Gleichung 4 unter 3.6.2.....	185
Tabelle 25: Vergleich der Kosten für 25 mL der Adsorbermaterialien SP-Sepharose FF; Protein G-Sepharose FF und rProtein A-Sepharose FF [Produktinformation von Amersham Pharmacia Biotech 2001].....	200

1. Einleitung

1.1 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie zur Bestimmung von Prozessparametern

Bei der großtechnischen Aufarbeitung von Proteinen kommen in nahezu allen industriellen Prozessen ein- oder mehrere adsorptive Trennverfahren zum Einsatz. Der Anteil der Kosten für die Aufarbeitung beträgt bei rekombinanten Proteinen bis zu 90% und wird bei anderen biotechnologischen Produkten, wie z.B. poly- und monoklonalen Antikörpern in vergleichbarer Größenordnung liegen (Weatherley 1994).

Die Auswahl einer geeigneten Chromatographiemethode richtet sich deshalb neben den Ansprüchen an die produktspezifische Reinheit vor allen Dingen nach der Wirtschaftlichkeit und Effizienz der jeweiligen Methode. Zum Beispiel wird bei der Aufarbeitung von monoklonalen IgG Antikörpern mit Affinitätschromatographien mit einem Prozessschritt in relativ kurzer Zeit eine hohe Reinheit des Antikörpermoleküls erzielt (s. (Thömmes et al. 1996); u. 3.4.2 dieser Arbeit). Die Kosten für solche Träger liegen aber um ca. das 30 - 50-fache höher als andere Chromatographiemedien, z.B. Ionenaustauscher. Bei der Ionenaustauschchromatographie werden elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Oberflächenladungen der Proteine mit entgegengesetzt geladenen Gruppen der Adsorbermatrix ausgenutzt. Die Selektivität eines Kationenaustauschers ist aufgrund der relativ unspezifischen, elektrostatischen Wechselwirkung mit den beschriebenen Affinitätschromatographien nicht zu vergleichen, jedoch können die Prozesskosten in Abhängigkeit vom Separationsproblem erheblich niedriger sein (Danielsson et al. 1988).

Bei diesen säulenchromatographischen Verfahren werden meist hochporöse Trägermaterialien verwendet, die an ihrer Oberfläche mit geeigneten Liganden so modifiziert sind, dass sie proteinspezifische Trennoperationen erlauben. Durch die Porosität vergrößert sich die innere Oberfläche der Partikel, und damit die Kapazität des chromatographischen Trägers enorm.

Gleichzeitig muss jedoch nahezu immer bei der Verwendung poröser Träger die nötige Verweilzeit der Proteine in der Säule im Verlauf der Chromatographie erhöht werden, da die Zugänglichkeit der Bindungsstellen im Partikelinneren einen Transport des Adsorptivs, bzw. Proteins im porösen Netzwerk voraussetzt, der in den meisten Fällen die Gesamtgeschwindigkeit des Adsorptionsprozesses limitiert.

Der innere Transport der relativ großen Proteinmoleküle ist nahezu ausschließlich diffusiver Natur. Er kann dabei nach Überwindung einer Flüssigkeitsgrenzschicht, bzw. Film (gestrichelte Linie Abb. 1) entweder ausschließlich im Porenwasser durch reine Porendiffusion oder nach initialer Adsorption, gebunden an die Matrixoberfläche, zusätzlich durch Oberflächendiffusion erfolgen (Abb. 1).

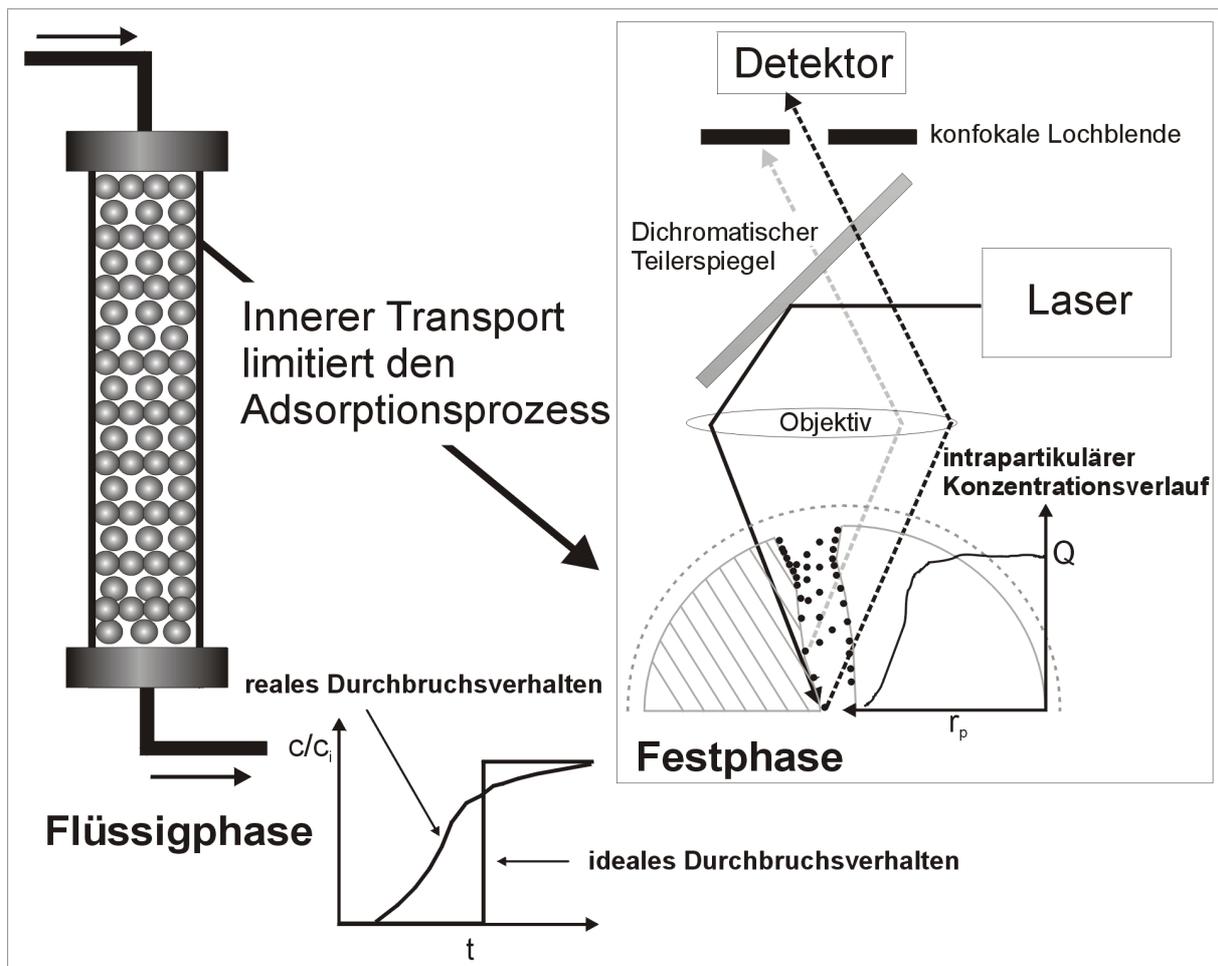


Abbildung 1: Problematik der Proteinchromatographie mit porösen Trägern und Prinzip zum experimentellen Zugang des intrapartikulären Konzentrationsprofils

Im Verlauf der Beladung einer Chromatographiesäule mit Zielprotein wirkt sich diese Transportlimitierung unter konstanten Strömungsbedingungen durch einen früheren und abgeflachten Durchbruch des Proteins im Vergleich zum idealen Durchbruch ohne innere Transportprozesse aus (Abb. 1).

Die Maßstabsvergrößerung („Scale Up“) chromatographischer Verfahren erfolgt bei konstanter Verweilzeit. Wiederum stellt die „Mobilität“ der Proteinmoleküle im porösen Netzwerk des Adsorberpartikels den limitierenden Faktor, bzw. den Hauptangriffspunkt zur Optimierung der Prozessbedingungen für einen effizienten Chromatographieschritt dar.

Als häufig erster experimenteller Ansatz zur Auswahl optimaler Adsorptionsbedingungen, bzw. -systeme werden Adsorptionsversuche im Rührreaktor durchgeführt (z.B. (Skidmore et al. 1990; Tongta et al. 1994; Weaver und Carta 1996; Habbaba und Ülgen 1997; Lewus et al. 1998; Hunter und Carta 2000)).

Im Prinzip wird dabei eine Proteinlösung bekannter Konzentration mit einer definierten Menge des porösen Adsorbentmaterials inkubiert und der Konzentrationsabfall in der Flüssigphase gemessen. Unter der Annahme, dass jedes Proteinmolekül, das aus der Lösung verschwunden ist, an das Adsorbentmaterial gebunden hat, kann über die Massenbilanz die Kapazität des Adsorbenters, bzw. der Anteil an gebundenem Protein zu jeder Zeit berechnet werden.

In der Literatur sind eine Anzahl mehr oder weniger komplexer Modellansätze publiziert, mit denen durch mathematische Anpassung dieser Daten kinetische Konstanten, Bindungsaffinitäten und Transportkoeffizienten bestimmt werden können (Arnold et al. 1985; Arve und Liapis 1987; Skidmore et al. 1990; Yoshida et al. 1994; Chang und Lenhoff 1998). Die Bestimmung der Transportkoeffizienten beruht dabei hauptsächlich auf verwendeten Modellannahmen und Gewichtungen über die Transportmechanismen (Film-; Poren-; Oberflächentransport) und Konzentrationsverläufe in der Festphase. Ein großer Nachteil der Methode ist, dass bisher nur über die Massenbilanz, also **indirekt** Zugang zu Parametern des inneren Transports gewonnen wurde. Informationen über den realen Transportmechanismus und den intrapartikulären Konzentrationsverlauf während der Adsorption waren bisher experimentell nicht zugänglich.

Aufgrund der beschriebenen Adsorptionseigenschaften, Limitierungen und der Wirtschaftlichkeit verlangt das Design und die Auslegung chromatographischer Trennverfahren ein detailliertes Verständnis der Adsorptions- und Transportprozesse in den Adsorbentstrukturen. Ein experimenteller Zugang zur „physikalischen Realität“ während der Adsorption würde die Auswahl des Transportmodells mit den richtigen Annahmen ermöglichen, bzw. experimentelle Daten zur mathematischen Modellierung von Adsorptionsprozessen liefern.

Mit Hilfe der konfokalen Laser Raster-Mikroskopie kann der intrapartikuläre Konzentrationsverlauf im Verlauf der Adsorptionsreaktion experimentell ermittelt werden. Informationen über den inneren Transport von Proteinen werden dadurch **direkt** zugänglich. Ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop nutzt lokal aufgelöste Fluoreszenzanregung/-emission zur Visualisierung einer räumlichen Differenzierung im untersuchten mikroskopischen Objekt. Im Prinzip wird nur die Fluoreszenzinformation zur Bildgebung genutzt, die aus der fokussierten Ebene des Untersuchungsobjektes, z.B. eines porösen Adsorbentpartikels stammt. Angeregte Fluoreszenzemissionen aus nicht fokussierten Ebenen werden z.B. durch die Einführung einer konfokalen Lochblende in den Strahlengang effizient ausgeblendet (Abb. 1). Ein kugelförmiger Adsorbentpartikel, der mit fluoreszierendem Adsorbat inkubiert wurde, kann dadurch ohne jegliche mechanische Zerstörung, optisch in Scheiben geschnitten werden, wobei die Verteilung der gebundenen Fluoreszenz innerhalb des

Partikels sichtbar gemacht wird. Das Konfokalmikroskop wird im Rahmen quantitativer Untersuchungen als lokal auflösendes Fluoreszenzspektrometer genutzt. Die Fluoreszenzintensitätsinformation wird durch einen Farbcode in den gerasterten Bildern präsentiert.

Durch eine Modifizierung der Proteine mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen und Inkubation mit Adsorberpartikeln werden die fluoreszierenden Konjugate „sichtbar“ für das Konfokalmikroskop. Der gebundene Anteil der Proteine kann in Partikelproben mit hoher lokaler Auflösung detektiert und abgebildet werden (Ljunglöf und Thömmes 1998).

Ljunglöf und Thömmes konnten bereits für die Adsorption einer Proteinkomponente zeigen, dass der Transportprozess im Verlauf der Adsorption in porösen Adsorberpartikeln mit Hilfe der konfokalen Messtechnik visualisiert und quantifiziert werden kann. Die bestimmten Kapazitäten aus der **direkten** konfokalen Analyse der Festphase korrelierten dabei linear mit **indirekt** bestimmten Kapazitäten aus dem Konzentrationsverlauf der Flüssigphase (Ljunglöf und Thömmes 1998).

1.2 Zielsetzung

Aufbauend auf den grundlegenden Arbeiten von Ljunglöf und Thömmes sollten weitere Untersuchungen des inneren Proteintransports in porösen Medien mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie in Zusammenarbeit mit der Forschungs- und Entwicklungsabteilung von Amersham Pharmacia Biotech in Uppsala, Schweden durchgeführt werden (Ljunglöf und Thömmes 1998).

Im Vordergrund steht dabei die Ausweitung der bestehenden Messtechnik auf die gleichzeitige Verwendung mehrerer unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe als selektive Proteinmarker. Als Modellsystem bei der Optimierung und Entwicklung von konfokalen Analysemethoden wird in diesem Projekt der Einzel- und Paralleltransport von Rinderserumalbumin (BSA) und Immunglobulin G an den porösen Kationenaustauscher SP-Sepharose FF näher betrachtet.

Im Rahmen der geplanten Untersuchungen sollen die Transportprozesse und -mechanismen der beiden Proteine in Abhängigkeit der äußeren Bedingungen wie z.B. pH-Wert und Ionenstärke im Ein- und Zweikomponentensystem besser verstanden werden, um für das Zweikomponententrennproblem Lösungsansätze zu liefern.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Die Modellproteine und ihre Eigenschaften

2.1.1 Rinderserumalbumin (BSA)

Rinderserumalbumin (BSA) ist ein gut wasserlösliches und nicht glykosyliertes Protein. Als Bestandteil des Blutserums ist BSA hauptsächlich am Transport von Fettsäuren und Prostaglandinen im Blutgefäßsystem beteiligt. Das 66430 Da schwere Molekül besitzt einer Modellvorstellung nach eine ellipsoide Struktur und durch elektrische Doppelbrechung wurde die Hauptachse zu ca. 14 nm und die Nebenachse zu 4 nm vermessen (Peters jr 1985). Die Ellipse umspannt weiterhin 3 Domänen mit einem relativ hohen α -Helixanteil, die durch 17 Disulfidbrücken stabilisiert sind (van der Wiel und Wesselingh 1989; Whitley et al. 1989).

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Struktur des BSA-Moleküls anhand von fünf verschiedenen Matrizen des humanen Serumalbumins HSA, die durch Röntgenkristallographie aufgelöst wurden, mit Hilfe des SWISS-MODEL Programms automatisch über das Internet modelliert (Peitsch 1995; Peitsch 1996; Guex und Peitsch 1997; Guex und Peitsch 1999; Guex und Peitsch 1999; Peitsch et al. 2000). Als Sequenz wurde dem Homologiemodell der EMBL-Proteindatenbankeintrag des Rinderserumalbuminprecursorproteins von Hilfger et al. 1998 abzüglich der ersten 24 Aminosäuren zu Grunde gelegt (Hilfger et al. 1998). In Abbildung 2 sind zwei verschiedene Darstellungen des BSA-Homologiemodells gezeigt.

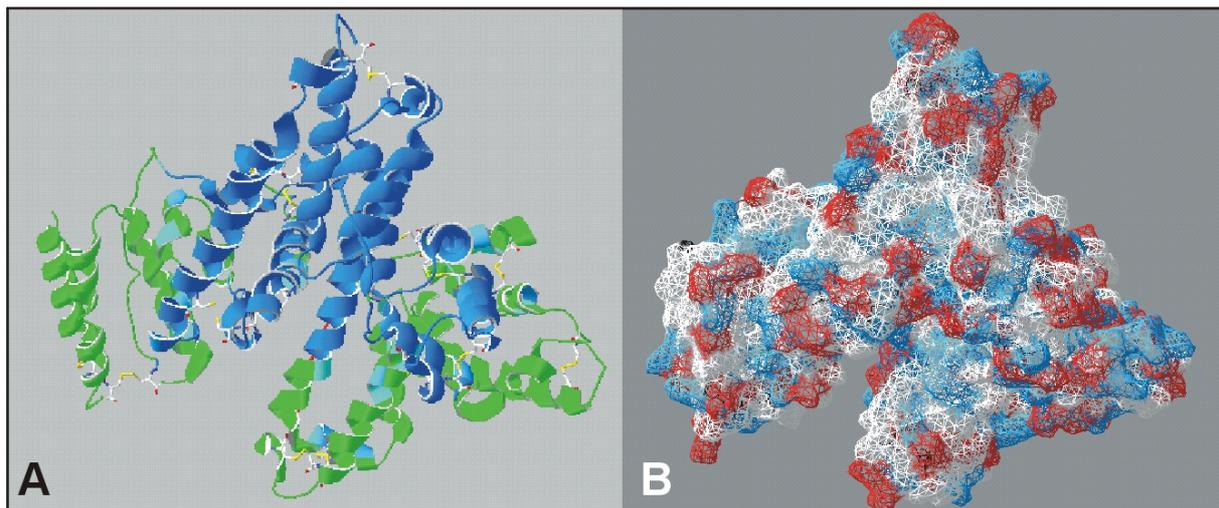


Abbildung 2: Modellierter 3D-Struktur des Rinderserumalbumins BSA. (A) Sekundärstrukturen (blau und grün zur Übersicht) mit einzeln aufgelösten Cysteinen und Disulfidbrücken (gelb). (B) Oberflächenstruktur mit markierten potentiell geladenen Aminosäuren (Aspartat, Glutamat; rot); (Lysin, Arginin, Histidin; blau)

Die verwendete BSA-Aminosäuresequenz besitzt eine Sequenzhomologie von mehr als 85% zu den verwendeten HSA-Matrizen. Das erstellte Homologiemodell bildet demnach mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit eine Struktur von BSA ab, die der realen Konformation nahe kommt.

Die Darstellung in Abbildung 2 (A) verdeutlicht, dass BSA überwiegend aus α -helikalen Sekundärstrukturen besteht, die durch 17 Disulfidbrücken (gelb) im Raum orientiert werden. Die Oberflächenstruktur in Abb. 2 (B) zeigt, dass die potentiell negativ und positiv geladenen Aminosäuren sich mehr oder weniger gleichmäßig auf der Oberfläche des Moleküls verteilen. Es bilden sich keine eindeutig geladenen Pole, wie z.B. bei dem pflanzlichen Protein Plastocyanin aus (Redinbo et al. 1993; Redinbo et al. 1994). Den potentiell negativ geladenen Aminosäuren Aspartat (40) und Glutamat (59) stehen 24 Arginin-, 17 Histidin und 59 Lysinreste gegenüber, die im physiologischen pH-Bereich positiv geladen sind (s. Abb. 2 (B)).

BSA ist mit Ausnahme einer aufgelösten, dreidimensionalen Struktur, sehr gut charakterisierte Spezies, die bereits in vielen Adsorptionsstudien als Modellprotein eingesetzt wurde (z.B. van der Wiel und Wesselingh 1989). Die Mobilität des Moleküls, bzw. der Diffusionskoeffizient in freier Lösung beträgt unabhängig vom pH-Wert und der Ionenstärke des umgebenden Milieus zwischen $5,81 - 6,17 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ (van der Wiel und Wesselingh 1989; Tyn und Gusek 1990).

2.1.2 Immunglobulin G (IgG)

Die Proteinfamilie der Immunglobuline (Ig) erfüllt ihre physiologische Funktion hauptsächlich im Rahmen der Immunabwehr bei der Antigenerkennung, Neutralisierung, Opsonisierung, der Sensibilisierung von Mastzellen und T-Zellen, sowie der Aktivierung des Komplementsystems (Janeway und Travers 1995).

Immunglobuline werden zunächst in Abhängigkeit von ihrer Funktion und Struktur in fünf Hauptklassen IgA; IgM, IgE, IgD und IgG eingeteilt. Der Anteil des Immunglobulins G (IgG) macht dabei im Serum eines gesunden Erwachsenen ca. 80% aus (Janeway und Travers 1995). Das IgG ist das Immunglobulin der sekundären Immunantwort und wird nochmals in vier Subklassen unterteilt:

IgG 1; IgG2; IgG3; IgG4 (Menschen)

IgG 1; **IgG2a**; IgG2b; IgG4 (Maus)

IgG-Antikörper besitzen ein Molekulargewicht von ca. 150 – 160 kDa und bestehen generell aus zwei Arten von Polypeptidketten. Sie besitzen ein Paar gleiche „schwere“ (ca. 50 kDa)

und zwei identische „leichte“ (ca. 25 kDa) Ketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. In Abbildung 3 ist eine dreidimensionale Struktur eines typischen IgG2a-Antikörpers dargestellt, die durch Röntgenstrukturanalyse aufgelöst wurde (Harris et al. 1997).

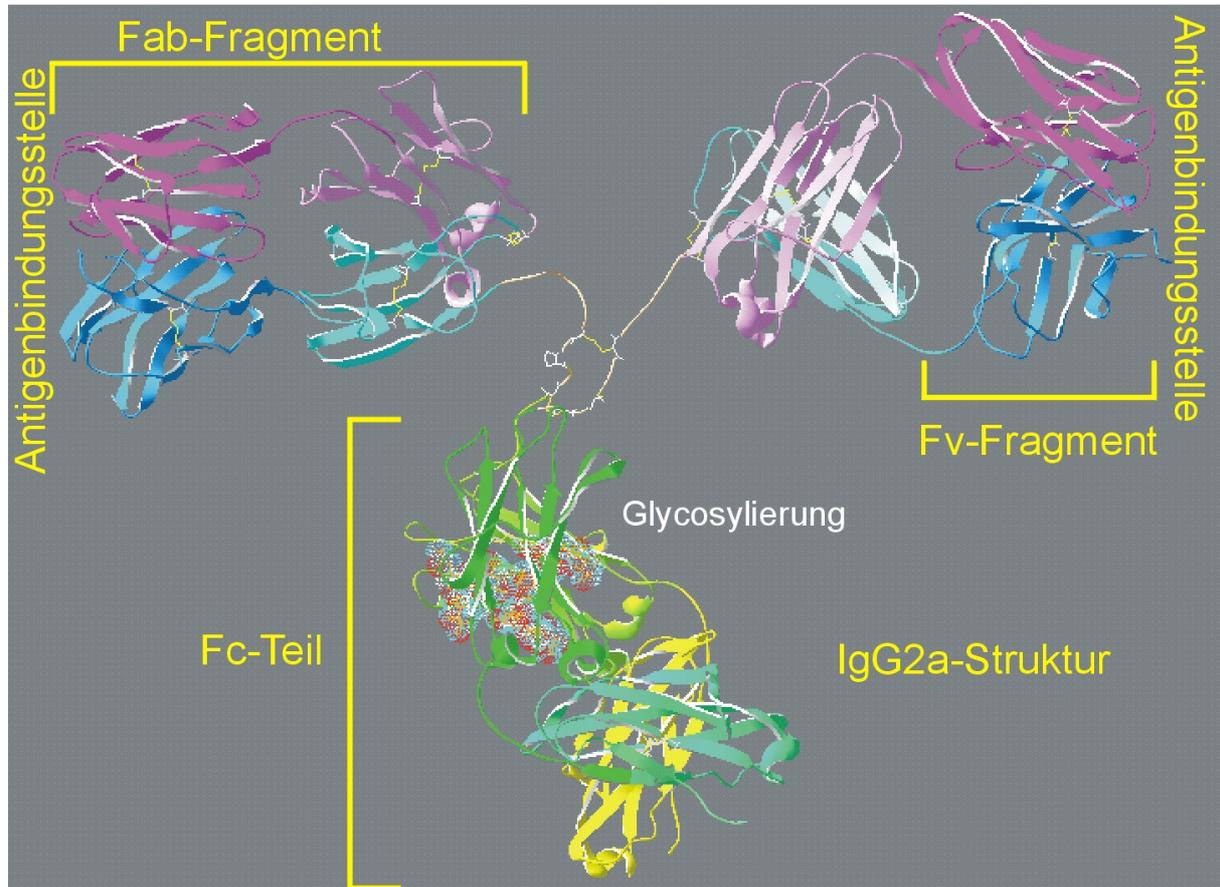


Abbildung 3: Dreidimensionale Röntgenstruktur eines IgG2a-Antikörpers (Mab231) mit einer Auflösung von 2,8 Å. Modifiziert nach (Harris et al. 1997)

Die komplexe Struktur des Moleküls ist in mehrere Domänen aus ca. 100 Aminosäureresten unterteilt. Das hauptsächlich vorkommende Strukturmotiv in diesen Molekülen ist im Gegensatz zum verwendeten BSA-Molekül das β -Faltblatt. Generell unterscheidet man zwei Regionen in Antikörpermolekülen. Die zwei schweren Ketten des Moleküls (grün und gelb) bilden im unteren Bereich der Struktur den Fc-Teil (c = crystal) des Antikörpers, der spezifischen Bindungsdomänen für z.B. Komplementproteine enthält. Protein A und Protein G, die zur Antikörperaufarbeitung an stationäre Phasen immobilisiert werden, binden vorwiegend in dieser Fc-Region des Moleküls.

Im oberen Teil der Struktur, nach einer Gelenkregion, an der die beiden schweren Ketten durch Disulfidbrücken verknüpft sind, gehen diese Struktur motive (blau/grün) auseinander und bilden zusammen mit den leichten Ketten (rosa und magenta) zwei Fab-Fragmente (ab = antigen bindend) (s. Abb. 3). Die beiden unteren konstanten Domänen (rosa/blaugrün) der

leichten und schweren Ketten eines Fab-Fragments sind durch Disulfidbrücken verbunden und verhindern so, dass sich die beiden Ketten trennen können.

Die vorderen, hochvariablen Domänen der leichten (magenta) und schweren (blau) Ketten bezeichnet man als Fv-Fragmente (v = variabel). Diese Strukturen sind für die Bindung des Antigens (rot) verantwortlich und können diese Funktion auch ohne den Rest des Moleküls erfüllen.

Der Fc-Teil des Antikörpers ist zusätzlich noch glykosyliert und diese posttranslationale Modifikation ist für die korrekte Faltung des Moleküls notwendig. In der Biotechnologie können deshalb vollständige Antikörpermoleküle nur von eukaryotischen Expressionssystemen, wie z.B. Hybridomazellen produziert werden, da prokaryotischen, bzw. bakteriellen Systemen, wie z.B. *Escherischia coli* die Enzyme zur Glykosylierung fehlen. Antikörperfragmente wie z.B. Fab-Fragmente und Fv-Fragmente können hingegen rekombinant von Bakterien durchaus in der richtigen Faltung produziert werden und die Fähigkeit der Antigenbindung bleibt erhalten (Langedijk et al. 1999). Die physiologische Disulfidbrücke wird beim molekularen Design häufig durch ein Verbindungspeptid (Linker) ersetzt, das die beiden Peptidketten des Fv-Fragments verknüpft (Sambrook et al. 1989). Die so konstruierten, antigenbindenden Fragmente bezeichnet man als Einzel-Ketten-Fv-Fragmente (scFv).

Der Antigen/Antikörperkontakt ist eine der spezifischsten, molekularen Wechselwirkungen zwischen Molekülen in der Biochemie. Deshalb finden mono- wie polyklonale Antikörper häufig im Rahmen der Labordiagnostik bei der Detektion und Quantifizierung von Substanzen Anwendung. Antikörper stellen darüber hinaus die wesentliche Produktklasse der pharmazeutischen Biotechnologie dar, deren Anwendung in der Therapie von Krebs- und Autoimmunkrankheiten die Produktion im Tonnenmaßstab erfordert (Scott 1998; Murray 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit polyklonalem humanem Immunglobulin G und einem monoklonalen IgG2a Antikörper als Modellprotein gearbeitet.

Die verwendeten IgG Antikörpermoleküle sind mit 150 – 160 kDa deutlich größere Moleküle als das Rinderserumalbumin (BSA) (ca. 67 kDa). Die Mobilität der Antikörper ist aufgrund der Größe im Vergleich zu BSA etwas geringer. Der Diffusionskoeffizient von IgG-Antikörpern in freier Lösung liegt bei $2,0 - 4,0 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ (Tyn und Gusek 1990).

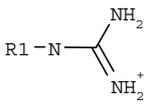
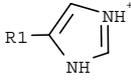
2.1.3 Proteintitration

Alle Proteine sind, bedingt durch ihre amphoteren Grundbausteine, Polyelektrolyte und reagieren auf Veränderungen des pH-Wertes mit einer Veränderung ihres Ladungszustandes. Die geladenen Seitenketten der Aminosäurebausteine, sowie die α -

Amino- und α -Carboxylgruppe der N-, bzw. C-Termini tragen dabei zum Protonierungsgleichgewicht von Proteinen bei, siehe z.B. (Tanford 1961).

Die pK_a -Werte der potentiell, geladenen Gruppen von Aminosäuremonomeren, sowie theoretische und experimentelle Werte in Proteinen sind in Tabelle 1 gegenübergestellt.

Tabelle 1: pK_a -Werte potentiell geladener funktioneller Gruppen in Aminosäuren und Proteinen. Die einzelnen Gruppen repräsentieren den Ladungszustand der Aminosäuren bei pH 7,0. *Die pK_a^* -Werte sind mit einem mathematischen Modell bestimmt worden, in dem der Einfluss der beiden α -Funktionen der Aminosäuren auf die Titrationskurve der Seitenketten vernachlässigt wurde. Modifiziert nach (Cantor und Schimmel 1980)

Aminosäuregruppe	pK_a (Aminosäure)	pK_a^* (Protein erwartet)
α -NH ₃ ⁺	8,8 - 10,8	-
α -COOH	1,8 - 2,6	-
Lysin R-NH ₃ ⁺	10,8	10,0 – 10,2
Arginin 	12,5	>12
Histidin 	6,0	6,5 – 7,0
Aspartat R-COOH	3,9	4,4 - 6,6
Glutamat R-COOH	4,3	4,4 - 6,6
Cystein R-SH	8,3	8,5 – 8,8
Tyrosin 	10,9	9,6 – 10,0

Die Daten in Tabelle 1 verdeutlichen, dass der individuelle pK_a -Wert eines Aminosäurerestes innerhalb der Tertiärstruktur eines Proteins aufgrund von Nachbargruppeneffekten variieren kann. Bei einer Titration resultiert aus der spezifischen Aminosäurezusammensetzung und Struktur eine charakteristische Titrationskurve, welche die Ladungsänderungen Δz der Spezies über einen bestimmten pH-Bereich beschreibt. Wenn bei einem pH-Wert die absolute Ladung des Proteins bekannt ist, lässt sich aus diesen Daten die Nettoladung z des Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert berechnen und graphisch auftragen. Dazu wird nahezu immer der isoelektrische Punkt des Proteins verwendet, bei dem die Nettoladung des Moleküls null beträgt.

Die Zuordnung von Ladungsänderungen in der Titrationskurve zu bestimmten Aminosäureresten kann wegen den individuellen pK_a -Werten von Aminosäureresten, die stark von der molekularen Umgebung, bzw. der Position des Restes in der 3D-Struktur des Moleküls abhängen, schwierig sein. Es können aber in jedem Fall Bereiche definiert werden, in denen die Protonierung/Deprotonierung bestimmter Gruppen die Ladungsänderungen bestimmen. Im neutralen Bereich liegen die primären Amino- und Carboxylgruppen geladen vor. Erniedrigt man den pH-Wert der Lösung, so werden, abgesehen vom Histidin ausschließlich α - und endständige Carboxylgruppen protoniert und das Nettoladungsgleichgewicht verschiebt sich hin zu positiven Ladungen. Bei Zugabe einer basischen Lösung verschiebt sich das Gleichgewicht vorwiegend durch die Deprotonierung von Aminofunktionen und freien Sulfhydrylgruppen zu negativen Ladungen hin. In der Literatur sind bereits für viele Proteine Titrationskurven beschrieben worden. Die Generierung von Titrationskurven ist eine Standardtechnik zur Charakterisierung von Proteinmolekülen (Tanford und Wagner 1954; Tanford et al. 1955; Tanford et al. 1956; Tanford und Roxby 1972; Fergg et al. 1994).

2.2 poröse stationäre Phasen (Struktur der Agarose)

Die stationäre Phase eines Chromatographiemediums besteht typischerweise aus einer kugelförmigen, porösen Matrix. Der eingeschlossene, immobile Flüssigkeitsanteil solcher Materialien beträgt oft mehr als 90% (Janson und Ryden 1998). Als poröse Materialien kommen oft hydrophile Polymere zum Einsatz, da in der Proteinchromatographie vorwiegend mit wässrigen Puffersystemen gearbeitet wird. (Janson und Ryden 1998). Neben anorganischen Materialien (poröse Silikate und Gläser, Hydroxylapatit) und synthetischen, organischen Polymeren (Polyacrylamid, Polymethacrylat und Polystyren) kommen vor allen Dingen natürliche Polysaccharide wie z.B. Zellulose, Dextran und Agarose zum Einsatz (Janson und Ryden 1998).

Die Agarose, bzw. die Grundmatrix der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten SP-Sepharose wurde bereits 1962 von Hjerten als Chromatographiemedium zur Gelfiltration von Proteinen eingeführt (Hjerten 1962). Das natürliche Polymer aus einer niedrig geladenen Fraktion des Agars, einem Polysaccharidgemisch von Rotalgen der Familie der Rhodophyceae, besitzt ein durchschnittliches Molekulargewicht von 100.000 Da (Arnott et al. 1974). Die doppelhelikale Struktur des Moleküls, die von Arnott et al. durch Röntgenstreuung aufgelöst wurde, basiert auf einer alternierenden Disaccharideinheit (β -1,3-D-Galaktose und α -1,4-,3,6-anhydro-L-Galaktose), die in Abbildung 4 dargestellt ist (Arnott et al. 1974).

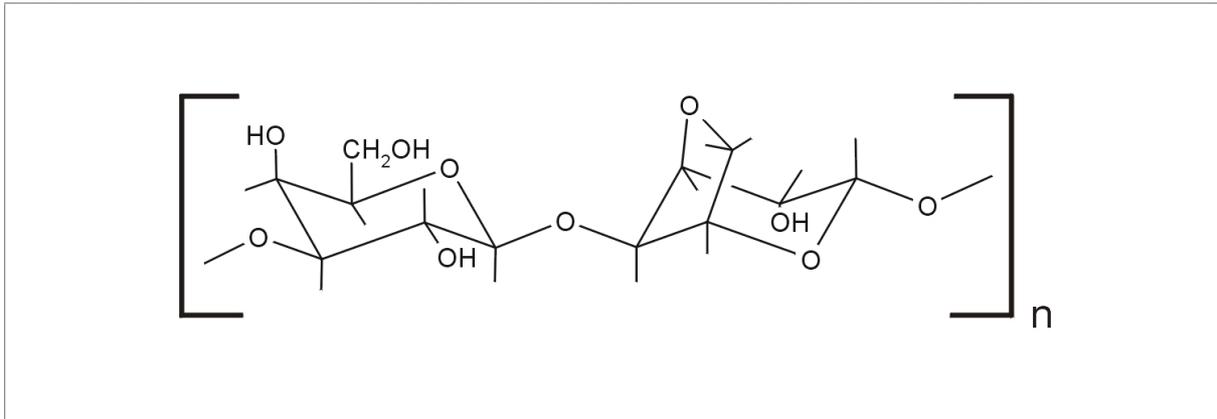


Abbildung 4 Disaccharidgrundbaustein des Agarosepolymers (β -1,3-D-Galaktose und α -1,4-,3,6-anhydro-L-Galaktose)

Waki et al. ermittelten durch elektronenmikroskopische Analyse von Gefrierbrüchen, dass durchschnittlich 10 - 30 Doppelhelizes zu Agarosefasern mit einem Durchmesser von 6 - 12 nm aggregieren (Waki et al. 1982). Die Fasern bilden ein offenes dreidimensionales Netzwerk, das in Abbildung 5 gezeigt ist.

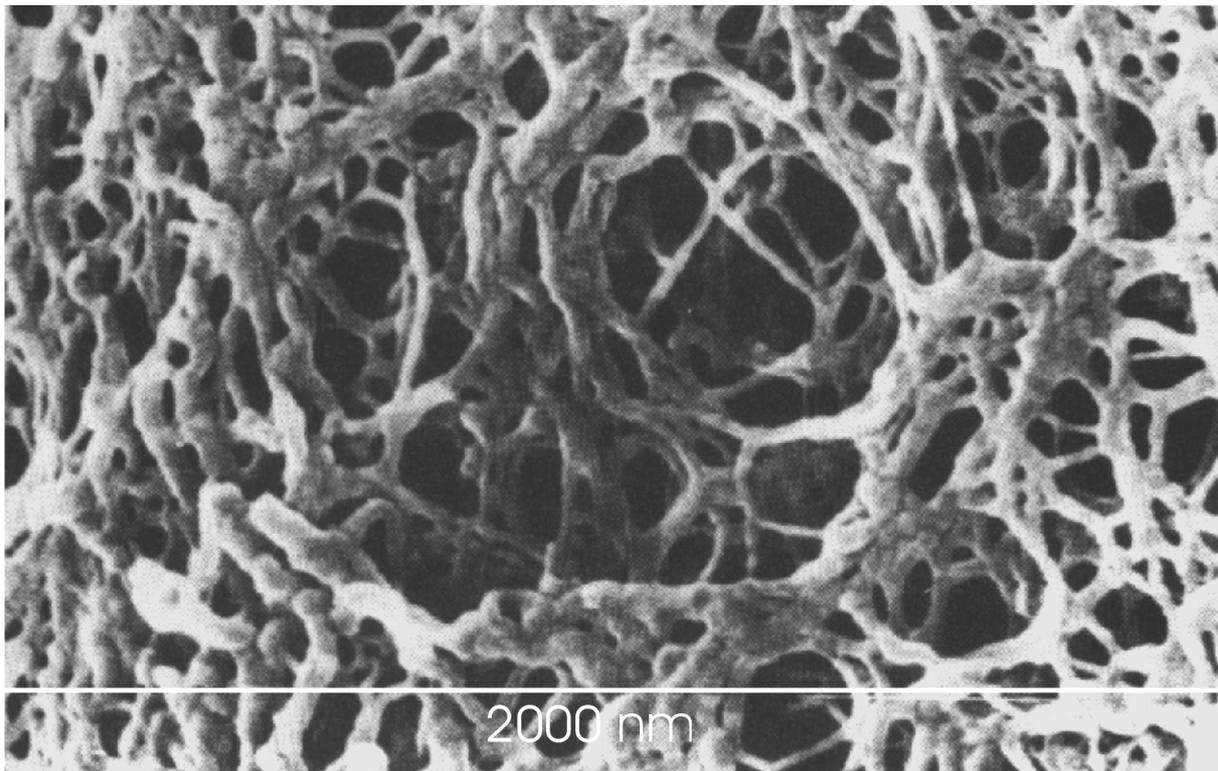


Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines 2%-igen Agarosegels. Breite der Aufnahme ca. 2000 nm (Janson und Ryden 1998)

Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Agarosenetzwerks verdeutlicht, wie sich die poröse Struktur eines Agarosepartikels für ein Proteinmolekül beim Transport ins Matrixinnere darstellt (s. Abb. 5).

Die im Projekt verwendete SP-Sepharose FF besteht aus 6 %-iger Agarose, die zur größeren mechanischen Stabilität quervernetzt wurde (Porath et al. 1971; Porath et al. 1975). Zum Einsatz als typischer Chromatographieträger sind an der Agarosematrix der SP-Sepharosepartikel Sulfopropylgruppen immobilisiert, die im Rahmen von chromatographischen Trennungen zur Adsorption von positiv geladenen Molekülen genutzt werden.

2.3 Adsorption und Adsorptionsgleichgewichte

2.3.1 Grundbegriffe der Adsorption

Als Adsorption werden generell Vorgänge bezeichnet, bei denen sich Moleküle aus einer Phase an einer Grenzfläche, bzw. Phasengrenze anordnen. Im engeren Sinne bezeichnet sie die Anreicherung von Stoffen an der Oberfläche von Flüssigkeiten und besonders von Feststoffen (Kümmel und Worch 1990). Für die Beschreibung von Adsorptionsprozessen wird im Rahmen dieser Arbeit die in Abbildung 6 dargestellte Terminologie verwendet werden.

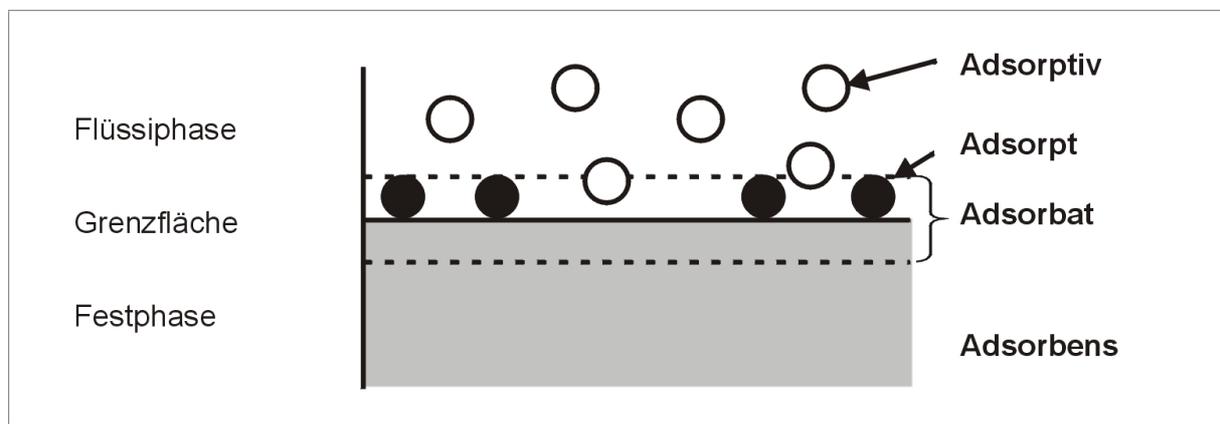


Abbildung 6: Grundbegriffe der Adsorption. Modifiziert nach (Kümmel und Worch 1990)

Es wird grundsätzlich zwischen zwei Arten der Adsorption von Molekülen unterschieden. Während die Physisorption ausschließlich auf van der Waals'schen Wechselwirkungen beruht, treten bei der Chemisorption chemische Bindungskräfte in den Vordergrund. Die genaue Einteilung des individuellen Adsorptionsphänomens erfolgt jedoch weitgehend willkürlich. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Ionenaustausch der Chemisorption zugeordnet,

wenngleich auch andere Autoren den Ionenaustausch als eigenständigen Prozess neben der Adsorption von Molekülen sehen (Dorfner 1991).

2.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Der Austausch zweier Ionen A und B unter Berücksichtigung der Elektroneutralitätsbedingung (gegensätzlich geladene Ionen in der Lösung) kann formal mit einer chemischen Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden. Im Falle eines Kationenaustauschers ist die Oberfläche des Trägers mit negativ geladenen, ionischen Gruppen, den Ionenaustauscherliganden (z.B. Sulfopropyliganden) modifiziert. Nach der Equilibrierung mit einer Pufferlösung befinden sich B-Kationen weitgehend immobilisiert an den Ionenaustauscherliganden. Der Ionenaustausch mit frei in der Lösung vorliegenden A-Kationen folgt unter diesen Voraussetzungen generell Gleichung 1.



Dabei sind die stöchiometrischen Koeffizienten z_A und z_B die Ladungszahlen der beiden ionischen Spezies. Unter gegebenen experimentellen Bedingungen stellt sich ein Gleichgewicht ein, dass wie folgt beschrieben werden kann:

$$K = \frac{[A^{\text{Matrix}}]^{z_B} \cdot [B^{\text{Lösung}}]^{z_A}}{[B^{\text{Matrix}}]^{z_A} \cdot [A^{\text{Lösung}}]^{z_B}} \quad (2)$$

Bezieht man dieses Gleichgewicht auf die Adsorption eines netto positiv geladenen Proteins A an einen Kationentauscher, der zuvor mit einem Puffer, der Natriumkationen B enthält, equilibriert wurde, dann hängt bei einer gegebenen Gleichgewichtssituation mit einem konstanten K das Ausmaß der gebundenen Proteinmoleküle von den stöchiometrischen Konzentrations-/Ladungsverhältnissen der beiden Kationen ab. Dieses Prinzip macht man sich bei der Ionenaustauschchromatographie zu nutze. Dabei wird das positiv geladene Zielprotein unter zunächst günstigen Konzentrationsverhältnissen der beiden Kationen A und B an den stationären Träger über die negativ geladenen Liganden gebunden. Durch stufenweise oder kontinuierliche Erhöhung der Konzentration der Natriumionen, bzw. B-Ionen in der freien Lösung kann in der Folge das Gleichgewicht so verändert werden, dass das Protein dem Prinzip von Le Chatelier folgend verstärkt von der stationären Phase wieder in Lösung geht, bzw. eluiert wird. Den realen Proteingemischen bei der Ionenaustauschchromatographie liegen solche kompetitive Gleichgewichte zu Grunde, die jedoch viel komplexer ausgeprägt sind.

Die Ionenaustauschchromatographie zählt zu einem der wichtigsten und am häufigsten, angewandten Operationsschritte in der Proteinaufarbeitung. Die Bindung an die stationäre Phase und Elution geht nahezu immer mit einer Konzentrierung des Produktes im Vergleich zur Auftragslösung einher, weshalb sich die Ionenaustauschchromatographie zur Anreicherung von Produkten aus stark verdünnten Lösungen eignet (Janson und Ryden 1998). Aufgrund der hohen Beladungskapazität ist der Prozess für die Aufarbeitung großer Proteinmengen sehr gut geeignet.

2.3.3 Thermodynamik der Adsorption (Adsorptionsisothermen)

2.3.3.1 Allgemeine Beschreibung

Adsorptionsreaktionen sind „freiwillig“, bzw. spontan ablaufende Vorgänge und benötigen entsprechend der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gl. 3) eine negative freie Reaktionsenthalpie $\Delta G_{ads} < 0$.

$$\Delta G_{ads} = \Delta H_{ads} - T \cdot \Delta S_{ads} < 0 \quad (3)$$

Die Adsorptivmoleküle werden bei der Adsorption an eine stationäre Phase fest orientiert und die Ordnung im System nimmt zu $\Delta S_{ads} < 0$. Die meisten Adsorptionsreaktionen laufen exotherm $\Delta H_{ads} < 0$ ab.

Bei der Adsorption von multivalenten Proteinmolekülen im Rahmen der Ionenaustauschchromatographie kann es hingegen durch Mehrpunktadsorption zu einer positiven Adsorptionsentropie $\Delta S_{ads} > 0$ kommen, da stöchiometrisch mehr Teilchen in Lösung gehen und die Unordnung des Systems steigt.

Zur Beschreibung der Gleichgewichtskonstante K von Adsorptionsreaktionen, die über Gleichung 4 mit der freien Adsorptionsenthalpie in Beziehung stehen, werden Adsorptionsisothermen $f(Q,C)$ bei $T = \text{konst.}$ verwendet.

$$K_{ads} = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (4)$$

In der Literatur sind viele verschiedene Adsorptionsmodelle publiziert, die experimentelle Daten von Adsorptionsgleichgewichten beschreiben (Langmuir 1918; Ruthven 1984; Velayudhan und Horvath 1988; Whitley et al. 1989; Bellot und Condoret 1991; Velayudhan und Horvath 1994; Nicoud und Seidel-Morgenstern 1996; Chang und Lenhoff 1998). Im

Rahmen dieser Arbeit werden in den nächsten beiden Abschnitten nur die verwendeten Isothermenmodelle näher beschrieben werden.

2.3.3.2 Adsorptionsisothermenmodell nach Langmuir

Das Adsorptionsmodell nach Langmuir ist 1918 auf kinetischen Annahmen basierend für die Adsorption von Gasen an stationäre Phasen abgeleitet worden. Die Langmuirisotherme zählt, aufgrund ihrer mathematischen Einfachheit zu dem am häufigsten verwendeten Adsorptionsmodell zur Beschreibung von Proteinadsorptionsgleichgewichten z.B. (Yoshida und Kataoka 1989; Yoshida und Fujita 1999). Der Modellvorstellung sind die folgenden Annahmen zu Grunde gelegt.

- Adsorptivmoleküle sind an einer bestimmten Anzahl von gut zugänglichen Bindungsstellen adsorbiert
- Ein Adsorptivmolekül ist an eine Bindungsstelle gebunden und das Adsorbat ist als monomolekulare Schicht organisiert
- Es existiert keine Interaktion zwischen den Adsorptivmolekülen (keine kooperativen Effekte)
- Alle Bindungsstellen sind chemisch äquivalent

Die Annahmen zeigen, dass die Modellvorstellung mit der Mehrpunktadsorption von Proteinen nicht vereinbar ist. Experimentelle Proteingleichgewichtsdaten bei Kationenaustauschchromatographie können trotz der Einfachheit des Modells erstaunlich gut angepasst werden (s. z.B. (Skidmore et al. 1990) und diese Arbeit). Die Modellvorstellung ist durch die folgende Gleichung formuliert:

$$Q^{eq} = Q_{max} \cdot \frac{K_a \cdot c^{eq}}{1 + K_a \cdot c^{eq}} \quad (5)$$

Die beiden Isothermenparameter des Adsorptionsmodells sind die maximale Kapazität Q_{max} der stationären Phase für das Adsorptiv und die Assoziationskonstante K_a , die als Maß für die Affinität des Adsorptivs, bzw. Proteins bei der Diskussion von Adsorptionsgleichgewichten herangezogen werden kann. Ein kleiner K_a -Wert beschreibt dabei eine geringere Affinität des Adsorptivs zur stationären Phase.

Der reziproke Wert von K_a entspricht der Gleichgewichtskonzentration c^{eq} , bei welcher der Adsorber halbmaximal mit Adsorptiv gesättigt ist. In Abbildung 7 ist exemplarisch eine Langmuiradsorptionsisotherme gezeigt.

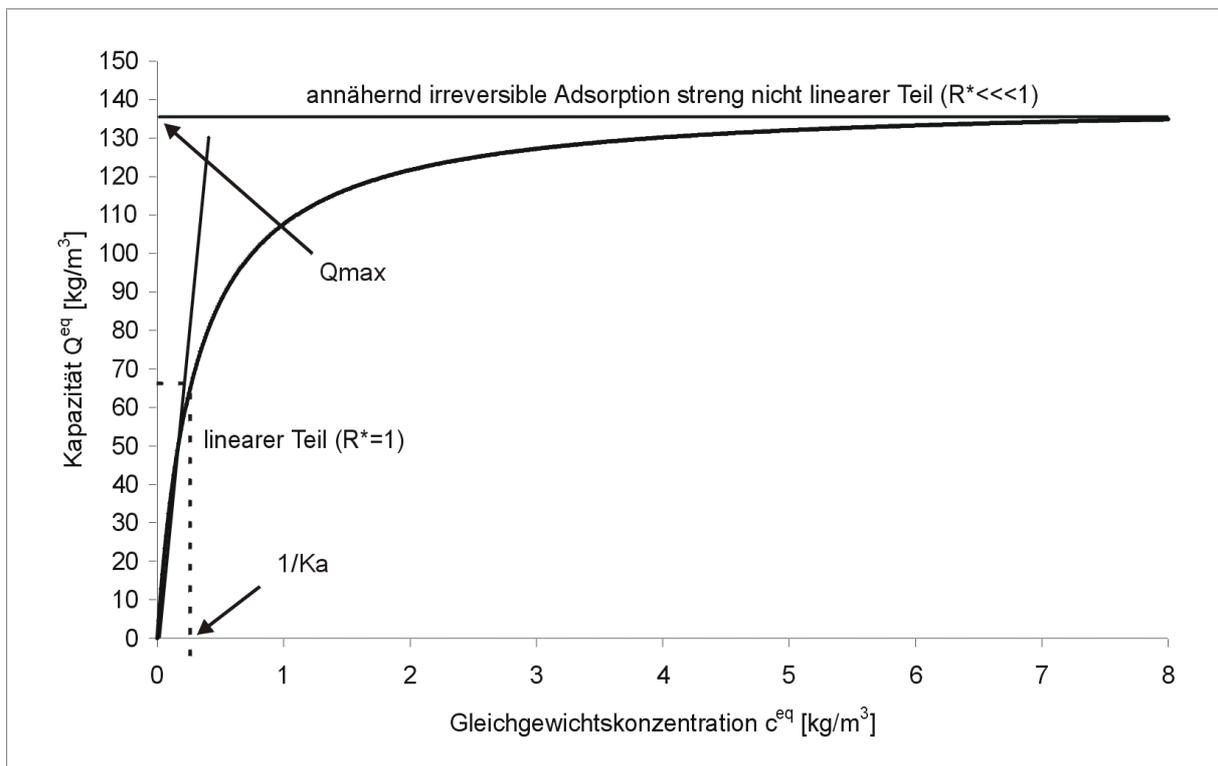


Abbildung 7: Exemplarische Isotherme vom Langmuirtyp mit den beiden Parametern K_a und Q_{max}

Zur Bestimmung der Gleichgewichtslage kann ein Gleichgewichtparameter wie folgt definiert werden:

$$R^* = \frac{1}{K_a \cdot c_i} \quad (6)$$

Die Lage des Gleichgewichts wird über diesen Parameter in vier Bereiche unterteilt.

$R^* < 0,1$	streng irreversible; nichtlineare Adsorption
$0,1 < R^* < 1,0$	günstige Adsorption
$R^* = 1$	lineare Adsorption
$R^* > 1$	ungünstige Adsorption

Die Gültigkeit der Gleichgewichtsannahmen von adsorptionskinetischen Modellen, denen eine Langmuirisotherme zu Grunde gelegt ist, kann über die Bestimmung dieses Parameters überprüft werden.

2.3.3.3 „Steric-Mass-Action“-Adsorptionsisothermenmodell

Das „Steric Mass Action“ oder SMA-Modell von Brooks und Cramer ist eine Weiterentwicklung von Isothermenmodellen, die auf dem Massenwirkungsgesetz der Adsorptionsreaktion, bzw. des Ionenaustauschs (Gl. 2) basieren (Brooks und Cramer 1992), vgl. mit (Velahyudhan und Horvath 1988; Whitley et al. 1989). Im Gegensatz zu der Langmuirisotherme ist dieses Modell speziell für die Proteinadsorption bei der Ionenaustauschchromatographie entwickelt worden. Der Modellvorstellung liegen dabei die folgenden Annahmen zu Grunde:

- Flüssig- und Festphase sind thermodynamisch ideal. Folglich können Konzentrationen anstelle von Aktivitäten verwendet werden
- Die Mehrpunktadsorption von Proteinen kann durch eine charakteristische Ladung z_i beschrieben werden (Velahyudhan und Horvath 1988; Whitley et al. 1989)
- Die kompetitive Bindung beim Ionenaustausch kann durch das Massenwirkungsgesetz (Gl. 2) formuliert werden. Elektroneutralität muss zu jedem Zeitpunkt gegeben sein
- Die Bindung der großen Proteinmoleküle führt zu einer sterischen Blockierung von Salzionen, die an die stationäre Phase gebunden sind und in der Folge für einen Ionenaustausch nicht mehr zur Verfügung stehen. Im Modell wird dieser Einfluss durch einen sterischen Faktor ρ_i berücksichtigt
- Der Effekt von Gegenionen (z.B. Anionen beim Kationenaustausch) kann vernachlässigt werden (Velahyudhan und Horvath 1988)
- Die Gleichgewichtsparameter des SMA-Formalismus K_i , ρ_i und z_i sind bei gegebenem pH-Wert unabhängig von der Salzkonzentration

Die SMA-Parameter sind durch relativ einfache Säulenexperimente experimentell bestimmbar (Gadam et al. 1993). Die Isotherme ist wie folgt formuliert:

$$c^{eq} = \frac{Q^{eq} \cdot c_{Salz}^{z_i}}{K_i \cdot [Q_{Salz} - (z_i + \sigma_i) \cdot Q^{eq}]^{z_i}} \quad (7)$$

Das SMA-Modell ist relativ einfach und ohne die Einführung zusätzlicher Parameter auf Mehrkomponentengleichgewichte erweiterbar (Brooks und Cramer 1992). Für ein Dreikomponentensystem, bestehend aus Salzionen, z.B. Na^+ ($K_i=1$; $\rho_i=0$ und $z_i=1$) und zwei

Dreikomponentensystem, bestehend aus Salzionen, z.B. Na^+ ($K_i=1$; $\rho_i=0$ und $z_i=1$) und zwei Proteinen erhält man ein System aus drei Gleichungen, das implizit lösbar ist. Für die beiden Proteine erhält man dabei jeweils einen Satz SMA-Parameter (K_{12} , ρ_{12} und z_{12} ; bzw. K_{13} , ρ_{13} und z_{13}), die das Adsorptionsverhalten der beiden Spezies an einen bestimmten Träger charakterisieren (Brooks und Cramer 1992). Im Anhang der Arbeit sind Micromath Scientist Programme aufgeführt, die Ein- und Zweikomponentengleichgewichtsdaten an das SMA-Modell anpassen und die Parameter ermitteln (s. Anhang D, bzw. Anhang F).

Das SMA-Modell wurde bereits in einigen Proteinadsorptionsstudien zur Beschreibung der Isothermen eingesetzt z.B. (Gadam et al. 1993; Lewus und Carta 1999; Hunter und Carta 2000).

2.4 Adsorptionskinetik und Transport in poröse Medien

2.4.1 Allgemein

Der Adsorption des Proteins innerhalb der porösen Struktur ist ein Transport vorgeschaltet, der in verschiedene Teilprozesse zerlegt werden kann. Die Summe dieser Teilprozesse bestimmt die Gesamtadsorptionsgeschwindigkeit. Die Kenntnis der Adsorptionsgeschwindigkeit (Adsorptionskinetik) bildet gemeinsam mit den Gleichgewichtsdaten die Grundlage zur Charakterisierung eines Adsorptionssystems.

2.4.2 Triebkräfte

Der Transport der Proteine in poröse Medien erfolgt ausschließlich durch Diffusion. Als Triebkraft für den diffusiven Transport wird generell ein Gradient des chemischen Potentials μ_i über eine Strecke δ in Richtung einer Ortskoordinate X angenommen (Ruthven 1989). Der Diffusionsstrom oder Fluss J_i einer Komponente i ergibt sich dann als Produkt aus der Triebkraft ($\partial\mu_i/\partial x$), der Konzentration und einem Proportionalitätsfaktor B_i , der als charakteristische Größe die Mobilität der diffundierenden Spezies beschreibt (Gl. 8).

$$J_i = -B_i \cdot c_i \cdot \frac{\partial\mu_i}{\partial x} \quad (8)$$

Bezieht man die Abhängigkeit des chemischen Potentials μ_i von der Aktivität a_i der Komponente i mit ein, so lässt sich Gleichung 8 überführen in:

$$J_i = -B_i \cdot R \cdot T \cdot \frac{d \ln a_i}{d \ln c_i} \cdot \frac{\partial c_i}{\partial x} \quad (9)$$

mit:

$$\mu_i = \mu_i^0 + R \cdot T \cdot \ln a_i \quad \text{und} \quad \frac{\partial \mu_i}{\partial x} = R \cdot T \cdot \frac{\partial \ln a_i}{\partial x} \quad (10)$$

Bei der Betrachtung extrem verdünnter Lösungen gilt über das Henry'sche Gesetz eine direkte Proportionalität zwischen Aktivität a und Konzentration c und der Aktivitätskoeffizient nimmt einen Wert von ~ 1 an. Damit ist der Quotient ($d \ln a_i / d \ln c_i$) auch ~ 1 und die Triebkraft geht für diesen Sonderfall in einen Konzentrationsgradienten über. Mit der Definition [$D = \text{BRT}$] ergibt sich unter diesen Bedingungen das erste Fick'sche Diffusionsgesetz (11):

$$J_i = -D_i(c) \cdot \frac{\partial c_i}{\partial x} \quad (11)$$

Der Proportionalitätsfaktor, bzw. Diffusionskoeffizient $D_i(c)$ ist in einem thermodynamisch idealen System, wie z.B. einem idealen Gas von der Konzentration unabhängig. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Ionenaustausch muss theoretisch eine weitere elektrochemische Triebkraft, die das elektrische Feld des Ionenaustauscherpartikels mitberücksichtigt, zum diffusiven Term hinzugefügt werden und man erhält die Nernst-Planck Gleichung (Gl. 12) (Helfferich 1990; Helfferich und Hwang 1991)

$$J_i = \underbrace{-D_i(c) \cdot \frac{\partial c_i}{\partial x}}_{\text{diffusive Triebkraft}} - \underbrace{D_i \cdot z_i \cdot c_i \cdot \left(\frac{F}{R \cdot T} \right)}_{\text{elektrochemische Triebkraft}} \cdot \frac{\partial \varphi_i}{\partial x} \quad (12)$$

Den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, mathematisch einfacheren Adsorptionsmodellen zur Beschreibung des Proteintransportes in porösen Strukturen liegen nur diffusive Triebkräfte entlang von Konzentrationsgradienten zu Grunde.

2.4.3 Stofftransportwiderstände

Adsorptionsgleichgewichte stellen sich nicht spontan ein, sondern dem Stoffübergang aus der Flüssigphase stehen Widerstände entgegen. Transportwiderstände, die bei der Adsorption von Proteinen an poröse Träger entstehen können sind in Abbildung 8 dargestellt (Cowan et al. 1989).

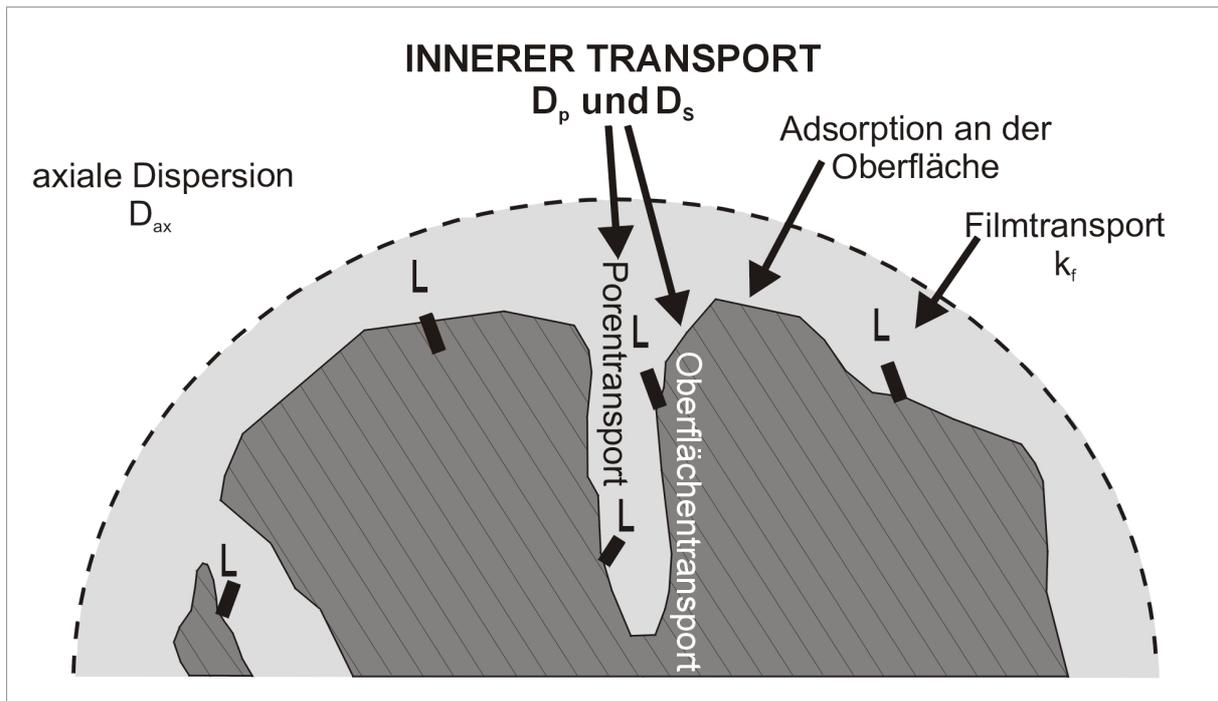


Abbildung 8: Stofftransportlimitierungen beim Transport von Proteinen in poröse Medien. Modifiziert nach (Cowan et al. 1989)

Axiale Dispersion:

Beim Volumenstrom einer adsorptiv-, bzw. proteinhaltigen Lösung durch eine chromatographische Säule, die mit porösen Adsorberpartikeln gefüllt ist, kommt es aufgrund zunehmender Vermischung in axialer Richtung zu unterschiedlichen Verweilzeiten verschiedener Volumenelemente innerhalb der Chromatographiesäule. Neben Einflüssen der Säulenwände, die radial unterschiedliche Geschwindigkeitsprofile erzeugen, wird die axiale Dispersion normalerweise mit einem mathematischen Modell über einen Dispersionskoeffizienten D_{ax} beschrieben, dem eine diffusive Triebkraft (Eddy Diffusion, molekulare Diffusion) zu Grunde gelegt ist (Levenspiel und Smith 1957; Levenspiel 1972).

Filmtransport:

Der Filmtransport (äußerer Stoffübergang) umfasst den Transport der Adsorptivmoleküle, bzw. Proteine aus der freien Lösung an die äußere Oberfläche des Adsorberpartikels. Diese Grenzschicht, bzw. der Film ist in Abbildung 8 als gestrichelte Linie dargestellt. Solange das Adsorptionsgleichgewicht noch nicht erreicht ist, ist die Aktivität, bzw. die Konzentration des Adsorptivs in unmittelbarer Nähe der Adsorberoberfläche niedriger als in freier Lösung. In Abhängigkeit von der betrachteten Triebkraft für den diffusiven Transport an die Adsorberoberfläche erfolgt der Transport über einen Gradienten des chemischen Potentials ($\partial\mu/\partial\delta$) oder der Konzentration ($\partial c/\partial\delta$) über einen Film der Dicke δ . Am Beispiel eines

Konzentrationsgradienten ist die Stoffstromdichte eines Proteins über diese Grenzschicht wie folgt definiert.

$$J_F = -D_i \cdot \frac{\partial c_i}{\partial \delta} \quad (13)$$

Anstelle des experimentell nicht zugänglichen Gradienten kann näherungsweise ein lineares Konzentrationsgefälle vorausgesetzt werden und es ergibt sich:

$$J_F = k_f \cdot \Delta c \quad \text{mit } k_f = \frac{D_i}{\delta} \quad (14)$$

Der Diffusionskoeffizient D_i entspricht dabei dem Diffusionskoeffizienten der Substanz in freier Lösung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Transport im Grenzfilm bei der Beschreibung der Kinetik der Adsorption vernachlässigt.

Adsorption an der Oberfläche:

Die Adsorption, bzw. der Ionenaustausch an der Adsorberoberfläche besitzt bei der Adsorption von Proteinen im Allgemeinen eine relativ hohe Geschwindigkeit im Verhältnis zum Film- und inneren Transport im porösen Netzwerk (s. 2.3.2).

Innerer Transport:

Der eigentliche Transport im porösen Netzwerk des Adsorberpartikels wird als innerer Transport bezeichnet. Die Porengeometrie, welche die Beweglichkeit der Adsorptivmoleküle, bzw. Proteine beim Transport stark einschränkt, macht diesen Schritt bei der Proteinadsorption nahezu immer zum geschwindigkeitsbestimmenden Teil des Gesamttransportes. Aufgrund dieser Tatsache wird dieser Transport bei der Auslegung von adsorptiven Trennprozessen besonders betrachtet und bestimmt im Wesentlichen die Effizienz einer chromatographischen Trennung. Dieser Transport wird im Rahmen dieser Arbeit mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie näher untersucht werden, um neue Erkenntnisse für die Optimierung von chromatographischen Trennprozessen zu gewinnen.

In Abhängigkeit von den Eigenschaften des Adsorptivs, des verwendeten Puffers und Adsorbens können im Partikel beim Transport verschiedene Transportmechanismen auftreten. Neben dem Poren- und Oberflächentransport, auf die in den nächsten Abschnitten noch ausführlich eingegangen wird, sind an dieser Stelle der Vollständigkeit halber noch die Knudsendiffusion und der Poiseuille Fluss zu nennen (Ruthven 1984). Die beiden

letztgenannten Mechanismen spielen bei der Adsorption von Proteinen aus einer wässrigen Lösung keine Rolle und werden deshalb nicht näher erläutert.

Die Massenbilanz einer Komponente A innerhalb eines Adsorberpartikels ist wie folgt definiert:

$$\varepsilon_p \cdot \frac{\partial c_A}{\partial t} + (1 - \varepsilon_p) \cdot \frac{\partial Q_A}{\partial t} = \frac{1}{r_p^2} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \cdot \left[\underbrace{r^2 \cdot D_P(\text{eff}) \cdot \frac{\partial c_A}{\partial r}}_{\text{Porentransport}} + \underbrace{r^2 \cdot D_S(\text{eff}) \cdot \frac{\partial Q_A}{\partial r}}_{\text{Oberflächentransport}} \right] \quad (15)$$

Die beiden rechten Terme repräsentieren dabei die Akkumulation des Adsorptivs A im Porenwasser und an der Festphasenoberfläche. Die beiden rechten Terme bilden die beiden Transportmechanismen Poren- und Oberflächentransport (Leyva-Ramos und Geankoplis 1985).

Die Randbedingungen dieser Gleichung sind:

Zu Beginn der Adsorption bei unbeladenem Adsorber gilt $c_A = c_A^0 = 0$; $t = 0$ und $0 \leq r \leq r_p$. Zusätzlich sind

im Partikelmittelpunkt:
$$\left. \frac{\partial c_A}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad (16)$$

an der Partikeloberfläche:
$$D_P(\text{eff}) \cdot \left. \frac{\partial c_A}{\partial r} \right|_{r=r_p} + D_S(\text{eff}) \cdot \left. \frac{\partial Q_A}{\partial r} \right|_{r=r_p} = k_f \cdot (c_A - c_p) \quad (17)$$

2.4.4 Innerer Transportmechanismus durch Porendiffusion

Beim Porentransportmechanismus, der in Abbildung 9 schematisch dargestellt ist, wird das Adsorptiv, bzw. Protein in der Porenflüssigkeit des porösen Netzwerkes transportiert bis es an einen geeigneten Liganden bindet. Nach initialer Bindung an die Adsorbermatrix erfolgt kein sekundärer Weitertransport.

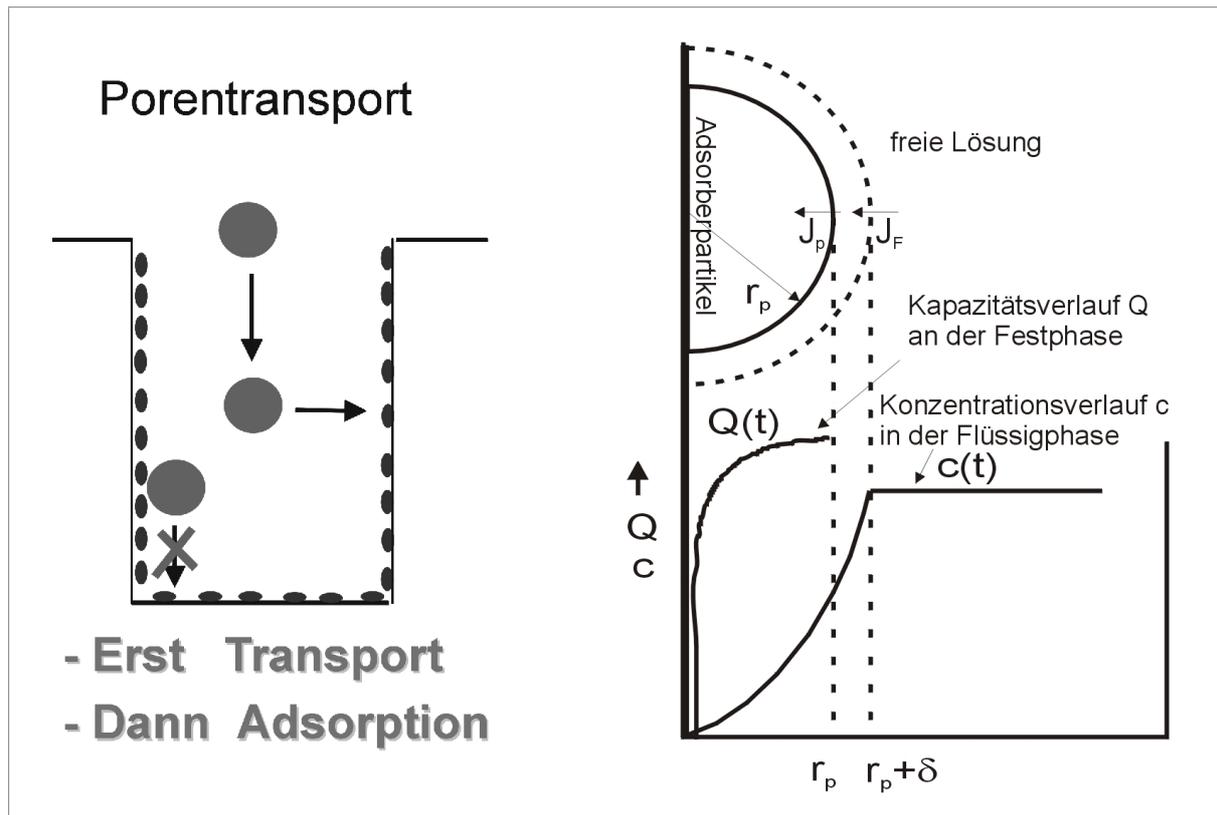


Abbildung 9: Prinzip des Porentransports und theoretische Konzentrations-, bzw. Beladungsprofile in der Flüssig-, bzw. Festphase. Modifiziert nach (Kümmel und Worch 1990)

Weiterhin befindet sich der theoretischen Vorstellung nach die Konzentration c des Adsorptivs in den Poren an jedem Ort im Adsorberinneren im Gleichgewicht mit der entsprechenden Adsorberbeladung. Dem Transport in der Porenflüssigkeit des porösen Netzwerks liegen die gleichen Triebkräfte zu Grunde, wie der Diffusion in freier Lösung. Die Mobilität des Moleküls ist jedoch im Vergleich zur Diffusion in freier Lösung eingeschränkt, da nicht das ganze Volumen der porösen Struktur für das Molekül zugänglich ist. Die Stoffstromdichte eines Proteins im Porenwasser eines porösen kugelförmigen Partikels mit dem Radius r_p entlang eines Konzentrationsgradienten in der Flüssigphase kann wie folgt definiert werden.

$$J_{Pore} = - \left(\frac{\varepsilon_p \cdot D_i}{\tau_p} \right) \cdot \frac{\partial c}{\partial r_p} = -D_P(eff) \cdot \frac{\partial c}{\partial r_p} \quad (18)$$

Der Partikelhohlraumanteil ε_p gibt dabei den für das Protein zugänglichen Hohlraumanteil des Partikels an, während der Tortuositätsfaktor τ_p Abweichungen von den radialen Diffusionsstrecken im Partikel beschreibt, die aufgrund verzweigter Porenstrukturen entstehen (Kümmel und Worch 1990).

Gleichung 18 gilt dabei nur für zylindrische Porengeometrien. Ogston et al. beschrieben für poröse Fasernetzwerke, wie dem in dieser Arbeit betrachteten Agaroseträger eine Korrelation für den Porentransportkoeffizienten in der Matrix als Funktion des Poren- d_{Pore} und Faserdurchmessers d_{Faser} (Ogston et al. 1973).

$$D_p(\text{eff}) = D_i \cdot \exp(-B[\text{nm}^{-1}] \cdot \varphi^{0,5} \cdot \left(\frac{d_{\text{Pore}}[\text{nm}] + d_{\text{Faser}}[\text{nm}]}{2} \right)) \quad (19)$$

Die beiden Parameter B und φ bezeichnen dabei eine matrixspezifische Proportionalitätskonstante und den dimensionslosen Faservolumenanteil.

2.4.5 Innerer Transportmechanismus durch Oberflächendiffusion

Der Oberflächentransport findet nach initialer Bindung des Adsorptivs an die Adsorbermatrix an der Phasengrenzfläche zwischen der Porenflüssigkeit und der Oberfläche der stationären Festphase statt. Das Prinzip dieses sekundären Transportes ist in Abbildung 10 schematisch gezeigt.

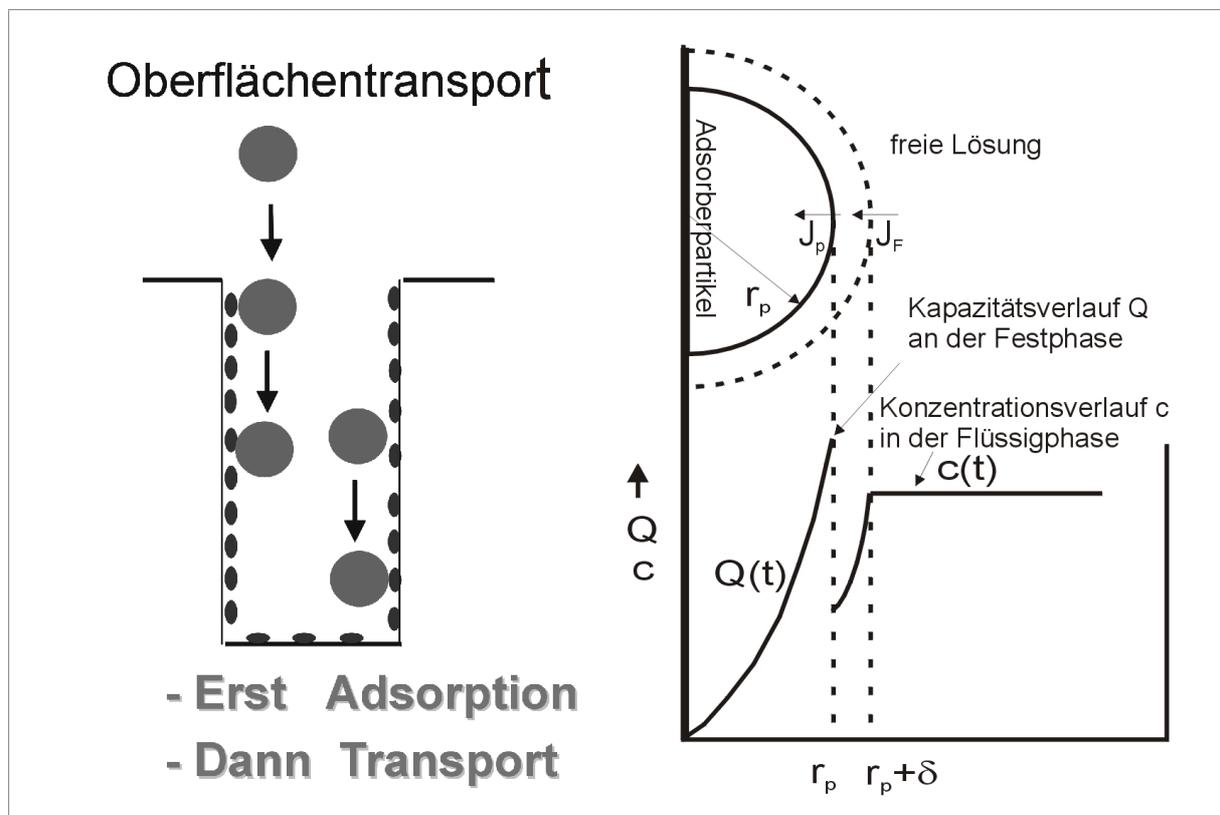


Abbildung 10: Prinzip des Oberflächentransports und theoretische Konzentrations-, bzw. Beladungsprofile in der Flüssig-, bzw. Festphase. Modifiziert nach (Kümmel und Worch 1990)

Im Gegensatz zum Porentransport hängt dieser Transportmechanismus von der aktuellen Beladung der Matrix mit dem Adsorptiv ab und die Stoffstromdichte, bzw. der Fluss ist wie folgt definiert (Ruthven 1984; Leyva-Ramos und Geankopolis 1985; Kümmel und Worch 1990).

$$J_{\text{Oberfläche}} = -D_S(\text{eff}) \cdot (1 - \varepsilon_p) \cdot \frac{\partial Q}{\partial r_p} \quad (20)$$

2.4.6 Bestimmung von Transportkoeffizienten

2.4.6.1 Bestimmungsprinzipien

In der industriellen Biotechnologie ermöglicht die Bestimmung von Transportkoeffizienten der Zielproteine in porösen Trägern eine effiziente Auslegung säulenchromatographischer Verfahren in Bioprocessen. Der Koeffizient wird dabei nahezu immer über die mathematische Anpassung der experimentellen Daten an mehr oder weniger komplexe Modellvorstellungen ermittelt. Diese für jedes adsorptive System charakteristische Größe beschreibt die Diffusivität, bzw. Mobilität des Proteins im porösen Netzwerk des Partikels (s. 2.2.4).

Ein poröses Adsorbermaterial ist eine heterogene Phase, die aus der festen Netzwerkstruktur des Partikels, die für das transportierte Protein nicht zugänglich ist und den flüssigkeitsgefüllten Zwischenräumen besteht (Westrin 1991). Das Partikel stellt sich somit für das Protein als Summe von unterschiedlich großen Mikrovolumina dar, die mehr oder weniger zugänglich sind. Aufgrund der Heterogenität der stationären Phase werden beim Transport in diesen Strukturen effektive Diffusivitäten $D(\text{eff})$ bestimmt, die sich im Gegensatz zum Transport, oder der Diffusion in freier Lösung nur auf das zugängliche Volumen in der porösen Struktur beziehen (Westrin 1991).

In der Literatur sind mehrere chromatographische und spektroskopische Methoden beschrieben, die eine Bestimmung effektiven Diffusivitäten ermöglichen (Westrin 1991; Janson und Ryden 1998). Die chromatographischen Methoden zur Bestimmung von effektiven Diffusivitäten, bzw. Transportparametern sind im Folgenden zusammengestellt:

- Analyse von Durchbruchkurven (Abb. 11 (A))
- Isokratische Elution (Puls-Antwort Experimente) (Abb. 11 (B))
- Batch-Adsorption im Rührreaktor (Abb. 11 (C))

Die Prinzipien der Bestimmungsmethoden sind in Abbildung 11 (A-C) gegenübergestellt.

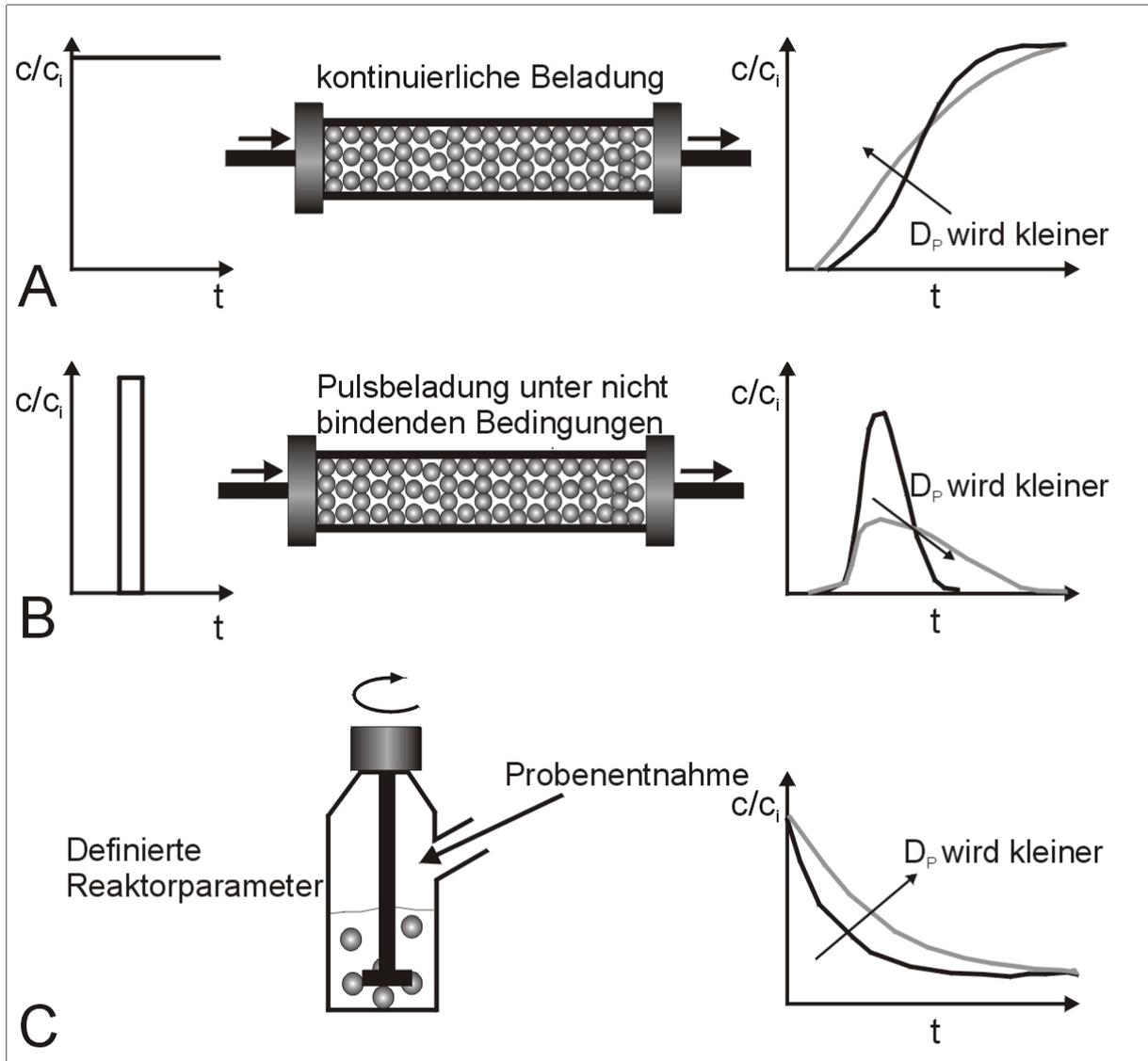


Abbildung 11: chromatographische Prinzipien zur Bestimmung von Transportkoeffizienten (A) Durchbruchkurvenanalyse; (B) Isokratische Elution (Puls-Antwort Experiment); (C) statische Adsorption im Rührreaktor

Zur Aufnahme einer Durchbruchkurve wird eine gefüllte Chromatographiesäule kontinuierlich mit einer Proteinlösung bekannter Konzentration beladen (Abb. 11 (A)). Die Konzentration am Säulenausgang wird spektroskopisch erfasst und zeigt den in Abbildung 11 (A) schematisch illustrierten Konzentrationsverlauf. Die Durchbruchkurve verändert sich in Abhängigkeit von der Mobilität der Moleküle in der Weise, dass ein langsamer Transport durch das poröse Netzwerk unter konstanten Strömungsbedingungen zu einem früheren und flacheren Durchbruch führt (Abb. 11 (A)).

Bei der Puls-Antwort-Methode wird im Gegensatz dazu unter nicht-bindenden Bedingungen ein kurzer, definierter Proteinpuls, bzw. eine bestimmte Menge Protein auf die Säule aufgegeben und wiederum der Konzentrationsverlauf am Säulenausgang detektiert (Abb. 11 (B)). In Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Transports durch die poröse Struktur

ergibt sich ein verändertes Konzentrationssignal am Säulenausgang. Eine geringere Mobilität der Proteine führt dabei zu einem verstärkten „Tailing“ des Konzentrationssignals (s. Abb. 11 (B)).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Bestimmung von Transportkoeffizienten die statische Adsorption im Rührreaktor verwendet (Abb. 11 (C)). Dabei wird ein thermostatisierter Rührreaktor mit einem bestimmten Volumen einer Proteinlösung bekannter Konzentration versetzt. Durch die Zugabe eines definierten Volumens einer Adsorbensuspension wird die Adsorptionskinetik gestartet. In der Folge wird der Konzentrationsverlauf in der Flüssigphase entweder, wie in dieser Arbeit durchgeführt, „off line“ durch die Probenentnahme zu verschiedenen Zeiten spektroskopisch erfasst, oder „on line“ durch eine Pumpenschleife mit Durchflussküvette bestimmt (Abb. 11 (C)). Alternativ kann zunächst über die Massenbilanz die Kapazität des Adsorbers berechnet und der Kapazitätsverlauf zur Anpassung verwendet werden. Je früher, bzw. schneller das Adsorptionsgleichgewicht erreicht ist, desto größer ist die Mobilität der Proteine im Adsorber, bzw. der ermittelte Transportkoeffizient.

Die mit den Methoden ermittelten Konzentrations-/Zeitprofile können an verschiedene Adsorptionsmodelle zur Bestimmung von effektiven Diffusivitäten angepasst werden. Die Modelle werden dazu mathematisch so modifiziert, dass sie den experimentellen Signalverlauf simulieren können. Auf die beiden in dieser Arbeit verwendeten Adsorptionsmodelle „Shrinking Core“ und „Homogeneous Diffusion“ wird in den folgenden Abschnitten noch ausführlich eingegangen werden. An dieser Stelle sei nochmals angemerkt, dass die Bestimmung der Transportparameter mit diesen Methoden nur **indirekt** erfolgt, da experimentelle Informationen über die Transportmechanismen und dem intrapartikulären Konzentrationsverlauf bisher nicht zugänglich waren. Den drei bisher beschriebenen, chromatographischen Verfahren zur Bestimmung von Transportkoeffizienten liegt ein Konzentrations-/Zeitprofil zugrunde (Westrin 1991).

Andere Verfahren generieren im Gegensatz dazu mehr ein Konzentrationslängenprofil. Im Verlauf des Proteintransportes ändert sich der Brechungsindex der Gelmatrix und mittels eines holographischen Laser-Interferometers kann die resultierende, konzentrationsabhängige Interferenz über eine ganze Fläche verfolgt und quantifiziert werden (Ruiz-Bevia et al. 1989; Mattisson et al. 1996).

Weitere spektroskopische Techniken stellen z.B. die dynamische Lichtstreuung oder die Pulsfeld-Kernmagnetische Resonanz (PF-NMR) dar, bei denen spektroskopisch, zeitliche Fluktuationen aufgrund der diffusiven Proteinbewegung (Selbstdiffusion) detektiert werden können (Sellen 1986; Sellen 1987; Gibbs et al. 1992; Coffmann et al. 1997).

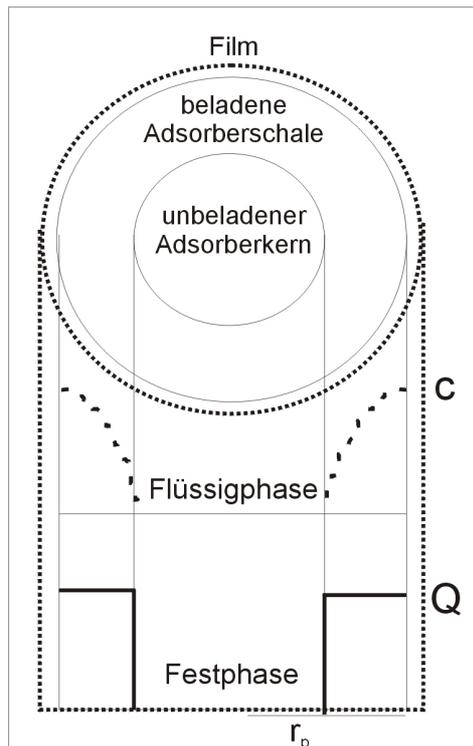
Mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie, auf die später ausführlich eingegangen wird, kann durch „Fluorescence Recovery After Photobleaching; FRAP) die Selbstdiffusion von Makromolekülen in verschiedenen porösen Gelen bestimmt werden. Bei diesem

Verfahren werden Fluoreszenzfarbstoffe an die zu untersuchenden Makromoleküle kovalent gebunden. Die fluoreszenzmarkierten Spezies werden in der Folge mit einer porösen stationären Phase inkubiert. Im Gleichgewicht werden mit Hilfe des Mikroskoplasers die Fluorophore der Proteine in einer bestimmten Region des Partikels irreversibel durch „Photobleaching“ zerstört. Mit Hilfe der Messanordnung wird danach die Zeit verfolgt in der sich die Fluoreszenzemission der „gebleachten“ Region wieder erholt (Recovery = Erholung; Wiederkehr). Diese Technik ist bereits als Grundlage vieler experimenteller Studien in porösen Materialien eingesetzt worden (Poitevin und Wahl 1988; Moussaoui et al. 1992; Morris et al. 1993; Cutts et al. 1995; Tong und Anderson 1996; De Smedt et al. 1997; Bryers und Drummond 1998; Gribbon und Hardingham 1998; Pluen et al. 1999).

An dieser Stelle sei angemerkt, dass mit FRAP, genau wie mit den beschriebenen spektroskopischen Methoden (Dynamische Lichtstreuung und Pulsfeld-NMR) nur die Selbstdiffusion von Molekülen in stationären Phasen verfolgt werden kann. Die Untersuchung des Proteintransports mit diesen Methoden sind für adsorbierende, stationäre Phasen zur Zeit nur unter weitgehend, nicht bindenden Bedingungen möglich. In der industriellen Biotechnologie finden deshalb vorwiegend die chromatographischen Methoden zur Bestimmung der Transportkoeffizienten Anwendung. In der Literatur sind, wie bereits erwähnt, mehrere mehr oder weniger komplexe Modelle beschrieben, die zur Bestimmung der effektiven Diffusivitäten verwendet werden können (Arnold et al. 1985; Arve und Liapis 1987; Skidmore et al. 1990; Yoshida et al. 1994; Chang und Lenhoff 1998). Im Folgenden wird auf die beiden in dieser Arbeit verwendeten Modelle detaillierter eingegangen.

2.4.6.2 „Shrinking Core“ Adsorptionsmodell

Das „Shrinking Core“ Modell von Yagi und Kuni zur Simulation von sehr günstigen Bindungskonditionen war ursprünglich zur Beschreibung von nicht katalytischen Flüssig- und Festphasenreaktionen gedacht (Yagi und Kunii 1955; Levenspiel 1984). Das Modell postuliert, dass eine steile Reaktionsfront beginnend an der Partikeloberfläche sich mit zunehmender Adsorptionsdauer weiter ins Partikel zieht, bevor die beiden Fronten unmittelbar vor Eintreten des Adsorptionsgleichgewichts zusammentreffen (Slater 1992). In Abbildung 12 ist schematisch das Modellprinzip aufgezeigt:



Annahmen des „Shrinking Core“ Modells:

- Nahezu irreversible Adsorption (rechtwinklige Isotherme)
- Der Gleichgewichtsparameter R^* ist $< 0,3$
- Der Transport im Partikel erfolgt ausschließlich im Porenwasser
- In der beladenen Adsorberschale herrscht Sättigungsgleichgewicht
- Der Filmtransport wird vernachlässigt

Abbildung 12: Prinzip des „Shrinking Core“ Modells. Modifiziert nach (Ruthven 1984)

Eine analytische Lösung des „Shrinking Core“ Modells zur Bestimmung von effektiven Porentransportkoeffizienten $D_P(\text{eff})$ bei weitgehend irreversibler Gleichgewichtslage ist von Ruthven ermittelt worden (Ruthven 1984):

$$1 - F(t) = 1 - \frac{Q}{Q^{\text{eq}}} = \left\{ \frac{1}{2} + \cos \left[\frac{\pi}{3} + \frac{1}{3} \arccos \left(1 - \frac{2 \cdot t}{\tau} \right) \right] \right\}^3 \quad (21)$$

Die stöchiometrische Zeit τ , bei der sich der „Fractional Approach to Equilibrium“ $Q/Q^{\text{eq}} = 1,0$ zu ergibt, ist wie folgt definiert:

$$\tau = \frac{1}{6} \cdot \frac{r_p^2}{\varepsilon_p \cdot D_P(\text{eff})} \cdot \left(\frac{Q}{c_i} \right) \quad (22)$$

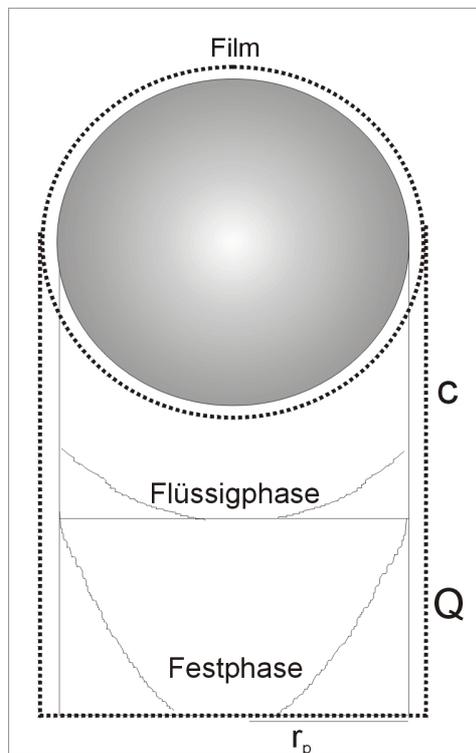
Die im Rahmen von experimentellen Adsorptionsstudien erhaltenen normierten Kapazitätsverläufe ($F(t)$ „Fractional Approach to equilibrium“) lassen sich mit diesem Gleichungssystem über nicht lineare Regression an einen effektiven Porentransportkoeffizienten $D_P(\text{eff})$ [m^2/s] anpassen.

2.4.6.3 „Homogeneous Diffusion“ Adsorptionsmodell

Beim Homogeneous Diffusion Modell wird das gesamte Protein im Partikel, ob nun frei im Porenwasser oder adsorbiert an die stationäre Phase zu einem einzigen Konzentrationsparameter $Q^{tot}(t,r)$ zusammengefasst. Der Transport im Partikel wird als Diffusion entlang eines Beladungsgradienten angenommen und ist durch die folgende Gleichung definiert:

$$\frac{\partial Q^{tot}}{\partial t} = \frac{D_H(\text{eff})}{r_p^2} \cdot \frac{\partial}{\partial r_p} \cdot r^2 \left(\frac{\partial Q^{tot}}{\partial r_p} \right) \quad (23)$$

In der Literatur wurde in mehreren Proteinadsorptionsstudien dieses Modell verwendet z.B. (Weaver und Carta 1996; Chang und Lenhoff 1998; Wright et al. 1998).



Annahmen des „Homogeneous Diffusion“ Modells:

- Nahezu irreversible Adsorption (rechtwinklige Isotherme)
- Der Gleichgewichtsparameter R^* ist $< 0,3$
- Die Triebkraft des Transportes stellt ein Kapazitätsgradient ($\partial Q^{tot}/\partial r_p$) dar
- Der Kapazitätsgradient Q^{tot} verläuft steiler als der Gradient in der Flüssigphase
- Der Filmtransport wird vernachlässigt

Abbildung 13 Prinzip des „Homogeneous Diffusion“ Modells

In der Literatur ist für dieses Adsorptionsmodell eine Näherungslösung beschrieben, die für annähernd irreversible Gleichgewichtslagen gilt (Gl. 24) (Slater, 1992)

$$F(t) = \frac{Q}{Q^{eq}} \equiv \left(1 - \exp \left(\pi^2 \cdot \left(-\left(\frac{t}{\tau} \right) + \left(\frac{t}{\tau} \right)^2 - 2,92 \cdot \left(\frac{t}{\tau} \right)^3 \right) \right) \right)^{0,5} \quad (24)$$

Die stöchiometrische Zeit τ ist dabei wie folgt definiert:

$$\tau = \frac{r_p^2}{D_H(\text{eff})} \quad (25)$$

Mit Hilfe dieses Gleichungssystems können experimentelle Daten aus Batchadsorptionszeitverläufen ($F(t)$ „Fractional Approach to equilibrium“) angepasst und ein effektiver Transportkoeffizient $D_H(\text{eff})$ [m^2/s] ermittelt werden.

2.5 Fluoreszenz und Konfokale Laser Raster Mikroskopie

2.5.1 Physik der Fluoreszenz und Desaktivierungsprozesse

Vorgänge, bei denen ein durch Absorption angeregtes Molekül durch Emission von Lichtquanten, bzw. elektromagnetischer Strahlung wieder in seinen Grundzustand zurückkehrt, bezeichnet man als Lumineszenz. Fluoreszenzemission ist eine Lumineszenzvariante geeigneter Moleküle, die durch spontane Emission von Lichtquanten in den Grundzustand übergehen.

Im energetischen Grundzustand eines Moleküls mit gerader Elektronenzahl sind die niedrigsten Energieniveaus in der Regel paarweise mit Elektronen antiparallelen Spins besetzt. Der Gesamtspin des Moleküls ist dann Null und der zugehörige Zustand wird gemäß seiner Multiplizität als Singulettzustand (S_0) bezeichnet. Jeder elektronische Energiezustand besteht aus einer Anzahl energetisch dicht beieinanderliegender Schwingungsniveaus. Bei Raumtemperatur liegen praktisch alle Moleküle im niedrigsten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes S_0 vor.

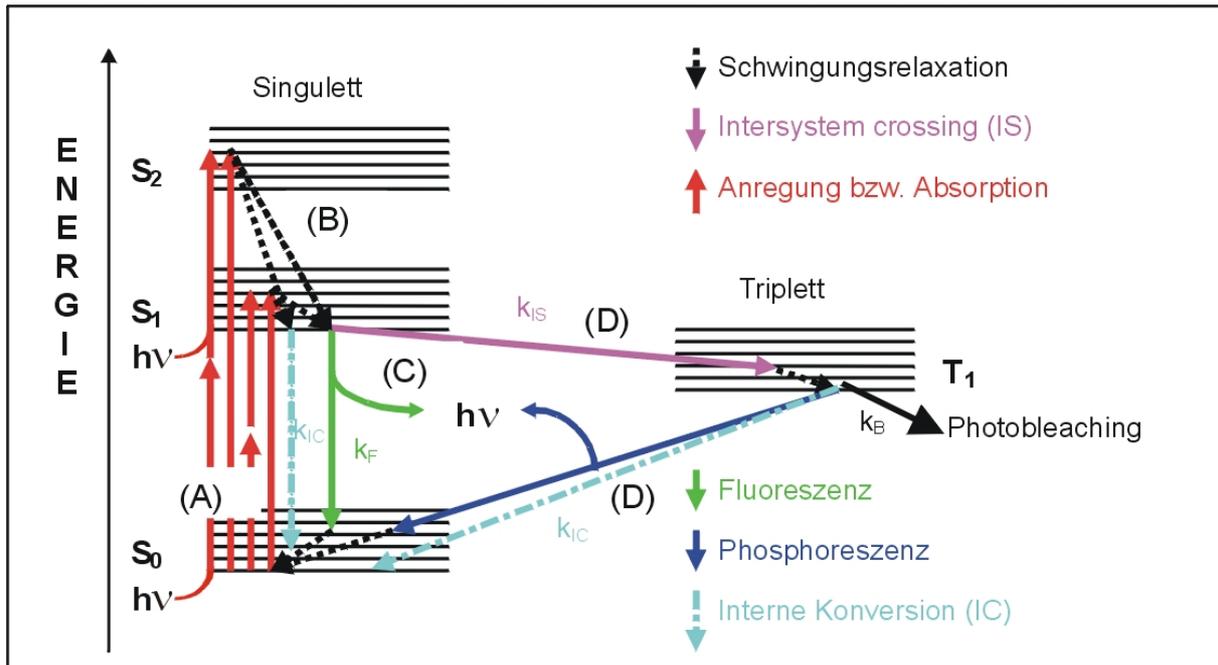


Abbildung 14: Jablonski Diagramm. Modifiziert nach (Cantor und Schimmel 1980)

(A) Anregung (Absorption):

- Ein-Photonenanregung:

Durch Absorption eines Lichtquants geeigneter Energie kann nun ein Elektron in ein höheres Energieniveau angeregt werden. Bleibt dabei die Spinorientierung erhalten, so handelt es sich wiederum um einen Singulettzustand (S_1, S_2, S_3, \dots), tritt zusätzlich Spinumkehr ein, ein Prozess, der quantenmechanisch verboten ist und daher eine äußerst geringe Wahrscheinlichkeit besitzt, so entsteht ein Triplettzustand (T_1, T_2, T_3, \dots) (D). Die Dauer des Absorptionsvorgangs beträgt ca. 10^{-15} s. Elektronische Übergänge sind im Vergleich zu Kernbewegungen sehr schnell und der Kern verbleibt während der Absorption praktisch in Ruhe. Die Elektronenübergänge erfolgen demnach vertikal linear (Franck-Condon-Prinzip).

Die Anregung erfolgt immer in ein höheres Schwingungsniveau des angeregten Zustandes (S_1, S_2, \dots), da der Gleichgewichtskernabstand des angeregten Zustands stets größer als der des Grundzustandes ist.

- Zweiphotonen-, bzw. Multiphotonenanregung:

Beim Vorhandensein eines geeigneten Zeit/Raumfensters kann sich die Energie zweier Photonen addieren und zur Anregung von einem Elektron in einen höheren Singulettzustand S_1 führen. Der Effekt wurde 1931 weit vor seiner ersten experimentellen Beobachtung von Maria Göppert-Mayer postuliert (Göppert-Mayer

1931). Erst ca. 30 Jahre später durch die Einführung leistungsstarker Laser konnte dieses Phänomen auch experimentell nachgewiesen werden (Pawley 1995).

Voraussetzung für eine Zweiphotonenanregung ist, dass zwei energieärmere Photonen in einem Zeitfenster von 1 Femtosekunde (10^{-15} Sekunden) am gleichen Ort das Elektron in ein höheres Energieniveau überführen. So würden zwei Photonen einer Wellenlänge von 992 nm ein Fluorophor anregen, das „normalerweise“ bei 496 nm Lichtquanten absorbiert.

(B) Schwingungsrelaxation:

Durch Temperatúrausgleich mit der Umgebung kommt es zur Schwingungsrelaxation auf das energetisch niedrigste Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustands (S_1). Aufgrund der geringeren Energiedifferenzen bei der Schwingungsrelaxation im Vergleich zur Fluoreszenz ist der Relaxationsprozess mit einer Geschwindigkeit von 10^{-12} bis 10^{-10} s deutlich schneller (Fluoreszenzprozess $> 10^{-8}$ s).

(C) Fluoreszenzemission:

Auch bei der Desaktivierung durch Fluoreszenz bewegt sich der Kern praktisch nicht, so dass zunächst wieder ein höheres Schwingungsniveau des Grundzustandes (S_0) erreicht wird, das schließlich strahlungslos auf das unterste Schwingungsniveau relaxiert (B). Die emittierten Lichtquanten der Fluoreszenz sind im Vergleich zur absorbierten Strahlung energieärmer, das Emissionslicht ist folglich gegenüber dem Anregungslicht rotverschoben. Desaktivierungsprozesse verringern die Lebensdauer des angeregten Zustandes und führen dazu, dass die tatsächliche Fluoreszenzlebensdauer τ_F in der Regel geringer als die intrinsische Fluoreszenzlebensdauer τ_R (Gl. 26) ist:

$$\tau_R = \frac{1}{k_F} \quad (26)$$

$$\tau_F = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{IS} + k_q[Q] + k_B + k_T}$$

Als Maß für den Anteil der Fluoreszenz an den Desaktivierungsprozessen definiert man die Quantenausbeute ϕ_F , die von der Art des Fluorophors und von den experimentellen Bedingungen (Polarität des Lösungsmittels, pH-Wert etc.) abhängt:

$$\phi_F = \frac{\text{Emittierte Photonen}}{\text{Absorbierte Photonen}} = \frac{k_f}{k_f + k_{IC} + k_{IS} + k_q[Q] + k_B + k_T} = \frac{\tau_F}{\tau_R} \leq 1 \quad (27)$$

(D) konkurrierende Desaktivierungsprozesse:**- Interkombinationsübergang**

Der spontane, strahlungslose Übergang eines Elektrons vom Singulett- in den entsprechenden Triplettzustand heißt Interkombinationsübergang („intersystem crossing“ IS) und verläuft mit einer sehr geringen Übergangsrate k_{IS} , da er zwar energetisch günstig, jedoch quantenmechanisch verboten ist. Triplettzustände besitzen im allgemeinen eine längere Lebensdauer (10^{-3} s bis mehrere Stunden) als die entsprechenden Singulettzustände. Die Desaktivierung vom energetisch niedrigsten Triplettzustand T_1 unter Abgabe von Lichtquanten wird als Phosphoreszenz bezeichnet.

- Interne Konversion

Ein strahlungsloser Desaktivierungsprozess, der neben der Fluoreszenz mit der Rate k_{IC} ablaufen kann, ist die interne Konversion (inner conversion IC). Bei diesem Vorgang kommt es entweder durch Kollision mit Lösungsmittelmolekülen oder durch Streuung an internen Schwingungsniveaus zum Verlust von Anregungsenergie. Das Ausmaß k_{IC} der internen Konversion ist stark temperaturabhängig und erhöht sich mit steigender Temperatur. Aus diesem Grund sinkt die Quantenausbeute ϕ_F der Fluoreszenz mit steigender Temperatur.

Fluoreszenzlöschung durch andere Moleküle:**- Fluoreszenzlöschung**

Durch den Stoß oder Komplexbildung mit anderen Molekülen, die sich in der Lösung (oder der gasförmigen Phase über der Lösung) befinden, kommt es zu einem Verlust an Anregungsenergie. Diese Löschung wird bei der Berechnung der Quantenausbeute in der Rate k_q berücksichtigt und ist abhängig von der Konzentration des Löschermoleküls oder „Quenchers“ [Q]. Quenchermoleküle sind z.B. Iodid, Acrylamid und vor allem O_2 .

- Desaktivierung durch irreversible Zerstörung (Photobleaching)

Aus dem Schema nach Jablonksi folgt, dass die Fluoreszenz theoretisch ein reversibler Vorgang ist. Die Fluorophormoleküle stehen nach Emission der Lichtquanten wieder zur erneuten Anregung zur Verfügung. Trotzdem wird in der Fluoreszenzspektroskopie und besonders bei der konfokalen Mikroskopie eine Abnahme der messbaren Fluoreszenzintensität einer Probe nach mehrmaliger Exposition mit Anregungslicht beobachtet. Der Prozess des sogenannten

„Photobleachings“ ist noch nicht vollständig verstanden. Zur Zeit geht man davon aus, dass vom Triplettzustand T_1 ausgehend eine Reaktion mit molekularem Sauerstoff das Fluorophormolekül irreversibel desaktiviert (s. Abb. 14). Es entsteht eine nicht-fluoreszierende Spezies des Farbstoffs (Pawley 1995). „Photobleaching“ tritt mit jeder Exposition der Probe auf und ist stark von den experimentellen Bedingungen (Anregungsintensität, Lösungsmittel, pH-Wert, Zusätze) abhängig.

- Fluoreszenzlöschung durch Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)

Beim Fluoreszenzresonanzenergietransfer, bzw. Förster-Transfer (Abb. 15) handelt es sich um einen Löschprozess mit Energieübertragung zwischen geeigneten Donor- (D) und Akzeptormolekülen (A). Verantwortlich für die Energieübertragung ist eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung der Übergangsdipolmomente zwischen einem angeregten Donormolekül (D) und einem geeigneten Akzeptormolekül (A) im Grundzustand. Da die Übertragung zwischen Singulettzuständen erfolgt, wird dieser Energietransfer auch als Singulett-Singulett-Transfer bezeichnet (s. Abb. 15).

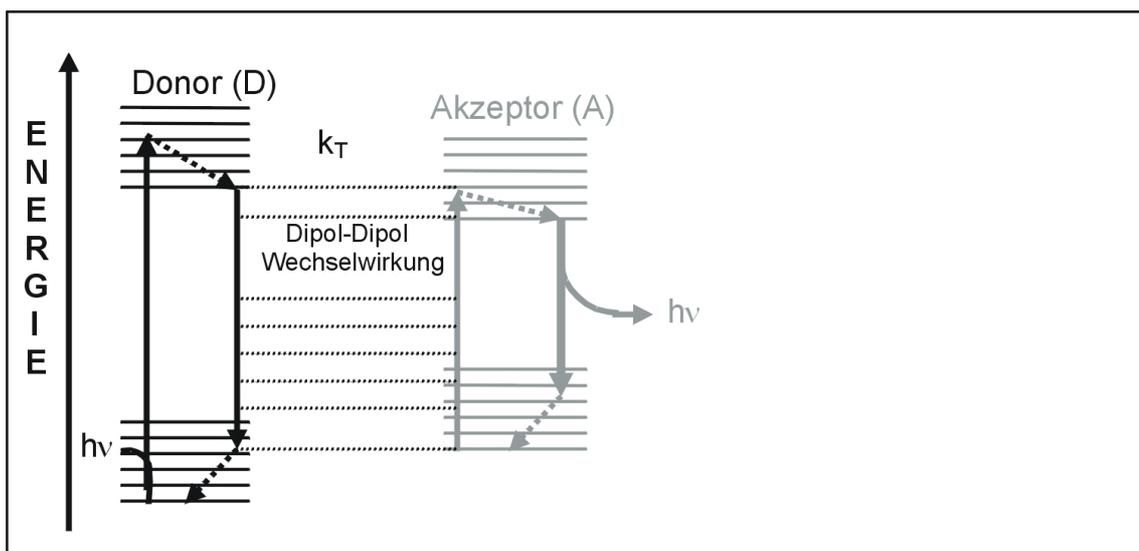


Abbildung 15: Mechanismus des Singulett Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET), bzw. Förster Transfers

Allgemein müssen für diese Form der Energieübertragung folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- Partielle Überlappung des Donor-Emissionsspektrums mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors
- Geeignete Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor (D) und Akzeptor (A) zueinander
- Geeigneter Abstand zwischen Donor und Akzeptor Für eine effiziente Übertragung muss der Abstand in einem bestimmten Bereich liegen (normalerweise < 10 nm), da für Dipol-Dipol-Wechselwirkungen eine R^6 -Abstandsabhängigkeit gilt

Wenn die Donoremissionsenergie mit der Akzeptorabsorptionsenergie übereinstimmt kann es unter oben genannten Bedingungen zum Energietransfer mit der Rate k_T kommen, der schneller als die Donorfluoreszenz ist. Ist der Akzeptor ein Fluorophor so wird seine Quantenausbeute ϕ_A durch Förster-Transfer erhöht, während die Quantenausbeute des Donors durch die Rate k_T erniedrigt wird.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Protein BSA findet zum Beispiel ein intramolekularer Förster-Transfer der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin auf den Akzeptor Tryptophan statt.

Die Effizienz E des Transfers ergibt sich als Anteil der Übergänge des Donors (D) in den Grundzustand durch Förster-Transfer bezogen auf alle Desaktivierungsprozesse:

$$E = \frac{k_T}{k_T + k_F + k_{IC} + k_{IS} + k_q[Q] + k_B} = \frac{\text{transferierte Photonen}}{\text{absorbierte Photonen}} \quad (28)$$

Die Transferrate k_T ist abhängig von der Fluoreszenzlebensdauer des Donors τ_D , dem Abstand R zwischen Donor und Akzeptor und dem charakteristischen Abstand R_0 . Dem Mechanismus der Energieübertragung liegt eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung zugrunde, die sich durch eine R^6 -Abstandsabhängigkeit auszeichnet:

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_{0T}}{R_T} \right)^6 \quad (29)$$

Aus dem Absorptionsspektrum des Akzeptors und den Fluoreszenzspektren des Donors in An- und Abwesenheit des Akzeptors lässt sich der mittlere Abstand zwischen Donor und Akzeptormolekül im Bereich < 10 nm bestimmen.

2.5.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorophore sind Moleküle, die Fluoreszenzemission in messbarem Ausmaß zeigen. Sie besitzen in der Regel aromatische oder heterozyklische π -Systeme (Cantor und Schimmel 1980). Natürliche Fluorophore der Proteine sind neben fluoreszierenden Coenzymen und prostetischen Gruppen (z.B. red. NADH + H⁺, FADH₂ und Häm-Gruppen) die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und vor allem Tryptophan.

Ein natürlich fluoreszierendes Protein, das Fluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich emittiert, ist das „Green fluorescent protein (GFP)“ von der Meduse *Aequorea Victoria*. Das Gen dieses Proteins ist kloniert worden und kann in andere Organismen transfiziert werden. Dadurch können subzelluläre Regionen in einem Organismus lokalisiert werden, in denen ein spezielles Zielgen exprimiert wird. Es sind mehrere unterschiedliche Spezies mit unterschiedlichen, spektralen Eigenschaften beschrieben. (Heim et al. 1994; Heim et al. 1995; Heim und Tsien 1996)

Weiterhin können, wie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, Fluoreszenzfarbstoffe an Proteine gekoppelt werden, um diese selektiv zu markieren und nachweisen zu können. Für die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie ist eine solche kovalente Kopplung oft Voraussetzung, da nur wenige kommerziell erhältliche Geräte in der Lage sind, die Tryptophanfluoreszenz spezifisch anzuregen. Auf die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe wird später eingegangen.

2.5.3 Fluoreszenzspektroskopie und limitierende Faktoren

2.5.3.1 Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

In Abbildung 16 ist exemplarisch ein Fluoreszenzspektrometer gezeigt, wie es im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kam. Fluoreszenzemissionen werden dabei senkrecht zur Anregungsrichtung gemessen, da dort die Streuung des Anregungslichtes am geringsten ist (Cantor und Schimmel 1980).

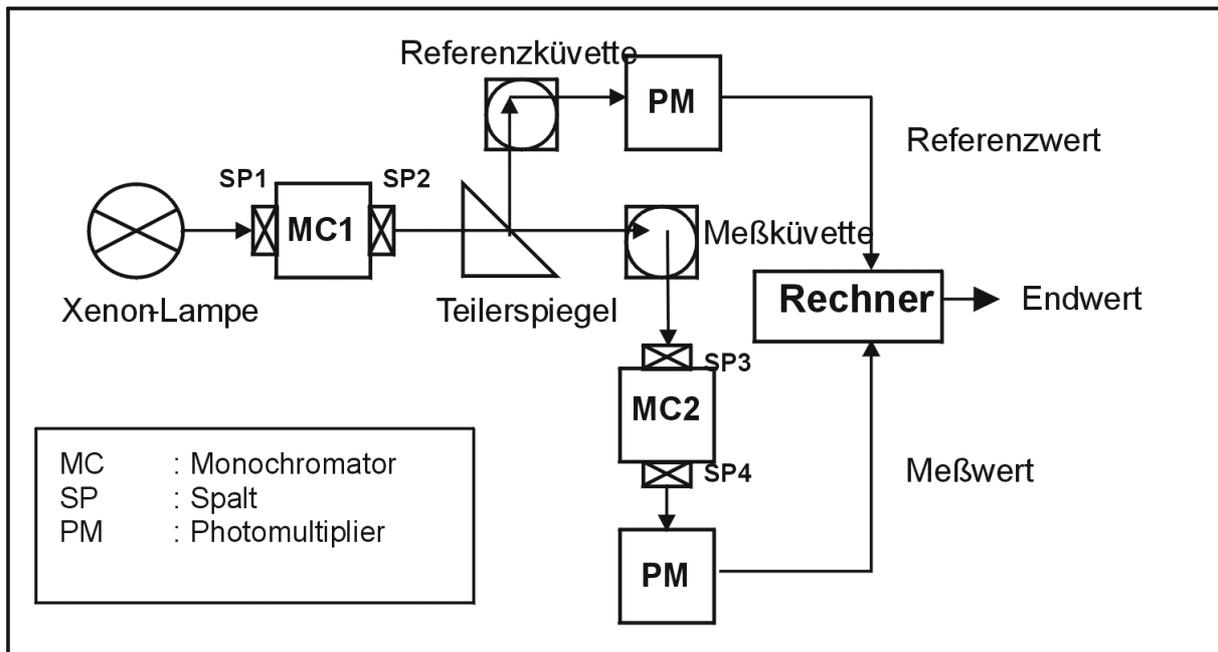


Abbildung 16: Exemplarischer Aufbau eines typischen Fluoreszenzspektrometers (MC Monochromator; SP Spalt; PM Photomultiplier)

Die Fluoreszenzintensität wird oft als relativer Wert im Vergleich zur Emission einer Referenzsubstanz bestimmt.

2.5.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der messbaren Fluoreszenzintensität

Im Rahmen der Fluoreszenzspektroskopie, wie auch der quantitativen, konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie, ist für eine Konzentrationsbestimmung der fluoreszierenden Spezies ein linearer Arbeitsbereich unbedingte Voraussetzung. Aufgrund von „inner filter“- und Reabsorptionseffekten stellt sich in realen Lösungen die in Abbildung 17 simulierte Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenzemission dar. Nach einer linearen Anstiegsphase kommt es mit zunehmender Fluorophorkonzentration zu einem hyperbolischen Intensitätsverlauf. In hoch konzentrierten Lösungen kann die messbare Fluoreszenzintensität aufgrund der beiden Effekte wieder absinken.

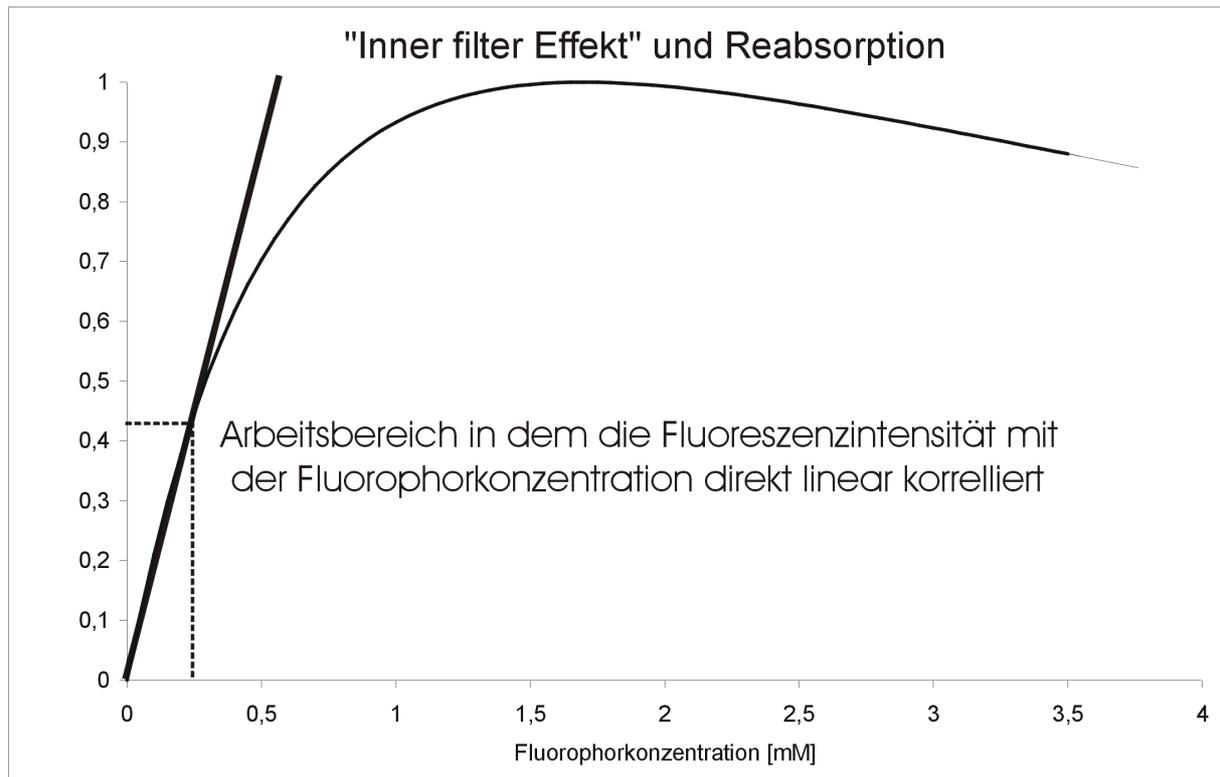


Abbildung 17: simulierte Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Fluorophorkonzentration

- „inner filter“ Effekt

Der „inner-filter“ Effekt ergibt sich bei Fluoreszenzmessungen in der konventionellen Fluoreszenzspektroskopie aus der Messgeometrie bei konzentrierteren Lösungen. Aufgrund der höheren optischen Dichte der konzentrierteren Lösung wird ein Großteil des Lichts unmittelbar nach Eintritt in die Lösung absorbiert. Die Fluoreszenzemission kann jedoch an dieser Stelle aufgrund der Messgeometrie im Fluoreszenzspektrometer nicht detektiert werden (s. Abb. 16). In den Bereich des Messfensters strahlt folglich weniger Anregungslicht ein und weniger Absorptions- und Emissionsvorgänge finden statt. Die Quantenausbeute sinkt mit zunehmender Konzentration und es entsteht die gezeigte Abweichung von der Linearität des Fluoreszenzsignals (s. Abb. 17).

- Reabsorption

Das Anregungs- und Emissionsspektrum eines Fluorophors besitzen in der Regel einen Überlappungsbereich. Physikalisch bedeutet dies, dass emittierte Fluoreszenzstrahlung im Wellenlängen-, bzw. Energiebereich der Überlappung zur erneuten Anregung von Fluorophoren energetisch fähig ist. Mit zunehmender Konzentration steigt die Wahrscheinlichkeit das Fluorophormoleküle die Wege der emittierten Lichtquanten kreuzen und emittierte Fluoreszenz löschen. Dieser Effekt führt ebenfalls zu einer erniedrigten Quantenausbeute im Verhältnis zur Fluorophorkonzentration.

2.5.4 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

2.5.4.1 Komponenten eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops

In Abbildung 18 sind die typischen Komponenten eines kommerziell erhältlichen Konfokalmikroskops aufgeführt, die zur Bildgebung, Datenerfassung und -transfer bzw. Ausgabe nötig sind.

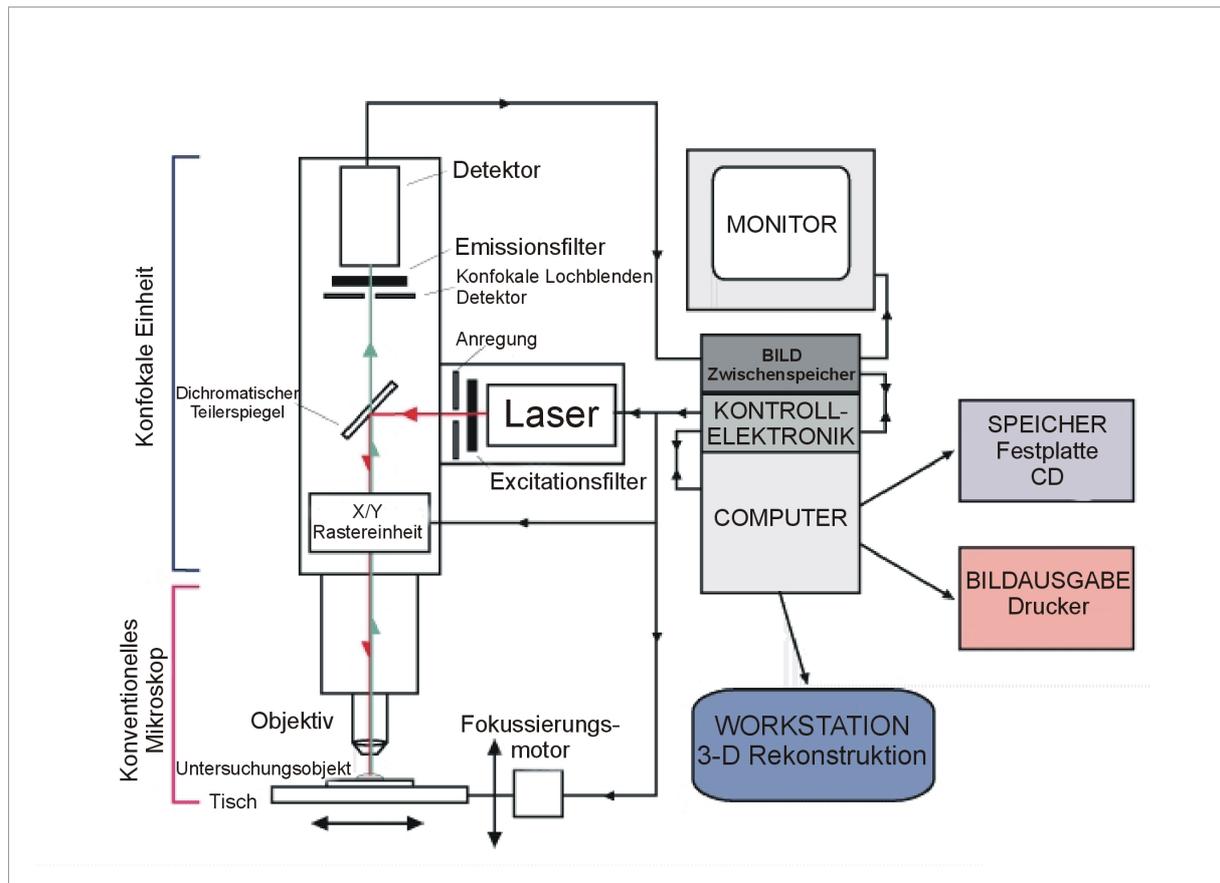


Abbildung 18: Komponenten eines typischen Konfokalmikroskops. Modifiziert nach <http://www.cs.ubc.ca/spider/ladic/overview.html>

Neben einem konventionellen Mikroskop und einer konfokalen Einheit zur Bildgebung gehören eine Computereinheit mit Kontrollelektronik, ein Monitor, sowie Speichermedien und Bildausgabeeinheiten zur Ausstattung eines Konfokalmikroskops.

2.5.4.2 Prinzipien der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie

Mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie ist es möglich, emittierte Fluoreszenzstrahlung mit hoher lokaler Auflösung abzubilden, da nur die Fluoreszenz zur Bildgebung verwendet wird, die unmittelbar aus der Fokusebene emittiert wird. Die ersten

Mikroskope, die eine konfokale Bildgebung gewährleisten, gehen auf Minsky zurück, der durch die Einführung konfokaler Lochblenden die hohe lokale Auflösung realisierte (Minsky 1957; Minsky 1988). In Abbildung 19 ist schematisch der Strahlengang eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops gezeigt.

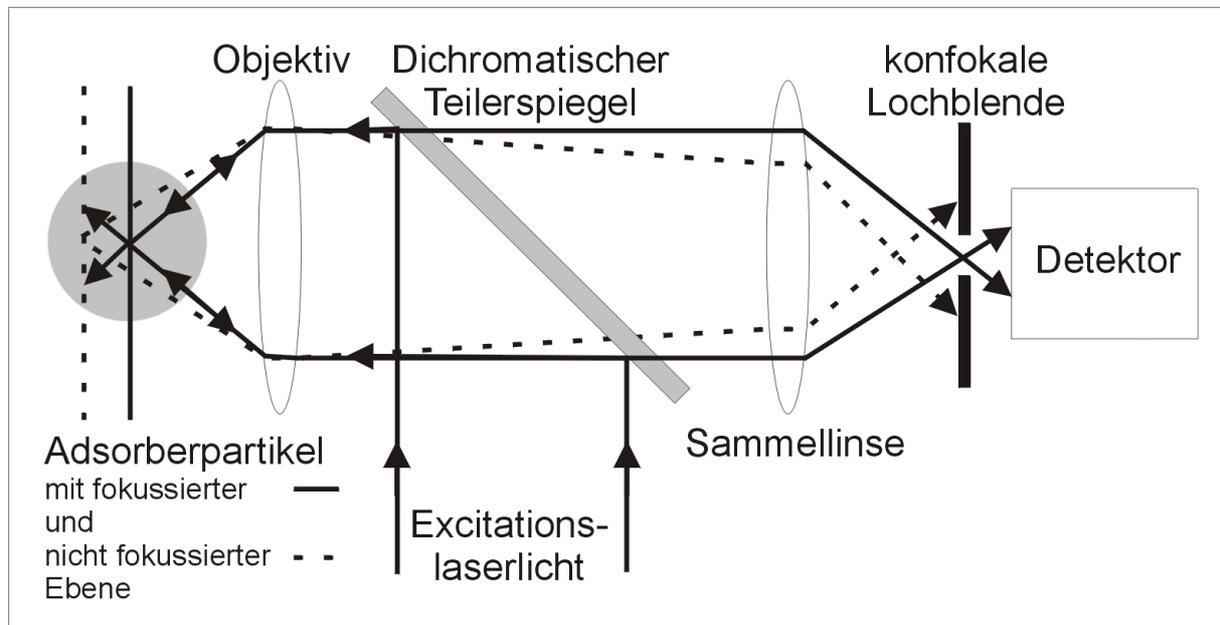


Abbildung 19: Erzeugung einer konfokalen Auflösung mit Hilfe einer konfokalen Lochblende

Das von einem Laser emittierte Licht wird über einen Teilerspiegel und mit Hilfe eines Objektivs in einer bestimmten Ebene im Untersuchungsobjekt konzentriert. Während selbstverständlich alle Fluorophore die sich im Lichtweg befinden angeregt werden, wird die maximale Anregung und damit auch Emission von Licht im Fokuspunkt erreicht.

Eine konfokale Lochblende, die der Detektoreinheit vorgeschaltet ist, ermöglicht, dass nur emittiertes Licht aus der Fokusebene detektiert wird, während Fluoreszenzemissionen von Ebenen unter- und oberhalb der Fokusebene effizient „ausgeblendet“ werden (Abb. 19).

Bei Konfokalmikroskopen neuerer Bauart, die im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen, werden keine konfokalen Lochblenden mehr benötigt. Bei diesen Geräten wird die Konfokalität durch Zwei- bzw. Multiphotonenanregung (s. 2.5.1) der Fluorophore in der Fokusebene erreicht (Denk et al. 1990; Denk et al. 1991). Im Gegensatz zur Einphotonenanregung hängt die Multiphotonenanregung vom Quadrat der Anregungsintensität ab. Folglich erniedrigt sich die Anregungswahrscheinlichkeit ungefähr mit dem Quadrat des Abstandes. Demnach werden bei diesem nicht linearen Prozess nur die Fluorophormoleküle angeregt, die sich unmittelbar in der fokussierten Ebene befinden. Das Prinzip besitzt in bezug auf ein stark erniedrigtes „Photobleaching“ (die Einzelphotonen sind zu energiearm) Vorteile gegenüber der konventionellen Konfokalmikroskopie, ist aber

aufgrund der nötigen Laserausstattung zur Zeit noch wesentlich kostenintensiver. Zur Realisierung der Zwei-Photonenanregung wird ein gepulster Titan/Saphirlaser (Puls < 100 fs) verwendet, der die für die Anregung nötige räumliche und zeitliche Photonendichte erzeugen kann (Pawley 1995).

Eine konfokale Aufnahme entsteht durch eine Rastereinheit, die den Laser mäanderförmig durch die fokussierte Objektebene eines Untersuchungsobjektes, bzw. Adsorberpartikels führt. Die Detektion der emittierten Fluoreszenzstrahlungen erfolgt in zweidimensionalen Bildelementen, sogenannten Pixeln, von definierter Größe. Diese erlauben eine maßstabgetreue Abbildung der Objektebene und ermöglichen die Bestimmung absoluter Abstände im Untersuchungsobjekt.

Das Konfokalbild wird vom Computer als Mosaik dieser Bildelemente generiert, wobei viele Pixel in x-Richtung eine Zeile- und viele Zeilen in y-Richtung letztendlich die komplette Aufnahme bilden. Die einzelnen Pixel des Bildes enthalten lokal aufgelöste Fluoreszenzinformation, die durch einen Farbcode dargestellt wird.

2.5.4.3 Parallele Detektion mehrerer Fluorophore

In der konfokalen Mikroskopie wird zur parallelen Abbildung verschiedener Komponenten mit mehreren Detektoren gearbeitet. Bei Verwendung unterschiedlicher Fluorophore mit einer möglichst geringen spektralen Überlappung und einer geeigneten Laserausstattung kann durch eine bestimmte Messanordnung mit bis zu drei Detektoren die Fluoreszenzemission unterschiedlicher Wellenlänge getrennt voneinander und nahezu zeitgleich detektiert werden.

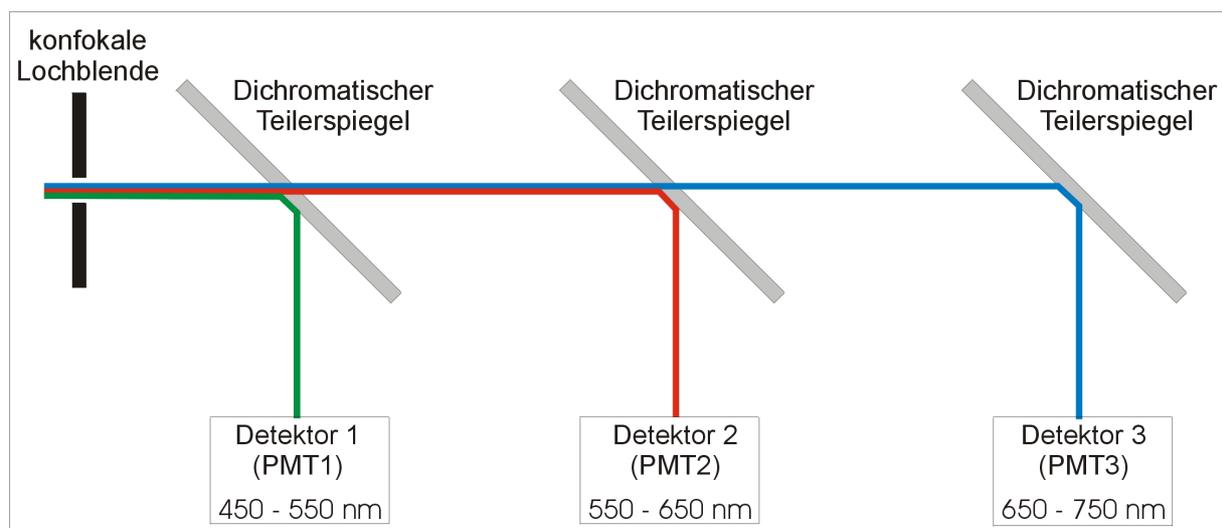


Abbildung 20: Schematischer Strahlengang zur Trennung von Fluoreszenzemissionen verschiedener Wellenlängen

Die Gesamtfluoreszenzemission wird dabei durch weitere dichromatische Teilerspiegel in der Weise gefiltert, dass nur die gewünschte Emission auf den entsprechenden Detektorkanal, bzw. Photomultiplier trifft (Abb. 20).

2.5.4.4 Laterale und axiale Auflösung

Die kleinste optische Trennung zweier Punktobjekte im Bild wird in der Mikroskopie als limitierende Auflösung bezeichnet. In der konfokalen Mikroskopie wird zwischen der lateralen Auflösung d_{xy} , die senkrecht zur - und der axialen Auflösung d_z , die entlang der optischen Achse bestimmt wird, unterschieden. Dem Rayleighkriterium (Gl. 30) folgend gelten zwei Punkte als getrennt aufgelöst, wenn das Zentrum der einen „Airy disk“ mit dem ersten Minimum der „Airy disk“ des zweiten Punktes zusammenfällt (s. Abb. 21).

Laterale Auflösung d_{xy} :

Der Radius einer „Airy disk“ ist durch den Abstand zwischen Zentrum und dem ersten Minimum der „Airy disk“ definiert. Er ist gleich der lateralen Auflösung d_{xy} eines Objektivs in der konventionellen Lichtmikroskopie:

$$r_{\text{airy}} = d_{xy} = \frac{0,61 \cdot \lambda_{\text{Em.}}}{NA_{\text{Objektiv}}} \quad (30)$$

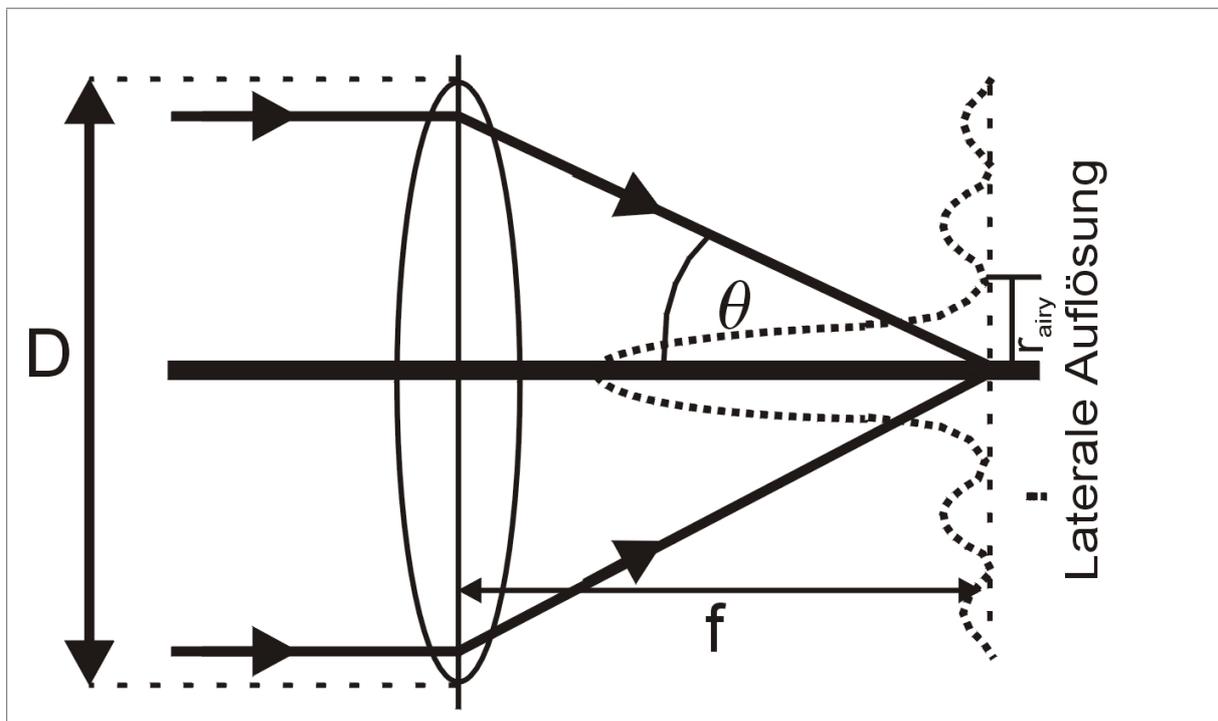


Abbildung 21: Laterale Auflösung und numerische Apertur NA. Modifiziert nach (Pawley 1995)

$$NA = n_B \cdot \sin \theta \quad (31)$$

NA ist dabei die numerische Apertur des Objektivs, die dem Produkt aus dem Brechungsindex n_B im und dem Sinus θ des Halbwinkels entlang des vom Objektiv produzierten Lichtkegels entspricht (s. Abb. 21).

Die laterale Auflösung eines Mikroskops hängt auch vom Beobachtungsfeld ab. Bei Konfokalmikroskopen ist bei kleinster konfokaler Lochblende das Beobachtungsfeld stark verkleinert und die laterale Auflösung steigt ca. um den Faktor $\sqrt{2}$ (Pawley 1995) und Gl. 32).

$$\text{Konfokale laterale Auflösung } d_{xy} = \frac{r_{\text{airy}}}{\sqrt{2}} = \frac{1}{1,4} \cdot \frac{0,61 \cdot \lambda_{Em}}{NA} = \frac{0,44 \cdot \lambda_{Em}}{NA} \quad (32)$$

Experimentell kann die laterale Auflösung durch konfokalmikroskopische Vermessung eines geeigneten Untersuchungsobjektes, z. B. einer Serie horizontaler und vertikaler Linien mit bekanntem Abstand, bestimmt werden.

Axiale Auflösung d_z :

Ein Konfokalbild repräsentiert nur die Fluoreszenzintensitätsinformation die unmittelbar und aus der „unmittelbareren Nähe“ der fokussierten Ebene stammt. Die axiale Auflösung d_z definiert die „unmittelbare Nähe“ in optischer z-Richtung (in Richtung des Strahlenganges). Pawley gibt in seinem „Handbook of biological confocal microscopy“ mehrere mathematische Beziehungen an, die zur Berechnung der axialen Auflösung verwendet werden können (Pawley 1995). An dieser Stelle sollen nur die beiden wichtigsten und am häufigsten gebrauchten Gleichungen genannt werden:

$$\text{Konfokale axiale Auflösung } d_z = \frac{1,4 \cdot n_B \cdot \lambda}{(NA)^2} \quad (33)$$

Gleichung 33 stellt das Rayleigh Kriterium entlang der optischen z-Achse dar. Demnach ist die axiale Auflösung im Gegensatz zur lateralen Auflösung vom Quadrat der numerischen Apertur des Objektivs NA abhängig.

$$\text{Konfokale axiale Auflösung } d_z = FWHM = \frac{0,22 \cdot \lambda}{n_B \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2}} \quad (34)$$

Gleichung 34 liegt eine Kleinwinkeltheorie zu Grunde, bei der das Untersuchungsobjekt als ein perfekt planarer Spiegel angesehen wird. Für kleine numerische Aperturen NA stimmen die mit Gleichung 33 und 34 berechneten axialen Auflösungen bis auf einen Faktor von 2 weitgehend überein. Beide Gleichungen sollten nur als Näherungen betrachtet werden, da die Beziehungen oft keine exakten axialen Auflösungen voraussagen können.

Eine Bestimmung der axialen Auflösung mit Gleichung 34 erfolgt durch Erzeugung von Konfokalbildern eines flachen Spiegels in verschiedenen Positionen entlang der optischen z-Achse. Eine Auftragung der bestimmten Fluoreszenzintensitäten gegen die z-Position ermöglicht die Ermittlung des FWHM (Full Width at Half Maximum), das der axialen Auflösung entspricht (s. Abb. 22).

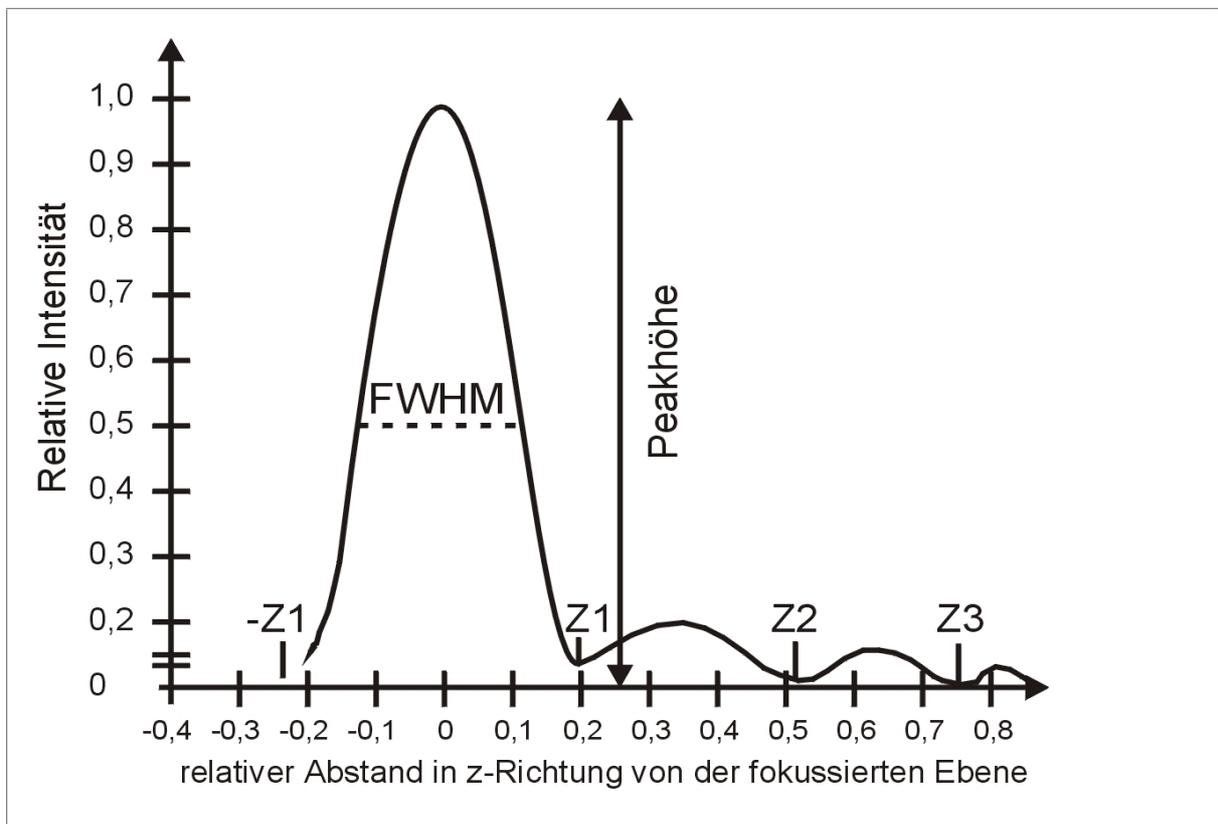


Abbildung 22: Bestimmung der axialen Auflösung d_z . FWHM (Full width at half maximum)

2.5.5 Informationsgehalt der Konfokalbilder poröser Adsorberpartikel

2.5.5.1 Konfokalbilder und Fluoreszenzintensitätsprofile

Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie kann ein dreidimensionales Objekt wie z.B. ein poröser Adsorberpartikel ohne mechanische Zerstörung optisch in Scheiben geschnitten werden. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Transportuntersuchungen wurden

Adsorberpartikel mit einer Proteinlösung inkubiert, denen eine fluoreszenzmarkierte Spezies des Modellproteins zugesetzt war. Durch die Fluoreszenzmarkierung werden die Proteinmoleküle sichtbar, bzw. detektierbar für das Konfokalmikroskop. Bei der konfokalen Analyse von Adsorberpartikelproben während der Adsorption von Proteinen wird dabei ein optischer xy -Schnitt durch die Partikelmitte fokussiert und abgerastert. Durch das Fluoreszenzsignal der gebundenen Proteine wird die kugelförmige, bzw. runde Geometrie des Adsorberpartikels definiert. Die konfokale Abbildung dieser Ebene durch die Partikelmitte repräsentiert eine Kugelscheibe, die den realen Partikel-, bzw. Kugeldurchmesser d_p maßstabsgetreu abbildet (s. Abb. 23). Die Bestimmung des Partikeldurchmessers, bzw. des Partikelradius r_p , ist für die Berechnung des Partikelvolumens Voraussetzung.

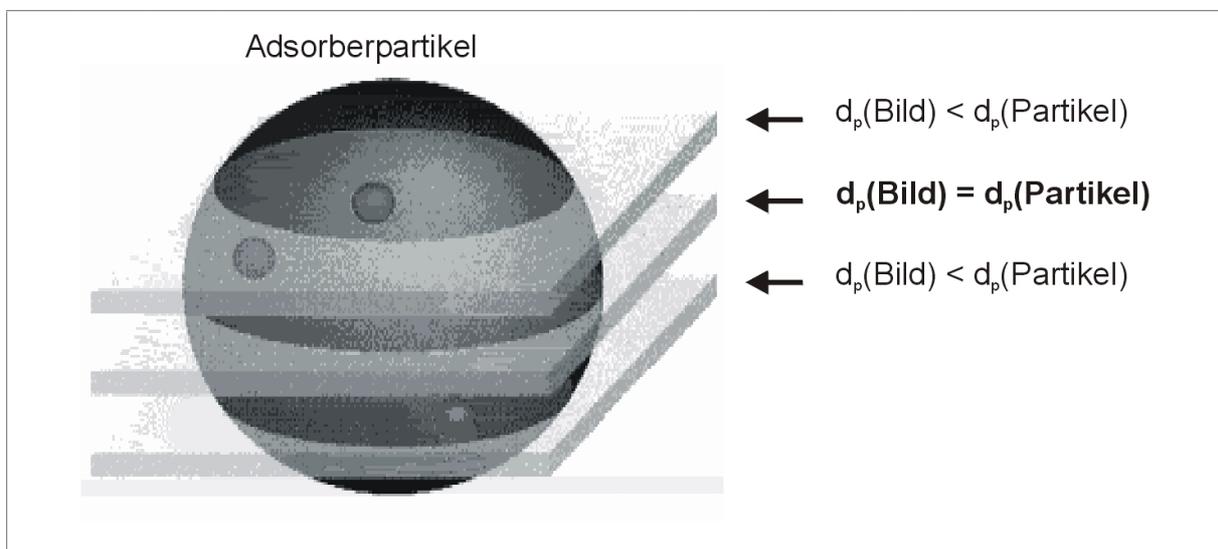


Abbildung 23: optische Schnittebenen durch einen Adsorberpartikel. Modifiziert nach <http://www.mih.unibas.ch/Booklet/Booklet96/Chapter1/Chapter1.html>

Abbildung 24 zeigt ein Konfokalbild eines SP-Sepharose FF-Partikels, der 20h lang mit einer fluoreszenzmarkierten Antikörperproteinlösung von humanem Immunglobulin G (hIgG) inkubiert wurde. Nach 20h geht man unter den gewählten experimentellen Bedingungen von einer Sättigungsgleichgewichtseinstellung im adsorptiven System aus, die sich bei den gewählten porösen SP-Sepharose FF Adsorberpartikeln durch eine homogene Proteinverteilung auszeichnet.

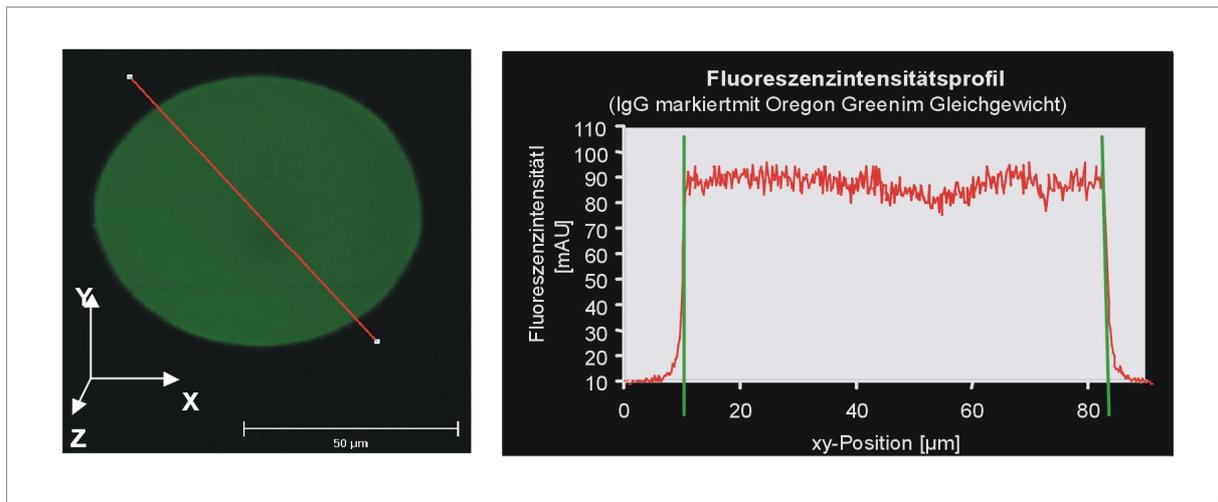


Abbildung 24: Konfokalbild und Fluoreszenzintensitätsprofil eines SP-Sepharose FF Partikels, der für 20 h mit einer Antikörperlösung, die zum Teil mit fluoreszenzmarkierten Antikörper versetzt war, inkubiert wurde. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde dabei der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green eingesetzt

Das Konfokalbild (Abbildung 24 links) zeigt zunächst qualitativ eine homogene Fluoreszenzintensitätsverteilung des Fluoreszenzmarkers über der Partikelebene. Mit der Computersoftware ist es möglich, sich die apparenten Fluoreszenzemissionen über Bereiche des Konfokalbildes, zum Beispiel eine Linie quer durch die Partikelmitte (rot), anzeigen zu lassen (s. Abb. 24). Das resultierende Fluoreszenzintensitätsprofil enthält die apparenten Fluoreszenzintensitätswerte der Pixel entlang dieser Linie. Aufgrund der definierten Größe der Pixel kann dieses Profil als Fluoreszenzintensitätsverteilung über einer definierten Länge in μm generiert werden. Das Fluoreszenzintensitätsprofil in Abbildung 24 bestätigt die homogene Verteilung des humanen Immunglobulins hIgG im Adsorberpartikel. Nach Korrektur der Spektrenflanken durch lineare Regression (grüne Linien in Abb. 24) erhält man als erste Information den Durchmesser des Partikels.

2.5.5.2 Auswertung der Intensitätsprofile

Im Verlauf der Transportuntersuchungen werden zu verschiedenen Zeiten mehrere Partikel mit Hilfe des Konfokalmikroskops analysiert. Die Aufnahmen bilden den gebundenen Anteil der fluoreszenzmarkierten Proteine ab. Das generierte Fluoreszenzintensitätsprofil über dem Partikeldurchmesser repräsentiert die Intensitätsverteilung über diesen Bereich und kann zu der gebundenen Proteinmenge in Beziehung gesetzt werden. Die weitere, prinzipielle Auswertung der Fluoreszenzintensitätsprofile ist in Abbildung 25 zusammengefasst.

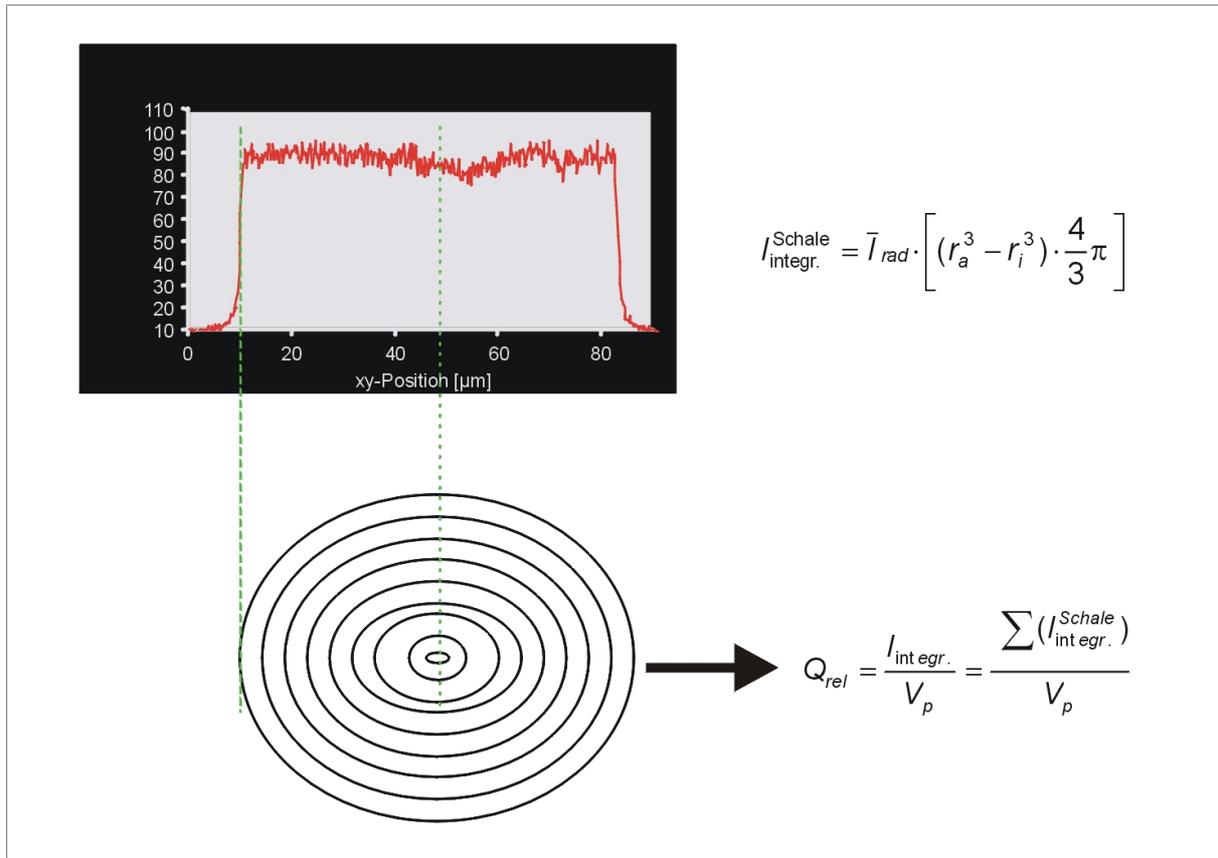


Abbildung 25: Berechnung der Schalenvolumenintensitäten und der relativen Kapazität aus Fluoreszenzintensitätsprofilen

Zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensitätsprofile wird nur eine Hälfte des Spektrums entsprechend der radialen Fluoreszenzintensitätsverteilung genutzt. Für jeden Fluoreszenzintensitätswert dieser Verteilung wird zunächst in Abhängigkeit seiner radialen Position ($r_a - r_i$) eine Schalenvolumenintensität $I_{\text{integr.}}^{\text{Schale}}$ berechnet (s. Abb. 25). Diese Schalenvolumenintensitäten werden aufsummiert und zum berechneten Kugelvolumen V_p ins Verhältnis gesetzt. Es ergibt sich eine relative Kapazität Q_{rel} in relativen Einheiten pro m^3 [arb. units pro m^3], die als Fluoreszenzintensitätskonzentration bezogen auf das Partikelvolumen verstanden werden kann. Der relative Kapazitätswert Q_{rel} hängt ab von:

- Der Konzentration des gebundenen Proteins
- Der Anzahl Farbstoffmoleküle, die an ein Molekül gebunden sind (wird als Markierungsgrad (D/P) bezeichnet)
- Der Quantenausbeute des Fluorophores unter den gewählten experimentellen Bedingungen (Lösungszusammensetzung, pH-Wert, Art des konjugierten Proteins)

- Den Geräteeinstellungen am Konfokalmikroskop
 - o Detektorspannung, bzw. Detektorempfindlichkeit
 - o Laserintensität
 - o Breite der konfokalen Lochblende

Aufgrund dieser Abhängigkeiten sind konstante Geräteeinstellungen eine unbedingte Voraussetzung für eine sinnvolle Quantifizierung der Transportprozesse mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie. In einem geeigneten Messbereich ist die relative Kapazität der Konzentration an gebundenem Protein proportional (Ljunglöf und Thömmes 1998).

Auf die spezifische Auswertung von Konfokalbildern mehrerer Komponenten wird im Material und Methodenteil noch einmal ausführlich eingegangen.

2.5.6 Stand der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie in der Biotechnologie und Materialforschung

Aufgrund der relativ jungen konfokalen Messtechnik findet die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie erst seit den letzten 10 Jahren in der Biotechnologie Anwendung. Die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten durch „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP) war eine der ersten Anwendungen zur Untersuchung des Proteintransportes in porösen Strukturen. Die Methode ist mittlerweile weit verbreitet, lässt aber die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten (Selbstdiffusion) nur unter weitgehend nicht-bindenden Bedingungen zu und ist deshalb für adsorptive Systeme nur bedingt geeignet.

Kim et al. waren die ersten Autoren, die mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie adsorptive Prozesse in porösen Chromatographiepartikeln näher betrachtet haben (Kim et al. 1996). Sie untersuchten die Adsorption eines kationischen Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin B in einem porösen Kationenaustauscherpartikel. Aus Konfokalbildern von Adsorberpartikeln, die sie zu verschiedenen Zeiten erzeugten, generierten sie Fluoreszenzintensitätsprofile über dem Partikeldurchmesser, welche die aktuelle Adsorptionsfront des Farbstoffes auflösen (Kim et al. 1996). Ljunglöf et al. machten sich im gleichen Jahr diese Methode zu nutze und untersuchten die Adsorption von Protein A an Sepharose 6 FF, die mit Immunglobulin G modifiziert war (Ljunglöf und Hjorth 1996). Sie beobachteten, dass die Adsorptionstiefe des fluoreszenzmarkierten Protein A in der Festphase, die sie aus den Fluoreszenzintensitätsprofilen ermittelten, neben der Inkubationszeit auch von der initialen Proteinkonzentration abhängt (Ljunglöf und Hjorth 1996).

In einer weiteren Arbeit untersuchten Ljunglöf et al. die Bindung von fluoreszenzmarkierten Plasmiden an poröse Anionentauscher und konnten mit Hilfe der Konfokalbilder zeigen, dass

die Plasmide nicht in die poröse Struktur von Anionentauschern, wie z.B. Q-Sepharose XL eindringen können und nahezu ausschließlich an der Oberfläche binden (Ljunglöf et al. 1999).

Auf den Ergebnissen der Proteinadsorption aufbauend untersuchten Ljunglöf und Thömmes in einer Studie, die den Grundstein zu dem Projekt dieser Arbeit legte, den Transport eines Proteins am Beispiel von fluoreszenzmarkiertem Lysozym und polyklonalem Humanimmunglobulin G (hIgG) bei der Adsorption an die porösen Kationenaustauscher SP-Sepharose FF und SP-Sepharose XL. Sie konnten für die beiden Proteine bei der Adsorption an die Adsorber zeigen, dass zwischen den ermittelten Fluoreszenzintensitäten aus den Konfokalbildern und parallelen Bestimmungen der Proteinkonzentration in der Flüssigphase im Verlauf einer Batchadsorptionskinetik im Rührreaktor eine lineare Korrelation besteht (Ljunglöf und Thömmes 1998).

Von diesen Arbeiten ausgehend nahm die Anzahl der Untersuchungen der Adsorption von Proteinen an chromatographische Träger mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie stetig zu. Ahmed und Pyle untersuchten in einer semi-quantitativen Studie die Adsorption von Rinderserum- und Ovalbumin an zwei verschiedene Anionenaustauscherphasen (Ahmed und Pyle 1999). Sie erhielten nach der Inkubation von Partikelproben mit fluoreszenzmarkierten Spezies der Proteine unterschiedliche Fluoreszenzintensitätsprofile und wiesen die konfokale Technik als exzellentes Werkzeug bei der Auswahl stationärer Chromatographiephasen aus (Ahmed und Pyle 1999). Laca et al. untersuchten die Diffusion von fluoreszenzmarkiertem Rinderserumalbumin BSA in Calciumalginatpartikeln und konnten anhand der bestimmten Fluoreszenzintensitätsprofile einen effektiven Diffusionskoeffizienten D_p für BSA in der porösen Matrix ermitteln (Laca et al. 1999). Lewus und Carta haben eine Technik entwickelt, durch die die Diffusion von einem Protein, Cytochrom C in einer mit geladenem Polyacrylamidgel gefüllten Kapillare unter bindenden Bedingungen mit Hilfe konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie visualisiert und quantifiziert werden konnte (Lewus und Carta 1999). Mit dieser Technik wird analog der holographischen Laserinterferometrie ein Konzentrationslängenprofil erhalten (Lewus und Carta 1999).

Eine Reihe weiterer Arbeiten befasst sich mit der Charakterisierung der Adsorbermaterialien selbst. Nahezu alle chromatographischen Trägermaterialien der adsorptiven Chromatographie werden durch die sekundäre Einführung von Liganden chemisch modifiziert, um die charakteristischen Trenneigenschaften zu erhalten. Als Gütekriterium für die Bewertung des Modifizierungsprozesses stellt in der Materialforschung die Ligandenverteilung ein weiteres wichtiges Forschungsfeld in der industriellen Biotechnologie dar, um gegebenenfalls die Immobilisierung der Liganden optimieren zu können. Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie erlaubt auch hierbei im Gegensatz zu traditionellen Messtechniken, wie der Verwendung von Mikrotom-Schnitten (Subramanian et al. 1994;

Palsson et al. 1999) oder der autoradiographischen Bestimmung von Radioisotopen, eine einfache, zerstörungsfreie Qualitätsanalyse.

Schreiber und McAlpine untersuchten mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie durch eine Markierung der reaktiven Aminogruppen mit Hilfe von Rhodamin die Verteilung der Aminofunktionalisierung in verschiedenen reaktiven Adsorbentien (ArgoPore, Glass, Polystyrene, Tentagel) (McAlpine und Schreiber 1999).

Im Rahmen der Modifizierung von porösen Trägern mit Proteinen untersuchten Malmsten et al. die Verteilung von immobilisiertem, fluoreszenzmarkiertem Trypsin an Glycidyl-Methacrylatpartikeln (Malmsten et al. 1999).

Die Immobilisierung von IgG-Antikörpern an CNBr-aktivierter Sepharose wurde von Ljunglöf et al. näher betrachtet (Ljunglöf et al. 2000). Sie benutzten wiederum die Adsorption fluoreszenzmarkierter Protein A-Moleküle, um nach erschöpfender Inkubation ins Adsorptionsgleichgewicht die stöchiometrisch an die Antikörper gebundenen „Indikatormoleküle“ mittels konfokaler Bildgebung zu analysieren. Die Autoren konnten im Gleichgewicht eine homogene Antikörperproteinverteilung über dem Partikeldurchmesser beobachten (Ljunglöf et al. 2000). Mit Hilfe einer parallelen Analyse mittels konfokaler Ramanmikroskopie konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (Ljunglöf et al. 2000). Bei dieser Technik wird eine spezifische Ramanstreuung analog der CLSM konfokal aufgelöst. Durch differentielle Analyse der komplexen Ramanspektren von Matrix und Protein können selektive Wellenlängen zur Detektion der Proteinverteilung im Adsorbentmaterial genutzt werden (Ljunglöf et al. 2000). Für statische Untersuchungen, wie z.B. Ligandenverteilungsexperimente stellt das Verfahren ein echte Alternative zu CLSM da. Die erforderliche Messzeit von mehreren Stunden, die zur Bildgebung benötigt wird, ist aber für Messungen dynamischer Vorgänge zur Zeit noch zu lang.

Alternative Untersuchungen beschäftigen sich mit der Strukturanalyse der porösen Netzwerke stationärer Phasen. So lösten Hirokawa et al. interne Strukturen von Poly-(N-Isopropylacrylamid)-Gelen mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie auf. Sie konnten zeigen, dass das Polymernetzwerk eine heterogene Struktur variabler Maschendichten besitzt (Hirokawa et al. 1999).

Weitere Studien beschäftigen sich mit der Strukturanalyse von porösen Membranen, die in der industriellen Biotechnologie bei der Aufarbeitung von Biomolekülen eine Rolle spielen. Während Dai und Barbari CLSM zur Bestimmung der Membranmaschenweite und Berechnung des Wassergehaltes verwendeten, führten Charcosset et al. in einer Arbeit detaillierte dreidimensionale Rekonstruktionen von Stapeln aufgenommener Konfokalbilder durch, die einen guten Eindruck über die Struktur von mikroporösen Membranen vermitteln (Charcosset und Bernengo 2000; Charcosset et al. 2000; Dai und Barbari 2000).

Die soeben aufgeführte Zusammenstellung der Studien hat gezeigt, dass im Laufe der letzten Jahre die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie mehr und mehr in der industriellen Biotechnologie zum Einsatz kommt, da es die zerstörungsfreie Analyse von Adsorptions- und Transportphänomenen, sowie Qualitäts- und Strukturuntersuchungen erlaubt.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte und Gebrauchsartikel

soweit im Text nicht genauer spezifiziert

Zentrifugen:

Tischzentrifuge Typ Centrifuge 5415C

Eppendorf (Hamburg)

Laborzentrifuge Typ Biofuge 13

Heraeus Sepatech (Osterode)

Elektrophorese und Isoelektrische Fokussierung (IEF):

Netzgerät Typ LKB•EPS 500/400

Amersham Pharmacia Biotech
(Freiburg)

Netzgerät Typ LKB•ECPS 3000/150

Amersham Pharmacia Biotech
(Freiburg)

Elektrophoresekammer XCell SureLock™ Mini-Cell

Invitrogen (San Diego, CA, USA)

IEF-Kammer Blue Horizon Flatbed System

Serva Boehringer Ingelheim
Bioproducts (Heidelberg)

Bildauswertung:

Eagle Eye® II Still Video System

Stratagene (La Jolla, CA, USA)

Sonstiges:

Analysenwaage Typ Sartorius MC 1 lab LC 6200 D

Sartorius (Göttingen)

Leitfähigkeitsmesszelle LS538

WTW (Wellheim)

Magnetrührer Mr300

Heidolph (Kehlheim)

Mikroprozessor pH-Meter

Knick GmbH (Berlin)

UV/VIS Photometer Typ Shimadzu UV-160

Shimadzu Europa GmbH
(Duisburg)

Schüttler Typ Vortex L46 GLW

GLW (Würzburg)

Thermomixer Typ Eppendorf 5432

Eppendorf (Hamburg)

Überkopfschüttler: Reax2

Heidolph (Kehlheim)

Plastikeinmalartikel:

Die in dieser Arbeit verwendeten Plastikeinmalartikel wurden von den Firmen Beckmann Instruments GmbH (München), Biozym (Hess. Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Falcon (Heidelberg), GLW (Würzburg), Greiner (Frickenhäuser), Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut), Renner (Dannstadt), Serva Boehringer Ingelheim Bioproducts GmbH (Heidelberg) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

3.2 Chemikalien und Lösungen

3.2.1 Chemikalien

(soweit im Text nicht genauer spezifiziert)

Acetonitril	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Agarose (IEF-Grade)	Biozym (Hess. Oldendorf)
AgNO ₃	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Ampholyte Servalyt (pH 3 – 7)	Serva Boehringer Ingelheim Bioproducts (Heidelberg)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka (Neu-Ulm)
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Sigma Aldrich GmbH (Deisenhofen)
DMSO Dimethylsulfoxid	Merck AG (Darmstadt)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck AG (Darmstadt)
Eisessig (95%ig)	Merck AG (Darmstadt)
Ethanol 96 %ig (tech.)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Formaldehyd (ca. 37%)	Fluka (Neu-Ulm)
Glycin	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure	Sigma Aldrich GmbH (Deisenhofen)
KCl	Merck AG (Darmstadt)
K ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck AG (Darmstadt)
KH ₂ PO ₄	Merck AG (Darmstadt)
NaCl	Sigma Aldrich GmbH (Deisenhofen)
Natriumacetat (NaAc)	Merck AG (Darmstadt)
NaHCO ₃	Merck AG (Darmstadt)
Na ₂ CO ₃	Fluka (Neu-Ulm)
Na ₂ HPO ₄	Merck AG (Darmstadt)
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	Merck AG (Darmstadt)
NaOH	Merck AG (Darmstadt)
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	Merck AG (Darmstadt)
Natriumphatlat	Merck AG (Darmstadt)
Orthophosphorsäure	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Sorbit	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
TCA Trichloressigsäure	Merck AG (Darmstadt)

TFA Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich GmbH (Deisenhofen)
Tris-Base (2-Amino-2-(hydroxymethyl-1,3-Propandiol)	Sigma Aldrich GmbH (Deisenhofen)

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen der Reinheitsstufe pro Analyse oder höherer Qualität.

3.2.2 Lösungen und Puffer

soweit im Text nicht genauer erwähnt:

Acetat-Puffer:

Stammlösungen:	0,5 M H_3CCOONa	0,5 M H_3CCOOH
Mischungsverh.:	56,0 % (v/v)	44,0 % (v/v) = pH 4,5
(für pH-Wert)	29,6 % (v/v)	71,4 % (v/v) = pH 5,0
	13,6 % (v/v)	86,4 % (v/v) = pH 5.5

Carbonat-Puffer:

Stammlösungen:	0,2 M Na_2CO_3	0,2 M NaHCO_3
Mischungsverh.:	14,2 % (v/v)	85,8 % (v/v) = pH 9,3

Phosphat-Puffer:

Stammlösungen:	0,2 M Na_2HPO_4	0,2 M NaH_2PO_4
Mischungsverh.:	84,0 % (v/v)	16,0 % (v/v) = pH 7,5

Glycin-Puffer:

Stammlösungen:	0,2 M $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$	0,2 M HCl
Mischungsverh.:	30,4 % (v/v)	69,6 % (v/v) = pH 2,6

TRIS-Puffer:

Stammlösungen:	1,0 M Tris	1,0 M HCl
Mischungsverh.:	95,0 % (v/v)	5,0 % (v/v) = pH 9,0

Alle Puffer wurden mit Aqua dest. hergestellt und die pH-Werte vor Verdünnung kontrolliert und gegebenenfalls durch Zugabe von HCl oder NaOH korrigiert.

3.3 Allgemeine biochemische Charakterisierungsmethoden

3.3.1 Bestimmung der isoelektrischen Punkte durch isoelektrische Fokussierung (IEF) im Agarosegel

Der isoelektrische Punkt pI der Proteine wurde zur Charakterisierung der verwendeten Proteinspezies, insbesondere des gewonnenen monoklonalen Antikörpers und der fluoreszenzfarbstoffmarkierten Derivate herangezogen. Weiterhin diente er zur Nullpunktsbestimmung für die Titrationskurven.

Die Bestimmung der isoelektrischen Punkte pI im 0,8%igen Agarosegel [0,8% (w/v) Agarose, 10% (w/v) Sorbit, 6,5 % (v/v) Ampholyte (pH 3-7)] erfolgte durch Fokussierung von Proteinproben im elektrischen Hochspannungsfeld. Die Herstellung der Agarosegele und Vorbereitung der Fokussierung wurde wie bei Westermeier beschrieben durchgeführt (Westermeier 1990).

Lösungen:

Elektrodenlösungen:	Anode:	0,25 mol/L Essigsäure
	Kathode:	0,25 mol/L NaOH

Fokussierungsbedingungen:

Temperatur:	10°C
Vorfokussierung:	[1000 V/ 20 mA/ 8 W ~ 30 Minuten]
Entsalzung der Proben:	[200 V/ 20 mA/ 8 W ~ 20 Minuten]
Fokussierung:	[1000 V/ 20 mA/ 8 W ~ 60 - 90 Minuten]

Nach einer Vorfokussierungszeit von ca. 30 Minuten erfolgte die Aufgabe der Proben (0,010 – 0,020 mL \approx 1 – 1,5 mg/mL) und des pI -Standards (Serva Protein Test mixture 3-10, Serva Boehringer Ingelheim GmbH Bioproducts, Heidelberg) in die Probentaschen, die per Gummistreifen auf dem Gel erzeugt wurden. Die Fokussierungszeit richtete sich jeweils nach den verwendeten Proben und wurde durch den Stromstärkeabfall kontrolliert. Nach Stabilisierung der Stromstärke wurde die IEF abgebrochen (\approx 1 – 1,5h).

Die IEF-Gele konnten mit dem blauen Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 nach einem Standardprotokoll gefärbt werden (Westermeier 1990). Die weitere Auswertung erfolgte nach Trocknung der IEF-Gele im Trockenschrank bei 60°C wie im Folgenden beschrieben (16 – 48h).

Zur Ermittlung der isoelektrischen Punkte pI wurden die Wanderungstrecken (WS) der Proben- und Eichproteinbanden (siehe Abb. 26) auf dem gefärbten Agarosegel ausgehend von der Anode mit einem Lineal ausgemessen. Nach Erstellung einer Standardkurve (Auftragung WS gegen pI der Eichproteine) konnten die isoelektrischen Punkte der

jeweiligen Proben über deren Wanderungsstrecke ermittelt werden. Abbildung 26 zeigt exemplarisch ein coomassiegefärbtes IEF-Agarosegel von verschiedenen BSA/Fluoreszenzfarbstoffkonjugaten.

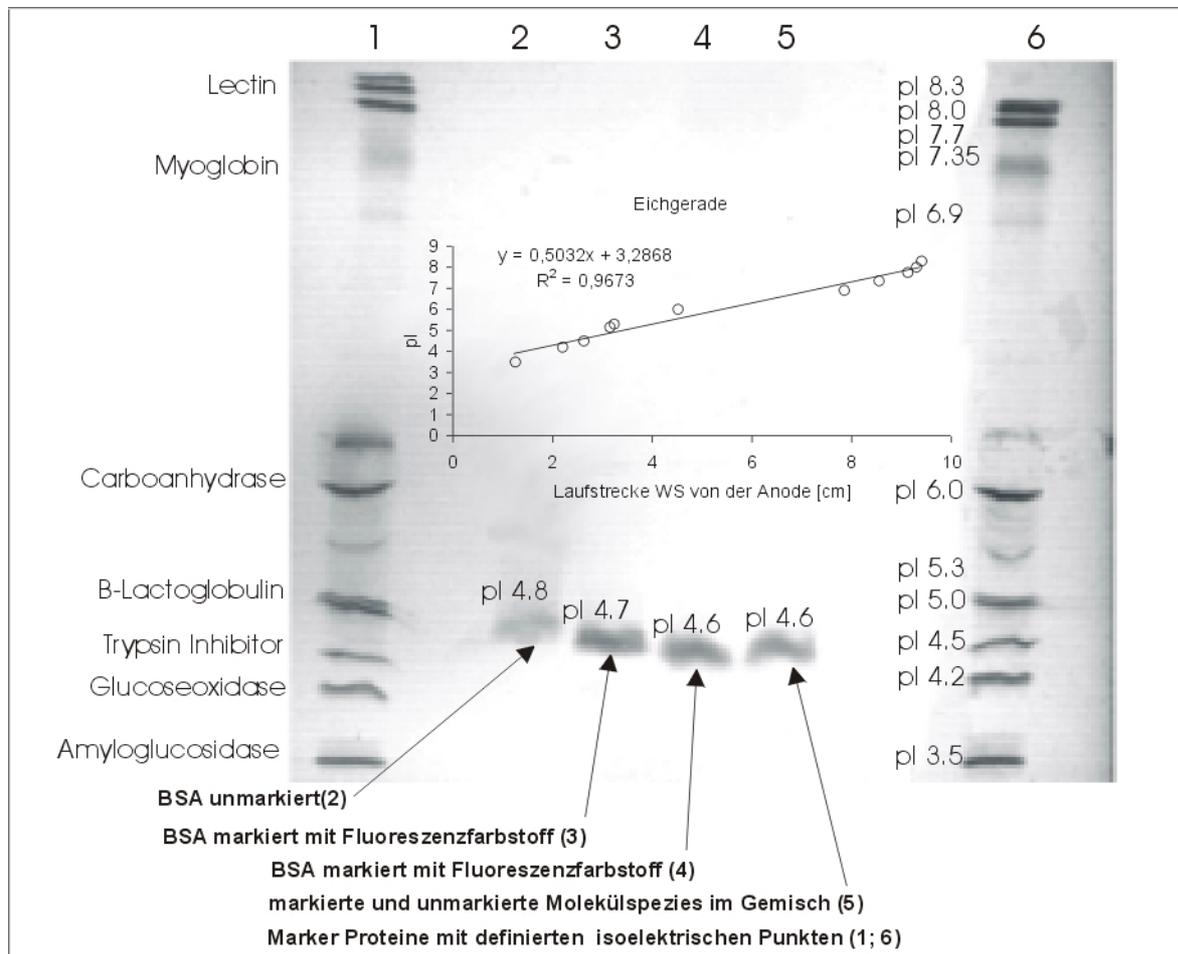


Abbildung 26: Exemplarisches 0,8%iges IEF-Agarosegel (coomassiegefärbt) im pH Bereich 3-7.

Die Standardproteine sind am linken und rechten Rand des Elektrophoresegels aufgetragen worden und die daraus resultierende Eichgerade ist zusätzlich in der Abbildung dargestellt (s. Abb. 26).

3.3.2 Reinheitskontrolle durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Silberfärbung

Zur Reinheitskontrolle wurden Proben der einzelnen Aufarbeitungsschritte des monoklonalen Antikörpers (s. 3.4.2) durch elektrophoretische Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli analysiert (Laemmli 1970). Durch Bindung des stark anionischen Natriumdodecylsulfates (SDS) an die Probenproteine erhält man ein relativ konstantes Ladungs-/Masseverhältnis.

Die Trennung der Protein/SDS-Komplexe im elektrischen Spannungsfeld in Richtung der Anode erfolgt unter diesen Bedingungen nahezu ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht M_w . Bei gleichzeitiger Verwendung von geeigneten Markerproteinen kann deshalb die SDS-PAGE zur Molekulargewichtsabschätzung herangezogen werden. Es wurde ein Elektrophoresesystem der Firma Novex (San Diego, CA, USA) mit den folgenden Komponenten und Fertiglösungen verwendet:

Molekulargewichtsmarker: Pre-Stained SeeBlue™Plus2 (s. Abb. 32)

(6,0; 14,4; 17,0; 28,0; 38,0; 49,0; 62,0; 98,0; 188,0 kDa)

Mark12™ Wide Range (s. Abb. 32)

(6,0; 14,4; 21,5; 31,0; 36,5; 55,4; 66,3; 97,4; 116,3; 200,0 kDa)

Polyacrylamidgel: Nu PAGE Bis-Tris 4-12% ZOOM™Gel

Reduzierungslösung: [0,5 M DTT]

Probenpuffer 1x: [10 % Saccharose, 140 mM TrisBase, 100 mM TrisHCl,
7 mM SDS, 0,5 mM EDTA, 0,075 % (w/v) Serva Blue
G250, 0,025 % (w/v) Phenolrot]

MES Laufpuffer 1x: [50 mM MES; 50 mM Tris Base; 3,5 mM SDS, 1 mM
EDTA, pH 7,3]

Die Proben wurden vor dem Probenauftrag mit Probenpuffer und DTT versetzt (50 mM final), zusammen mit den Markerproben 10 Minuten bei 70°C erhitzt, und anschließend 2 Minuten auf Eis gelagert. Die elektrophoretische Trennung der Proben im Gradientengel erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V. Der Fortschritt wurde durch den vorgefärbten Molekulargewichtsmarker SeeBlue™Plus kontrolliert.

Die Proteinbanden im Gel wurden nach Fixierung durch Silberfärbungen nach dem Protokoll von Blum et al. sichtbar gemacht (Blum et al. 1987). Die Färbung, die auf der Abscheidung von elementarem Silber in den Proteinbanden nach Reduktion beruht ist ca. 100-fach empfindlicher als die bereits erwähnte Coomassiefärbung (s. 3.3.1) und kann eine Detektionsgrenze von weniger als 1 ng Protein besitzen (Switzer et al. 1979). Alle dort beschriebenen Lösungen wurden mit destilliertem Wasser für jede Färbung neu angesetzt.

3.3.3 Bestimmung der K_{av} -Werte und des Molekulargewichts mittels kalibrierter Gelpermeationschromatographie

Proben der nativen Proteine mIgG und BSA, sowie einige fluoreszenzmarkierte Konjugate wurden mittels Gelpermeationschromatographie, bzw. Gelfiltration analysiert, um die Elutionseigenschaften der modifizierten Proteine mit der nativen Spezies vergleichen zu können. Bei dieser Art der Chromatographie erzeugt die charakteristische Porenzugänglichkeit des Proteins in der porösen stationären Phase den wesentlichen Trenneffekt. Das Elutionsvolumen V_e einer Proteinspezies ist deshalb unter geeigneten Bedingungen (keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase) nur vom Molekulargewicht M_w und der molekularen Struktur des Proteins abhängig (Hagel 1998). Zur Charakterisierung der Proteinproben wurde der K_{av} -Wert (Gleichung 35) ermittelt, der nur von der Art des Proteins und dem verwendeten Gelmaterial, nicht aber von den Säulendimensionen und der Packungsdichte abhängt (s. Gl. 35).

$$K_{av} = \frac{\text{Elutionsvolumen} - \text{Ausschlussvolumen}}{\text{InneresVolumen}} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (35)$$

Zur Bestimmung des K_{av} -Werte wurden Proteinproben (1 mL, 2 mg/mL) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min (\sim 30 cm/h) von einer kalibrierten SuperdexTM G-200 HiLoad 16/60 Chromatographiesäule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ($r = 0,8$ cm; $h = 56,5$ cm; Bettvolumen V_t : 113,6 mL) isokratisch mit dem Elutionspuffer [50 mM Kaliumphosphatpuffer, 150 mM KCl, pH 6,5] eluiert. Das neben dem Bettvolumen V_t zur Berechnung von K_{av} benötigte Ausschlussvolumen V_0 wurde mit Dextranblau ($M_w = 2.000.000$ Da) ermittelt (Gl. 35).

Die Chromatographieläufe wurden alle mit einem automatisierten FPLC-System (P500 Pumpe, LCC501 Kontrolleinheit) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) durchgeführt. Die Kalibrierung über Bestimmung der K_{av} -Werte von Proteinen bekannten Molekulargewichtes unter den gleichen experimentellen Bedingungen ermöglichte zusätzlich die Abschätzung des Molekulargewichts M_w . Abbildung 27 zeigt die Auftragung der K_{av} -Werte gegen das logarithmische Molekulargewicht der Eichproteine, die zur Abschätzung des Molekulargewichts herangezogen wurde.

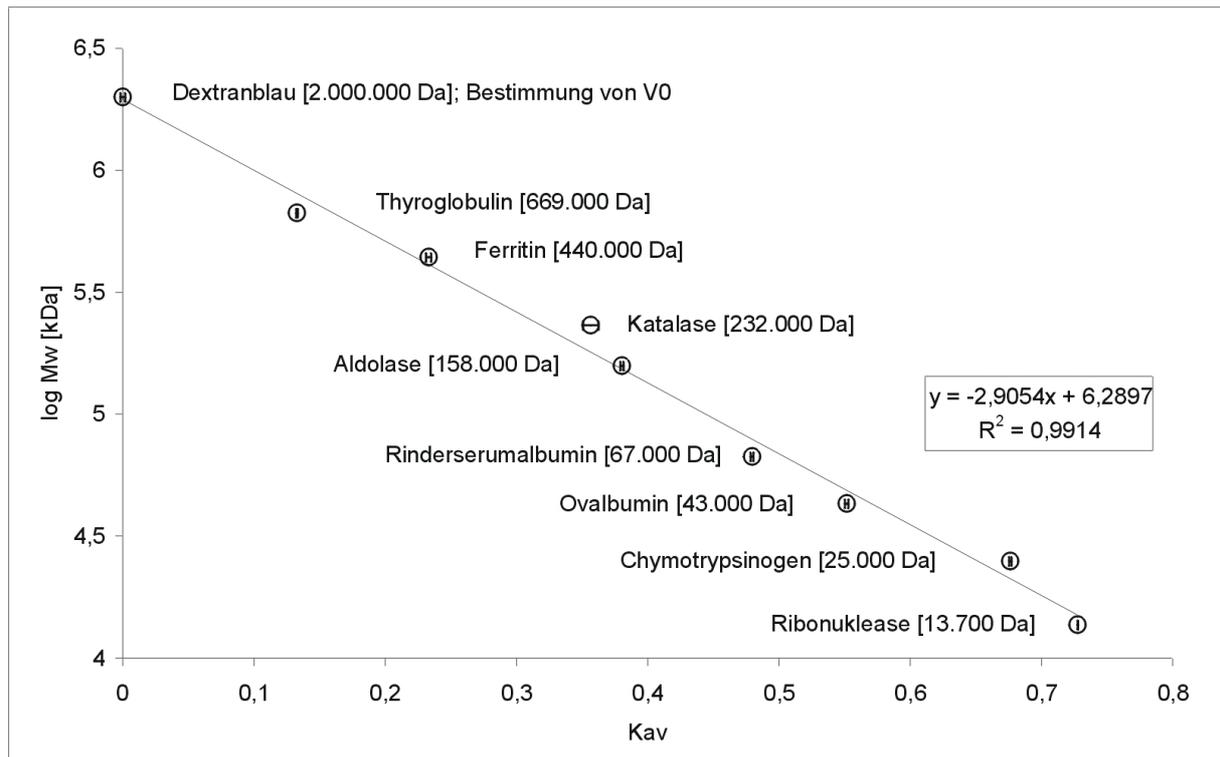


Abbildung 27: Auftragung der Kav-Werte gegen den dekadischen Logarithmus von Proteinen bekannten Molekulargewichts zur Kalibrierung der Superdex G-200 Gelfiltration (Standardabweichung der bestimmten Kav-Werte als Fehlerbalken abgetragen; n = 3 – 6)

Aufgrund der kleinen Fehlerbandbreite bei der Bestimmung (s. Fehlerbalken Abb. 27) wurden nur zwei Elutionen pro Proteinspezies durchgeführt und die ermittelten Kav-Werte arithmetisch gemittelt (s. 4.1).

3.3.4 Bestimmung des Molekulargewichts durch Massenspektroskopie

Die molekulare Masse des aufgearbeiteten, monoklonalen IgG2A Antikörpers wurde im MALDI-TOF-MS (**M**atrix-**A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization-**T**ime **O**f **F**light **M**ass **S**pectroscopy) Massenspektrometer ALADIM (Institut für Lasermedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) ermittelt, das mit einem gepulsten UV-Laser ($\lambda=337$ nm, 1 Hz) ausgestattet war. Die Ionisierungsmethode durch Laser-Desorption ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts relativ großer Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von ~ 300.000 Da (Siuzdak 1996).

Eine Probe ($c = 4,5$ mg/mL) wurde 1:5 mit der Matrix [9 mg/mL 2,5-Dihydroxybenzoesäure; 1 mg/mL 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure, 0,1 % (w/v) Trifluoressigsäure, 20 % (v/v) Acetonitril in H_2O dest.] auf dem Probenhalter gemischt, getrocknet und massenspektroskopisch vermessen.

Die externe Kalibrierung erfolgte über die Vermessung von Rinderserumalbumin BSA ($c = 1,6 \text{ mg/mL}$) mit einem Molekulargewicht von $M_w = 66.430 \text{ Da}$ (Protein Molecular Weight Standards, Kit MSII für nicht denaturierende Systeme, Serva Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg).

In Abbildung 28 ist exemplarisch ein Massenspektrum des IgG2a Antikörpers gezeigt, das zur Massenbestimmung herangezogen wurde. Den einzelnen Massenpeaks sind mögliche Kationen zugeordnet, die bei der Fragmentierung des IgG2a Antikörpers während der Messung entstanden sind.

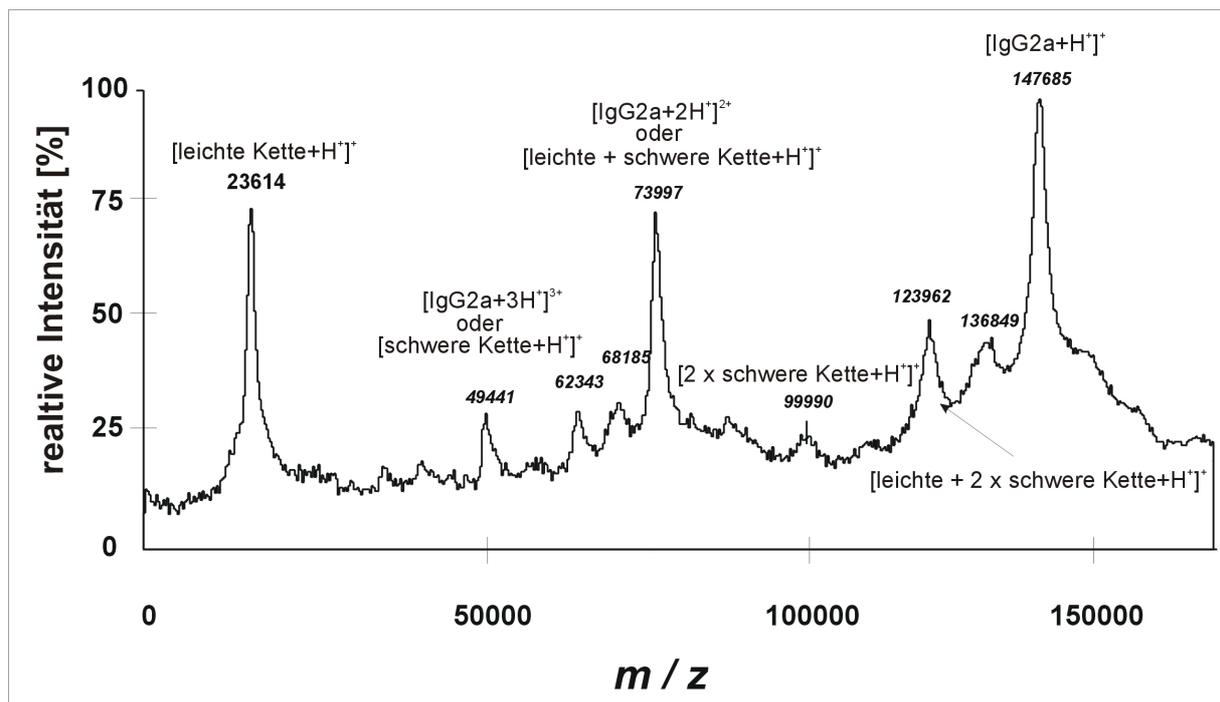


Abbildung 28: Exemplarisches Massenspektrum des isolierten mIgG2a Antikörpers

Die Masse des monoklonalen IgG2a Antikörpers wurde nach Mittelung von 6 Spektren zu 147.635 Da bestimmt.

3.3.5 Konzentrationsbestimmungen für Proteine

3.3.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV/VIS-Spektroskopie

Der Gesamtproteingehalt von reinen Ein-Proteinlösungen wurde durch Messung der Extinktion E bei 280 nm einer geeigneten Verdünnung ($E_{280} < 0,7$) in der Küvette ($d = 1 \text{ cm}$) experimentell bestimmt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren, hauptsächlich Tryptophan, aber auch Tyrosin und Phenylalanin elektromagnetische Strahlung.

Als Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{Protein}}$ wurden zur Berechnung der Proteinkonzentration in [mg/mL] oder [M] nach dem Lambert Beer'schen Gesetz (Gleichung 36 mit $A = 0$) die in Tabelle 2 aufgeführten Werte ϵ_{280} , bzw. $\epsilon_{280}(\text{molar})$ herangezogen.

Tabelle 2: Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} für die verwendeten Proteine. *Angaben von Amersham Pharmacia Biotech (nicht publiziert). **Molare Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280}(\text{molar})$, die mit Hilfe der Molekulargewichte aus Tab. 3 berechnet wurden

Protein	ϵ_{280} [$\text{l g}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	$\epsilon_{280}(\text{molar})$ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
<i>Serumalbumin vom Rind (BSA)</i>	0,671*	44575**
Lysozym aus Hühnereiweiß	2,564*	36683**
Polyklonales humanes IgG (hIgG)	1,370*	205500**
Monoklonales murines IgG2a (mIgG)	1,350*	199321**

Zur Bestimmung der Konzentration fluoreszenzfarbstoffmarkierter Proteinlösungen wurde zusätzlich noch die Extinktion im Absorptionsmaximum $E_{\lambda_{\text{max}}}$ des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes gemessen.

Über eine empirische Gleichung konnte so die Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des verwendeten Fluorophors korrigiert werden (Angabe des Herstellers).

$$c_{\text{Protein}} = \frac{[E_{280} - (A \cdot E_{\lambda_{\text{max}}})] \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\epsilon_{\text{Protein}} \cdot d} \quad (36)$$

Die Korrekturfaktoren A und charakteristischen Messwellenlängen (Absorptionsmaxima) $E_{\lambda_{\text{max}}}$ für die einzelnen Farbstoffkonjugate sind in Tabelle 5 zusammen mit den spektralen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe aufgeführt (s. 3.5.1)

3.3.5.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford

Der Gesamtproteingehalt während der Antikörperaufarbeitung (s. 3.4.2) wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford 1976). Durch Bindung des blauen Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Dieser spektroskopische Effekt kann nach Kalibrierung zur Quantifizierung genutzt werden (Bradford 1976).

Die Kalibrierung erfolgte mit einem IgG2a-Standard (nicht spezifiziert, Institut für Biotechnologie 2 IBT2 des Forschungszentrums Jülich), der in geeigneten Verdünnungen eingesetzt wurde. Zur Bestimmung wurden 20 μl der Proben- bzw. IgG2a-Standardverdünnung in 0,9%iger NaCl-Lösung in eine Mikrotiterplatte (96 well) pipettiert und

mit 180 µl Bradfordreagenz [0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250; 8,5% (v/v) Orthophosphorsäure; 4,75% (v/v) tech. Ethanol] versetzt (3-fach Bestimmung).

Nach 10 minütiger Inkubationszeit im Dunkeln wurden die Platten bei 595 nm im Mikrotiterplattenphotometer Thermomax von Molecular Devices (Sunnydale, CA USA) vermessen und die Probenproteinkonzentrationen unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors aus der Eichgerade berechnet.

3.3.5.3 Bestimmung der IgG2a-Antikörperkonzentration mittels kalibrierter HPLC-Analytik (High Performance Liquid Chromatography)

Die IgG2a-Konzentration wurde durch eine antikörperspezifische Affinitätschromatographie mit dem Affinitätsliganden Protein G durchgeführt. Das Protein G bindet selektiv und sehr stark an den Fc-Teil der schweren Ketten von IgG2a-Antikörpern und kann nach Abtrennung der anderen Proteine durch einen pH-Shift im Stufengradienten eluiert werden. Als stationäre Phase wurde POROS G/M von Perseptive Biosys (Foster City, CA, USA) eingesetzt, die vor der Analyse mit Lösung A equilibriert wurde (s. Abb.4).

Die Bestimmung erfolgte mit einem HPLC-System (2150-HPLC Pumpe 2151-Variabler Wellenlängenmonitor, 2152-LC-Kontrolleinheit) der Firma LKB (Bromma, Schweden) unter den angegebenen Bedingungen nach dem Elutionsprogramm in Abbildung 29.

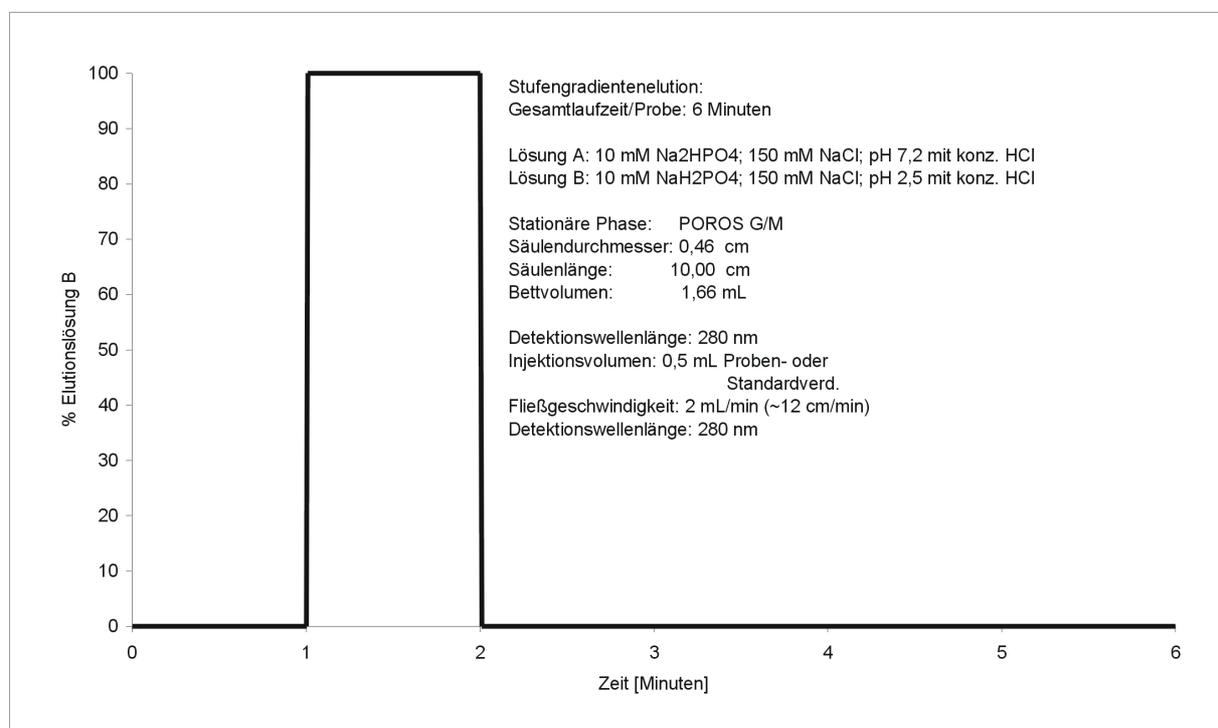


Abbildung 29: HPLC-Gradientenprogramm und Parameter zur Bestimmung der IgG2a-Antikörperkonzentration

Die Peakfläche des Antikörperelutionspeaks ist der Menge des eluierten Proteins proportional und konnte nach Kalibrierung zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt werden. Zur Kalibrierung wurde ein IgG2a-Standard (nicht spezifiziert, vom Institut für Biotechnologie 2 IBT2 des Forschungszentrums Jülich) genutzt, der in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt wurde (s 3.3.5.2).

3.3.6 Bestimmung einer charakteristischen Retentionszeit durch HPLC-Elutionsstudien im linearen Salzgradienten

Zur Charakterisierung der Proteinkonjugate, in bezug auf einen möglichen Unterschied im Desorptionsverhalten, wurden Proben des monoklonalen Antikörpers und Rinderserumalbumins und der unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Spezies an dem porösen Kationenaustauscher SP-Sepharose FF ($d_p = 60-150 \mu\text{m}$) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) gebunden und im linearen Salzgradienten eluiert. Bei dem verwendeten Material handelt es sich nicht um ein typisches HPLC-Material. Aufgrund der geringen mechanischen Stabilität der Agarose konnten die Elutionsstudien nur bei einer relativ niedrigen linearen Fließgeschwindigkeit von $\sim 2,5 \text{ cm/min}$ durchgeführt werden.

Es wurde hierbei mit einem Shimadzu HPLC System vom Typ 10ADvp (Duisburg) gearbeitet, das die Elution durch Messung der Absorption bei 220 nm mit dem SPD10Avp UV/VIS Monitor kontrollierte.

Als charakteristische Größe wurde die Retentionszeit R_t im Peakmaximum des Elutionsprofils von der Auswertesoftware der HPLC-Anlage ausgegeben. Es wurden pro Spezies jeweils 3 Retentionszeiten arithmetisch gemittelt. Zur Bestimmung eines experimentellen Fehlers über die gesamte Nutzungszeit der Chromatographiesäulen wurde die native Proteinspezies als Bezugsprotein zu Anfang und am Ende der gesamten Messsequenz (jeweils 3-fach Bestimmung) analysiert.

Proteinproben der nativen und fluoreszenzmarkierten Spezies, gelöst in PBS, wurden in den angegebenen Volumina über die Säulenschleife der HPLC-Anlage injiziert und nach dem in Abb. 30 gezeigten Messprogramm unter den beschriebenen Bedingungen eluiert.

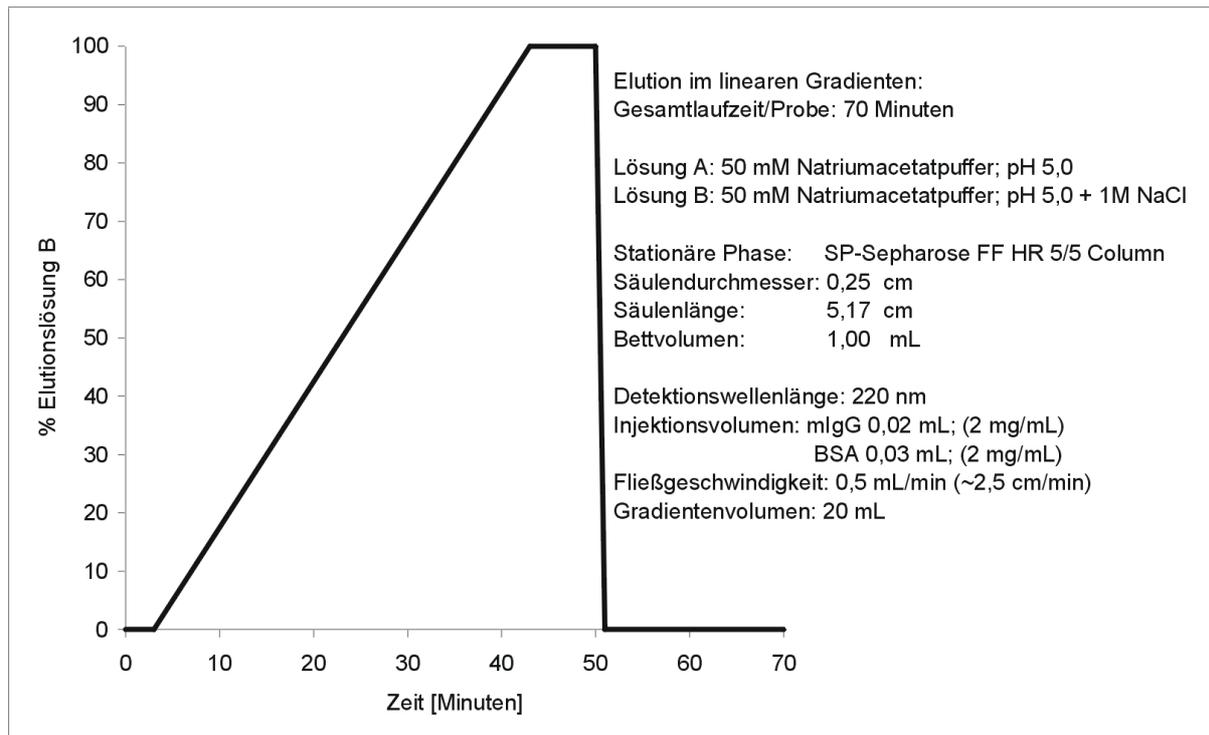


Abbildung 30: HPLC-Messprogramm für Proteinproben (SP-Sepharose FF Säule)

Die Konzentration der Proben wurde vor der Injektion durch UV/VIS-Spektroskopie bestimmt. (s.3.3.5.1).

3.4 Proteine und Proteinaufarbeitung

3.4.1 Proteine

Im Rahmen des Projektes kamen mehrere verschiedene Proteine zum Einsatz, von denen ein Teil kommerziell erworben wurde. Polyklonales humanes Immunglobulin, im Folgenden als hIgG bezeichnet, wurde als Standardlösung (165 mg/mL) (Vnr 008565) von Pharmacia (Stockholm, Schweden) bereitgestellt. Rinderserumalbumin BSA (Fraktion V, A-7030) und Lysozym (L-6876) wurden beide von Sigma Aldrich (Deisenhofen, D) mit einem Reinheitsgrad größer 98% bezogen. Die charakteristischen Daten der verwendeten Proteine sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: verwendete Proteine und Daten (Mw = Molekulargewicht in Dalton; pI = isoelektrischer Punkt)
¹Sequenzdaten Swissprot Datenbank (<http://www.expasy.ch/swissprot>); ²(Skavril 1992); ³(Canfield 1963), ⁴Massenspektroskopie (s. 3.3.4); ⁵Isoelektrische Fokussierung (s. 3.3.1), ⁶(Rämsch 2000).

Protein	Mw [Da]	pI
Serumalbumin vom Rind (BSA)	66.430 ¹	4,8 ⁵
Lysozym aus Hühnereiweiß	14.307 ³	11,1 ⁶
Polyklonales humanes IgG (hIgG)	150.000 – 170.000 ²	4,6 – 7,2 ²
Monoklonales murines IgG2a (mIgG2a)	147.645 ⁴	6,0 ⁵

Monoklonales Immunglobulin G 2a wurde mehrmals im eigenen Haus aus Hybridomaüberstand wie unter 3.4.2 beschrieben aufgearbeitet und charakterisiert.

3.4.2 Aufarbeitung eines monoklonalen IgG2a Antikörpers aus Hybridomaüberstand

Der verwendete monoklonale IgG2a Antikörper aus einer nicht spezifizierten Zelllinie der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH (Biberach), im Folgenden als mIgG bezeichnet, wurde aus Hybridomaüberstand durch zwei chromatographische Schritte dargestellt. „Hybridomaüberstand“ bezeichnet den Zentrifugationsüberstand nach der Abtrennung der Zellen, der den sezernierten Antikörper enthält. Die verwendeten Chromatographiesäulen und -materialien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Die Pumpen vom Typ 501 U stammten von Watson & Marlow (Rommerskirchen).

Der monoklonale Antikörper lag in einer Konzentration von 0,155 mg/mL in der Ausgangslösung vor, die eine Leitfähigkeit von 18 mS/cm und einen pH-Wert von 8,3 besass. Die Aufarbeitung folgte dem in Abbildung 31 gezeigten Aufarbeitungsschema und führte zu lyophilisiertem mIgG mit einer durchschnittlichen Gesamtausbeute von 92%. Die Detektion des Gesamtproteins im Verlauf der Aufreinigung erfolgte durch Messung der Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm mit variablen Wellenlängendurchflussmonitoren der Firma Knauer (Berlin).

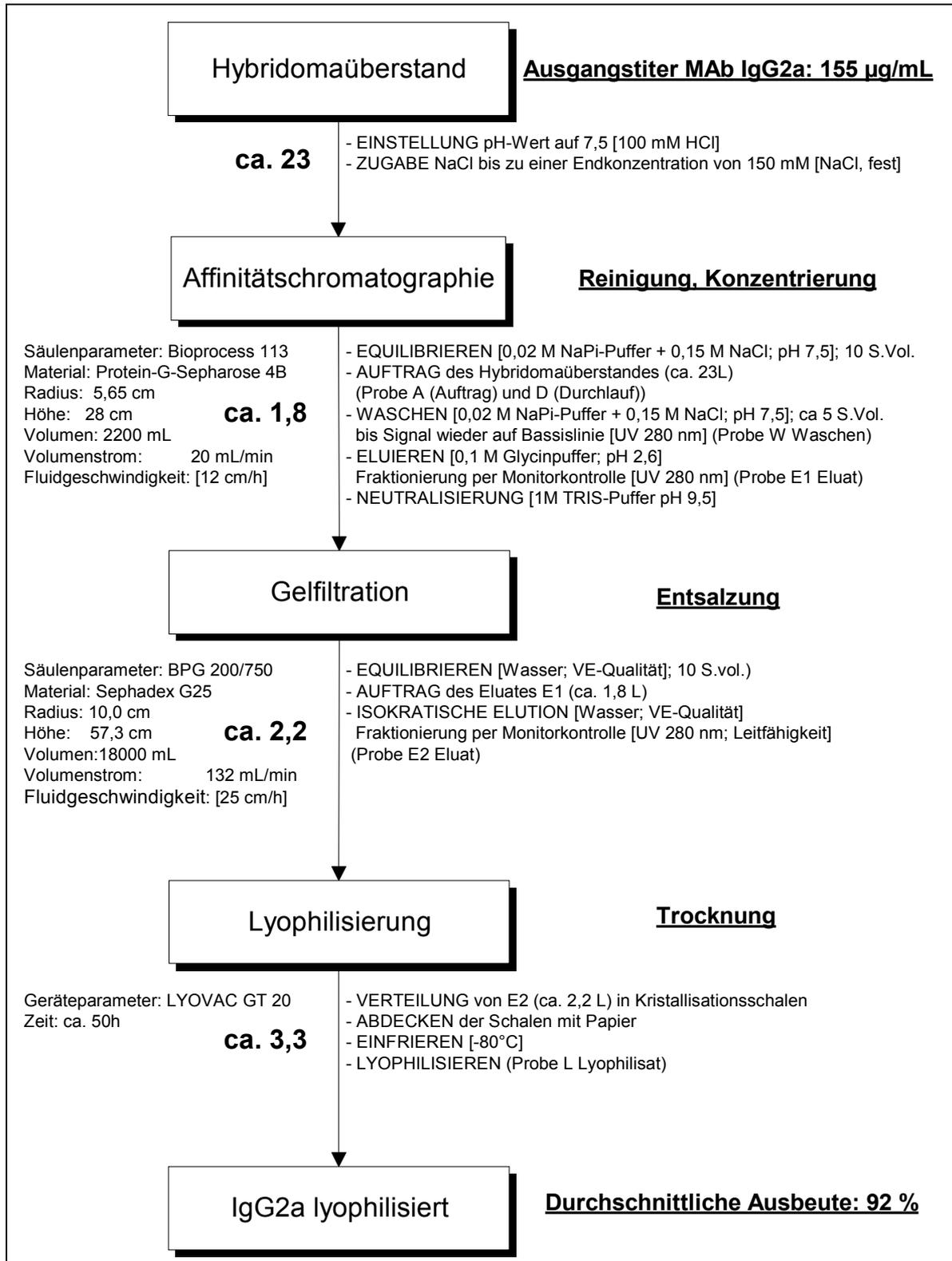


Abbildung 31: Aufreinigungsschema zur mIgG2a Aufarbeitung

Die Gesamtbilanz der Aufarbeitung ist exemplarisch in Tabelle 4 gezeigt. Die Gesamtproteinkonzentration der Proben wurde nach Bradford bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung des monoklonalen Antikörpers erfolgte mit einer standardisierten

HPLC-Methode über die kalibrierte Peakfläche während der Elution des Antikörpers von einer Protein G-Säule.

Tabelle 4: Exemplarische Bilanz der Antikörperaufarbeitung [A Auftrag; D Durchlauf; W Waschfraktion; E1 Eluat Affinitätschromatographie; E2 Eluat Gelfiltration; L Lyophilisat]

Fraktion	Vol. [L]	Konz. [mg/L]	Gesamtprot. [g]	mIgG [mg/L]	mIgG [g]	Ausbeute [%]
A	23	0,515	11,8	0,155	3,57	100
D	23	0,316	7,3	0,007	0,15	~ 4
W	15	0,061	0,9	0,002	0,03	~ 1
E1	1,7	2,11	3,6	0,539	3,39	95
E2	2,2	1,60	3,7	0,338	3,39	95
L	-	-	-		3,30	92

Zur Kontrolle des Reinigungserfolges wurden Proben der Aufarbeitungsschritte (s. Abb. 32) im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

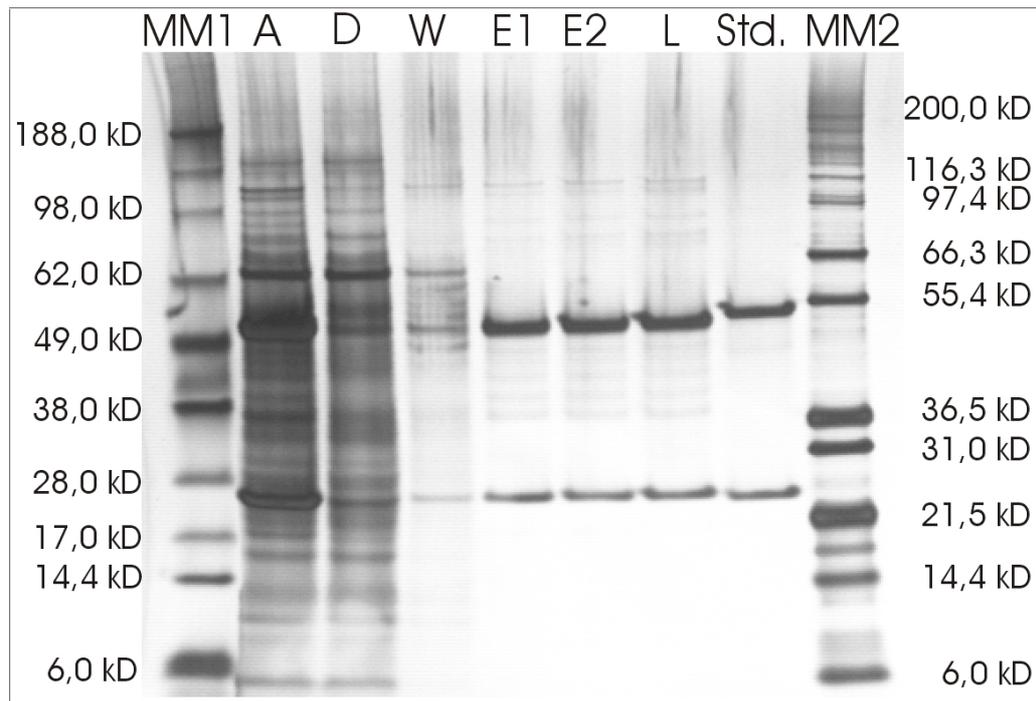


Abbildung 32: Exemplarisches SDS-Elektrophoresegel (silbergefärbt) zur mIgG2a Aufarbeitung. (MM1 Prestained SeeBlue Marker; A Auftrag; D Durchlauf; W Waschfraktion; E1 Eluat Affinitätschromatographie; E2 Eluat Gelfiltration; L Lyophilisat; Std. IgG2a Standard; MM2 Mark12 wide range Marker)

Durch die Reduzierung der Proben mit DTT vor der Elektrophorese wurde der Antikörper in die Bestandteile der schweren – (~50 kDa) und leichten Kette (~25 kDa) getrennt. Das

Elektrophoresegel zeigt, dass der IgG2a-Antikörper durch den Prozess nahezu homogen dargestellt werden konnte. Die Aufarbeitung dauerte bis zur Lyophilisierung im Gefriertrockner Lyovac GT-20 der Leybold Heareus AG (Hanau) ca. 26 Stunden.

3.5 Fluoreszenzfarbstoffe und Proteinmarkierung

3.5.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe wurden als Marker zur selektiven Detektion der Modellproteine im Adsorberpartikel und in der Flüssigphase verwendet und kovalent vorwiegend an Aminogruppen der Modellproteine gebunden. Ein wichtiges Kriterium für die Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe waren neben einer möglichst hohen Photo- und pH-Stabilität vor allen Dingen die möglichst unterschiedlichen spektralen Eigenschaften der Fluorophore. Bei den Transportuntersuchungen der Proteine sollten bis zu drei verschiedene fluoreszierende Marker in einer Lösung oder in einem Objekt unabhängig voneinander detektierbar sein. Im Rahmen der Arbeit wurden neben den beiden Fluoreszeinderivaten (FITC) Oregon Green™ 488 (F-6153) und Alexa™ 488 (A-10235) von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) zwei Cyaninfluoreszenzfarbstoffe Cy3 (PA 23001) und Cy5 (PA 25001) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) an die Proteine konjugiert.

Oregon Green war zu Beginn des Projektes das pH-unempfindlichste Fluoreszeinderivat, das kommerziell erhältlich war. Es wurde bei späteren Studien im Rahmen des Projektes durch das pH-stabilere Alexaderivat ersetzt. Dieses Fluoreszeinderivat zeichnet sich nach Angaben des Herstellers zusätzlich noch durch eine größere Photostabilität, Quantenausbeute und engeren Emissionsbereich aus. Die molekularen Strukturen der Fluoreszenzfarbstoffe sind im Anhang gezeigt (s. Anhang A).

Tabelle 5 fasst die spektralen Eigenschaften der verwendeten Fluorophore zusammen.

Tabelle 5: Spektrale Eigenschaften und Molekulargewichte M_w der verwendeten Fluorophore. Angaben beziehen sich auf den reinen Fluoreszenzfarbstoff nach Angaben der Hersteller. * s. 3.3.5.1 Gl. 36

Fluoreszenzfarbstoff	$\epsilon_{\text{Abs.}\lambda_{\text{max}}}$ [$\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]	Em. λ_{max} [nm]	Abs. λ_{max} [nm]	Fkt. A (Gl. 36)*	Molekulargewicht M_w [Da]
Oregon Green 488™	70.000	522	496	0,12	509
Alexa Fluor 488™	71.000	519	494	0,11	643
Cy3	150.000	570	552	0,08	777
Cy5	250.000	670	650	0,05	791

3.5.2 Proteinmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Markierung der Modellproteine mit den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen folgte immer der gleichen Reaktionsführung (Abb. 33). Die reaktive Gruppe der eingesetzten Fluorophore bildete eine Succinimidestergruppe, die unter alkalischen Reaktionsbedingungen mit den primären Aminogruppen der Proteine über einen Additions-/Eliminierungsmechanismus eine Säureamidbindung ausbildet.

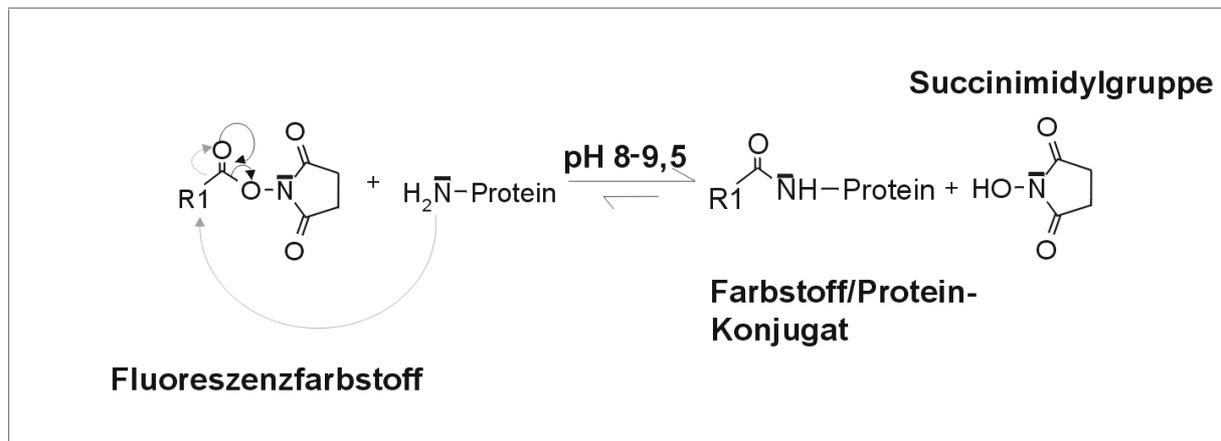


Abbildung 33: Reaktionsmechanismus der Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an primäre Aminogruppen der Proteine

Die resultierende Säureamidbindung ist sehr stabil und chemisch der Peptidbindung äquivalent.

Als Nebenreaktion wird ein kleiner Teil der Fluoreszenzfarbstoffe beim pH-Wert der Reaktion von 9,3 auch über die weniger reaktiven Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen der entsprechenden Aminosäureseitenketten Serin und Tyrosin, bzw. Cystein konjugiert.

Die Fluoreszenzfarbstoffe und die Substanzen zur Markierung wurden komplett vom Hersteller bezogen. Die Markierung erfolgte nach den Herstellerprotokollen und es konnten durchschnittlich pro Ansatz ~15 mg Zielprotein markiert werden. Die Trennung der Proteinkonjugate von überschüssigem Fluoreszenzfarbstoff mit gleichzeitiger Umpufferung mit PBS erfolgte nach der angegebenen Reaktionszeit durch Gelfiltration mit Sephadex G 25 in PD10 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), die vorher jeweils mit 25 mL PBS [10 mM Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,2] equilibriert wurden. Die erste Proteinkonjugatfraktion wurde jeweils gesammelt und die Proteinkonzentration durch UV/VIS-Spektroskopie bestimmt.

Aus den photometrisch gemessenen Extinktionen konnte zusätzlich der Markierungsgrad D/P [Fluoreszenzfarbstoffmoleküle/Proteinmolekül] nach Gleichung 37 berechnet werden.

$$D/P = \frac{[\text{Farbstoffmoleküle}]}{[\text{Proteinmolekül}]} = \frac{\left[\frac{E_{\lambda \max}}{\varepsilon_{\text{Abs}\lambda \max}} \right]}{\left[\frac{[E_{280} - (A \cdot E_{\lambda \max})]}{\varepsilon_{280}(\text{molar})} \right]} \quad (37)$$

Die benötigten Konstanten und Messwellenlängen wurden den Tabellen 2 und 5 entnommen.

Die durchschnittlich erzielten Markierungsgrade sind in Tabelle 7 aufgeführt.

3.6 Konfokale Messtechnik und Methoden

3.6.1 Fluoreszenzspektroskopische Analyse der Proteinadsorption

3.6.1.1 Konfokalmikroskope und Fluoreszenzspektrometer

Im Rahmen des Projektes wurde zur Analyse der Adsorberpartikel mit zwei verschiedenen Bauarten von konfokalen Laser-Raster-Mikroskopen der Firma Leica (Heidelberg, D) gearbeitet. Bei dem vorwiegend verwendeten Leica TCS SP handelt es sich im Gegensatz zu dem einfacheren Leica TCS NT um ein spektrales Konfokalmikroskop. Bei dieser Bauart konnte der spektrale Bereich der zu detektierenden Strahlung durch einen variablen Spalt variiert werden, was gerade bei der unabhängigen Detektion von bis zu drei unterschiedlichen Fluorophoren viele Vorteile bot.

Die Anregung der verwendeten Fluorophore erfolgte bei 488 nm, 568 nm und 647 nm mit den drei Linien des Argon/Krypton Mischgaslasers, mit dem beide Konfokalmikroskope ausgestattet waren.

Die Konfokalbilder der Adsorberpartikel wurden bei 63-facher Vergrößerung, hauptsächlich in einer Auflösung von 512 x 512, seltener 1024 x 1024 Pixeln erzeugt. Es wurde dabei mit zwei verschiedenen Objektiven gearbeitet:

- Ölimmersionsobjektiv: 63 -fache Vergrößerung NA 1,32 HCX PL APO (1,32-0,6)
- Wasserimmersionsobjektiv: 63 -fache Vergrößerung NA 1,20 HCX W APO (1,2)

Weiterhin wurde mit mehreren Fluoreszenzspektrometern gearbeitet, die hauptsächlich der Konzentrationsbestimmung fluoreszenzmarkierter Proteine in der Flüssigphase dienen und im Folgenden aufgelistet sind:

Perkin Elmer LS50b	(FITC, Cy3)	Perkin Elmer (Norwalk, USA)
Spex Fluorolog-3	(FITC, Cy3 und Cy5)	JY Horiba (Edison, NJ, USA)
Varian Cary Eclipse	(FITC, Cy3 und Cy5)	Varian (Darmstadt)
Versa Fluor Fluorometer	(FITC, Cy5)	Bio Rad Laboratories (CA, USA)
(Filtersets: 496/520 nm; 650/670 nm)		

Der Einsatz der jeweiligen Geräte richtete sich nach dem zu detektierenden Fluorophor.

3.6.1.2 Messtechnik und Quasi-Simultane Detektion verschiedener Farbstoffe

Im Rahmen des Projektes wurde zur Quantifizierung der Proteinadsorption die Fluoreszenzemission der verschiedenen Proteinkonjugate genutzt. Proben der Partikel wurden nach oder während der einzelnen Inkubationen im Konfokalmikroskop wie folgt analysiert.

Eine Partikelprobe und etwas Inkubationsflüssigkeit wurden mit der Pipette auf ein Deckglas gegeben dessen Rückseite, je nach verwendetem Objektiv (s. 3.6.1.1), mit etwas Wasser oder Immersionsöl versehen war. Mittels der Durchlichtfunktion des Mikroskops wurde die mittlere Ebene einzelner Partikel (scharfer schwarzer Ring um den Partikel im Durchlicht) fokussiert. Nach Umschalten des Strahlenganges auf konfokalen Betrieb wurde ein Konfokalbild durch horizontales Abrastern in xy-Richtung der fokussierten Ebene mit der/den geeigneten Laserlinie(n) nach einem zuvor eingestellten Messprogramm erzeugt. Die Laserintensität und die Spannung der Detektoren (PMT, Photomultiplier) wurden variiert um ein möglichst hohes, aber nicht übersättigtes Messsignal im Konfokalbild zu erreichen. Weiterhin wurde in Abhängigkeit von der Signalstärke die fokussierte Ebene 2 bis 8 mal abgerastert und die resultierenden Bilder akkumuliert, um das Hintergrundrauschen in den Konfokalbildern zu unterdrücken.

Zur Verifikation der im Durchlicht fokussierten Schnittebene durch den Mittelpunkt des Partikels wurde zu Anfang der Transportmessungen die fokussierte Ebene an „Gleichgewichtspartikeln“ in z-Richtung nach oben und unten variiert, um die mittlere Sektion des Partikels bei der konfokalen Abrasterung durch Vergleich mit dem Durchlichtbild zu finden. Gleichgewichtspartikel wurden wie unter 3.6.3 und 3.6.4 beschrieben, durch Inkubation von SP-Sepharose FF Partikeln mit fluoreszenzmarkierten Proteinlösungen ins Gleichgewicht hergestellt. Die Inkubationszeit richtete sich dabei nach der Geschwindigkeit der Adsorptionskinetik unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen und betrug zwischen 15 und 43 h.

Konstante Geräteeinstellungen im Verlaufe eines Experimentes waren unbedingte Voraussetzung für eine Quantifizierung der erhaltenen Bilder (keine Änderung der Laserintensität, Detektorspannung und des Messprogramms während des gesamten Experiments).

In Abbildung 34 sind die Emissionsspektren der drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffarten gezeigt. Spektrale Verschiebungen der Fluoreszenzemission durch Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes an das Protein bewegen sich im Bereich weniger Nanometer und können an dieser Stelle zunächst vernachlässigt werden.

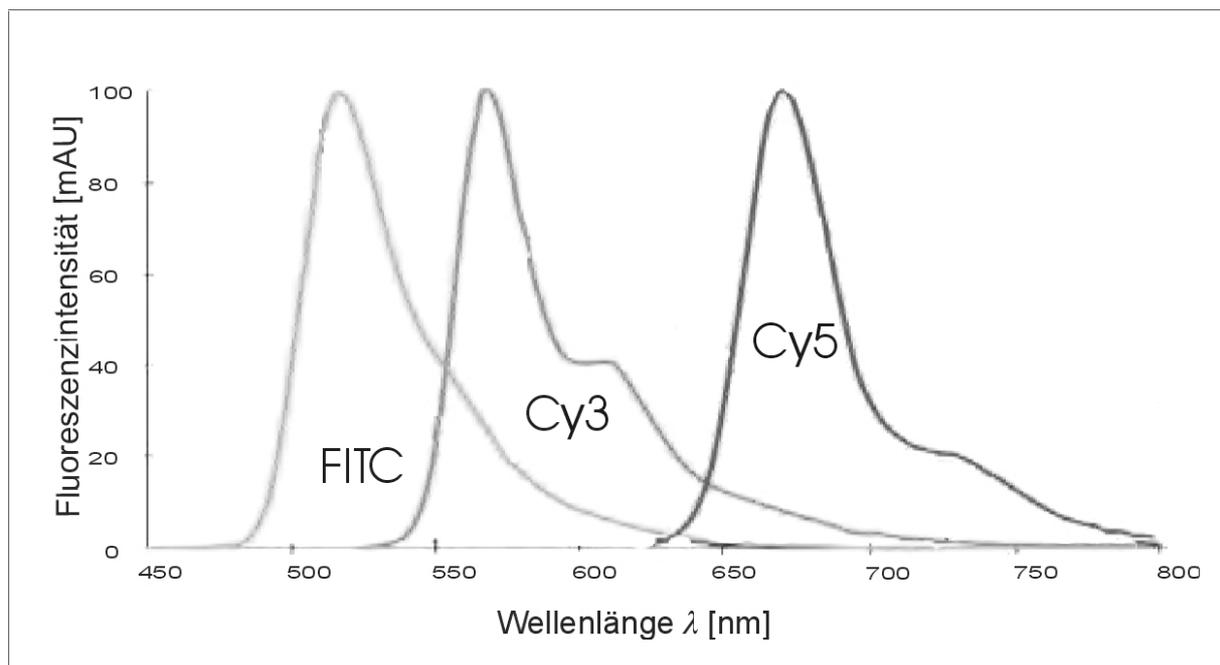


Abbildung 34: Exemplarische Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffklassen

Für Einkomponentenexperimente, bei denen hauptsächlich mit Cy5 oder einem FITC-Derivat als Marker gearbeitet wurde, bedurfte es keiner weiteren besonderen Einstellung am Mikroskop und es wurde mit Messprogrammen wie beschrieben gearbeitet.

Zur Detektion von Proteinen bei der Zweikomponentenadsorption wurde mit Cy5 und einem FITC-Derivat als Fluoreszenzmarker gearbeitet. Die Emissionsspektren in Abbildung 34 verdeutlichen die unterschiedlichen Emissionseigenschaften der verwendeten Farbstoffe, die mit den optischen Filtern und Teilerspiegeln des Konfokalmikroskops quantitativ getrennt werden konnten (s. Abb. 20).

Bei den durchgeführten Multicoloranalysen wurde zusätzlich noch mit Cy3 gearbeitet. Dieser Farbstoff liegt mit seinem Emissionsspektrum genau zwischen den beiden Anderen (s. Abb. 9) und musste separat in einem sequentiellen Programmmodus angeregt und detektiert werden, um einen „Crosstalk“ mit den beiden anderen Messkanälen zu vermeiden.

Bei diesem Modus wurden zunächst die Cy5- und FITC-Konjugate gleichzeitig angeregt und detektiert. In der weiteren Folge der Messsequenz wurden die beiden entsprechenden Detektorkanäle inaktiviert und die Spannung des Detektors zur Messung der Emission des Cy3-Fluoreszenzfarbstoffes entsprechend erhöht. Schließlich erfolgte bei einer erneuten Abrasterung die selektive Anregung und Detektion von Cy3. Die Selektion der Emissionswellenlängen für die einzelnen Detektorkanäle wurden durch geeignete Verschiebung der variablen Spalte des Konfokalmikroskops nach Tabelle 6 spezifiziert.

Tabelle 6 Spektrale Einstellungen zur Detektion der verschiedenen Fluorophore mit dem Konfokalmikroskop und dem Fluoreszenzspektrometer

Farbstoff	Konfokalmikroskop		Fluoreszenzspektrometer	
	$\lambda_{(Exc.)}$ [nm]	$\lambda_{(Em.)}$ [nm]	$\lambda_{(Exc.)}$ [nm]	$\lambda_{(Em.)}$ [nm]
Oregon Green 488 TM	488	515 - 550	496	520
Alexa 488 TM	488	515 - 550	494	520
Cy3	568	590 - 630	550	570
Cy5	647	670 - 700	650	670

Die weiteren Messeinstellungen des Konfokalmikroskops sind in Tabelle 6 den spektralen Einstellungen der Fluoreszenzspektrometer und Fluorometer für die einzelnen Fluorophore gegenübergestellt (s. Tab. 6).

3.6.2 Intensitätsexperimente

Die gemessene Fluoreszenzintensität im Konfokalmikroskop dient zur Quantifizierung der Proteintransportprozesse der Proteine im Adsorberpartikel. Voraussetzung ist dabei eine lineare Abhängigkeit zwischen dem detektierten Fluoreszenzsignal und der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration im Partikel. Aufgrund von Sättigungseffekten (s. 2.1.3.2) besteht eine lineare Korrelation zwischen der Fluoreszenzemission und der Fluorophorkonzentration nur in einem begrenzten Konzentrationsbereich. Die Konzentration an Fluorophor ist bei konstantem Markierungsgrad (D/P) und gegebener maximaler Proteinkapazität im Gleichgewicht unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen im Adsorberpartikel über Verdünnung mit unmarkiertem Protein individuell einstellbar.

Zur Definition eines optimalen Arbeitsbereiches, bei dem bei möglichst hoher Fluoreszenzsignalintensität noch eine lineare Abhängigkeit der beiden Größen besteht, wurden Intensitätsexperimente mit den Fluoreszenzfarbstoffkonjugaten durchgeführt. Variiert wurde in den Experimenten die Proteinkonjugatkonzentration im konfokalmikroskopisch zu

analysierenden SP-Sepharose™ FF Partikel (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei konstanter Konzentration an gebundenem Protein.

Eine fluoreszenzmarkierte Lösung des Proteins und eine nicht fluoreszenzmarkierte Lösung des Proteins mit gleicher Ausgangskonzentration (2,4 mg/mL) wurden dazu zunächst in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 hergestellt.

Die Kontrolle der BSA-Proteinkonzentration erfolgte jeweils durch UV/VIS-Spektroskopie mit geeigneten Messparametern für den Farbstoff und BSA. Der Markierungsgrad (D/P) wurde aus diesen aus den photometrischen Daten nach Gleichung 37 bestimmt.

Durch variable Mischung dieser beiden Lösungen in verschiedenen Ansätzen erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Proteinkonjugatgehalten, die in der Folge mit SP-Sepharose FF im Dunkeln ca. 15 Stunden über Kopf geschüttelt wurden. Anschließend wurden drei Adsorberpartikel pro Ansatz bei konstanten Geräteeinstellungen konfokalmikroskopisch vermessen. Die Berechnung der relativen Kapazität $Q_{rel}(C_{\text{Farbstoff}})$ aus den Fluoreszenzintensitätsprofilen erfolgte nach Gl 40.

In weiterführenden Messreihen wurde zusätzlich die Laserstärke und die Detektorempfindlichkeit variiert, um Intensitätssättigungseffekte näher untersuchen und gegebenenfalls minimieren zu können (s. 4.2).

Die molare Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs, der über das BSA-Molekül an die SP-Sepharose FF gebunden war, konnte nach Gleichung (38) aus dem Markierungsgrad bei Kenntnis der molaren BSA-Kapazität Q_{max} im Gleichgewicht bei den experimentellen Bedingungen berechnet werden:

$$Konz_{\text{gebunden}}^{\text{Fluoreszenzfarbstoff}} (mM) = \frac{Q_{max} (mM) \cdot (D/P)}{\text{Verdünnungsfaktor}} \quad (38)$$

Die maximale BSA-Proteinkapazität in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 beträgt 145 kg/m^3 , bzw. 2,2 mM. In Tabelle 7 sind neben den einzelnen Verdünnungsreihen der verschiedenen Farbstoffkonjugate mit unmarkierter Proteinlösung zusätzlich die zugehörigen Markierungsgrade (D/P) und die erwarteten Farbstoffkonzentrationen in mM, nach Gl. 38 berechnet, aufgeführt.

Tabelle 7: Verdünnungsreihen der verschiedenen BSA-Farbstoffkonjugate und resultierende Farbstoffkonzentration im SP-Sepharose FF-Partikel nach Inkubation ins Adsorptionsgleichgewicht.

***Resultierende Farbstoffkonzentration**

Fluoreszenzfarbstoff (D/P)	Verdünnungsfaktor	Farbstoffkonz. (mM)*
Alexa TM 488 (0,38 mol Farbstoff/molBSA)	unverdünnt 1 : 2, 3, 4, 7, 10, 15, 20, 30	0,38 – 0,025
Oregon Green TM 488 (2,15 mol Farbstoff/molBSA)	unverdünnt 1 : 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40	2,15 – 0,108
Cy3 (0,64 mol Farbstoff/molBSA)	unverdünnt 1 : 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40	0,64 – 0,032
Cy5 (1,44 mol Farbstoff/BSA)	unverdünnt 1 : 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40	1,44 – 0,072

3.6.3 Batchadsorptionskinetiken im Rührreaktor

3.6.3.1 Prinzip

Alle Batchadsorptionskinetiken der Einkomponenten- und Zweikomponentenadsorption des monoklonalen Antikörpers und BSA an SP-Sepharose FF wurden bei 25°C im Dunkeln in einem thermostatisierten Glassreaktor mit hängendem Rührer durchgeführt (s. Abb.35). Die Rührgeschwindigkeit des hängenden Magnetrührers wurde mittels einer Stroboskoplampe ermittelt und betrug 500 +/- 10 Umdrehungen in der Minute. Die Proteinlösung (20–25 mL) wurde für Einkomponentenadsorptionen wie unter 3.6.3.2, für Zweikomponentenadsorption wie unter 3.6.3.3 beschrieben präpariert und im Glasreaktor zunächst unter Rühren auf Reaktionstemperatur gebracht. Die Adsorptionskinetik wurde durch Zugabe einer definierten Menge einer Adsorbermischung (1:3 (v/v) im jeweiligen Puffersystem equilibriert) gestartet. In der Folge wurde zu bestimmten Zeiten 0,2 mL Probe aus dem Reaktor mit einer Pipette entnommen und die Phasen durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 14.000 x g getrennt. Vom Überstand wurden 0,1 mL abgenommen, 1:10 im jeweiligen Puffersystem verdünnt und bis zur Messung der kalibrierten Fluoreszenzintensität im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

Ein kleiner Teil der Partikelphase wurde mit der Pipette resuspendiert, auf ein Deckglas gegeben, drei Partikel pro Zeitwert konnten direkt konfokalmikroskopisch vermessen und Fluoreszenzintensitätsprofile erzeugt werden (s. 3.6.1.2). Im Vorfeld der Batchadsorptionskinetik wurden die Messparameter des Mikroskops (Laserintensität, Detektorempfindlichkeit) durch Vermessung präparierter Sättigungspartikel optimiert. Die SP-

Sepharose FF Partikel waren aufgrund einer erschöpfenden Inkubation mit der Proteinlösung gesättigt und repräsentieren somit die maximal erreichbare Fluoreszenzintensität.

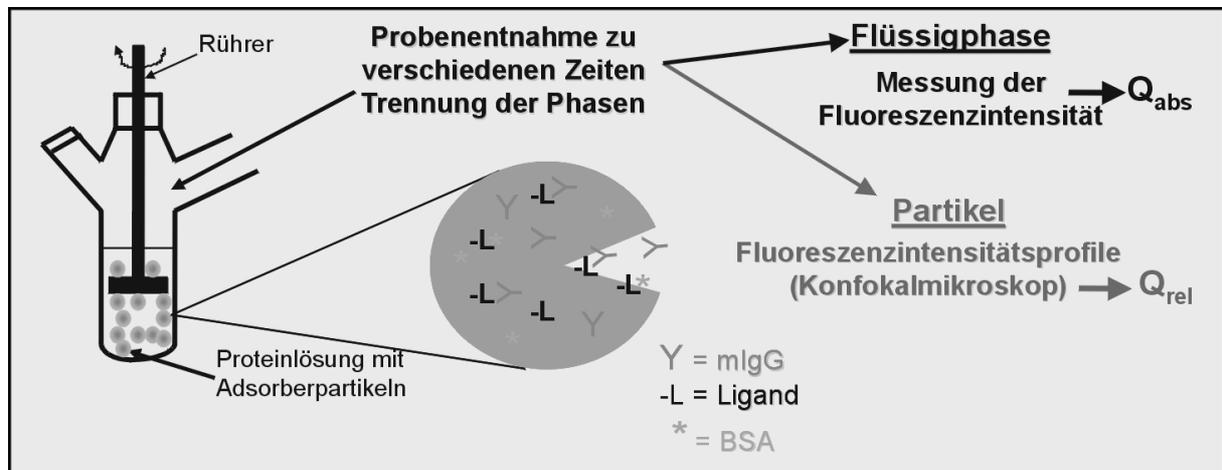


Abbildung 35: Prinzipielle Durchführung einer Batchadsorptionskinetik im thermostatisierten Rührreaktor

3.6.3.2 Einkomponentenadsorption

Zur Darstellung einer Reaktionslösung für die Einkomponentenadsorption wurde das lyophilisierte Protein in der jeweiligen Pufferlösung gelöst. Die einzelnen Pufferbedingungen, bei denen Einkomponentenadsorptionsexperimente durchgeführt wurden, sind zusammen mit den bestimmten Leitfähigkeiten in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8: Pufferkonzentrationen, pH-Werte und die daraus resultierenden Leitfähigkeiten der Puffer

Acetatpuffer	Leitfähigkeiten [mS/cm]
50 mM pH 4,5	1,67
10 mM pH 5,0	0,49
50 mM pH 5,0	2,57
100 mM pH 5,0	4,93
150 mM pH 5,0	7,23
50 mM pH 5,5	3,22

Diese Lösung wurde mit einer fluoreszenzmarkierten Lösung des Proteins im Konzentrationsverhältnis 1:20 gemischt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch UV/VIS-Spektroskopie je nach Art des Proteins und Fluorophors wie unter 3.3.5.1 beschrieben. Die Proteinkonzentrationen der Reaktionsansätze unter den verschiedenen, untersuchten Bedingungen sind im Anhang angeführt (s. Anhang C).

Zur Einstellung der optimalen Laserintensität und Detektorempfindlichkeit des Konfokalmikroskops, aber auch um sehr lange Adsorptionszeiträume kinetisch verfolgen zu können, wurden, ausgehend von 1 mL Proben der Reaktionslösung, zwei Übernachtinkubationen mit dem Adsorbermaterial (gleiches $V_{\text{sys}}/V_{\text{Gel}}$ -Verhältnis) im Eppendorfgefäß angesetzt und bis zur Vermessung am Versuchstag im Dunkeln über Kopf geschüttelt.

3.6.3.3 Zweikomponentenadsorption im Acetatpuffersystem

Im Rahmen der Zweikomponentenadsorptionsuntersuchungen wurden zwei verschiedene Konjugate der beiden Modellproteine bei der Durchführung der Experimente eingesetzt. Cy5 wurde hierzu an Proben des monoklonalen Antikörpers, ein Fluoreszeinderivat (AlexaTM488 o. Oregon GreenTM488) an BSA gekoppelt.

Zwei Ausgangsproteinlösungen im jeweiligen Puffersystem wurden zunächst mit den fluoreszenzmarkierten Spezies im Konzentrationsverhältnis von 1:10 angesetzt. Die Konzentrationsbestimmung der Ausgangslösungen erfolgte wiederum durch UV/VIS-Spektroskopie und die Proteinkonzentrationen der einzelnen Experimente sind im Anhang E zusammengestellt.

Diese beiden Proteinlösungen wurden in der Folge in einem gewünschten Verhältnis (meistens equimolar) gemischt. Die Adsorptionsbedingungen der durchgeführten Experimente sind im Ergebnisteil aufgeführt (s. 4.4.1). Wiederum erfolgte die Präparation zweier Übernachtwerte aus Proben der Reaktionslösung zur Eichung der Detektionskanäle des Konfokalmikroskops.

Es wurden dazu zusätzlich 1 mL Proben, der beiden Einkomponentenausgangslösungen über Nacht mit dem Adsorbermaterial inkubiert.

Zur Eichung wurden am Versuchstag die Fluoreszenzintensitätsprofile, von Partikelproben, beider Einkomponenteninkubationen durch Einstellung der Laserintensität und der Detektorempfindlichkeit auf ein gleiches Fluoreszenzintensitätsniveau gebracht, bevor die Übernachtwerte vermessen und schließlich das kinetische Experiment im Rührreaktor gestartet wurde.

3.6.3.4 Zweikomponentenadsorption im Hybridomaüberstand

Die Zweikomponentenadsorptionskinetiken im Hybridomaüberstand wurden zur Simulation einer realen Prozesssituation durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der im Überstand enthaltene monoklonale IgG2a-Antikörper (nicht genauer spezifiziert) durch Inkubation mit Protein-A-Sepharose von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) depletiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand zur Reduktion der Leitfähigkeit 1:2 mit Acetatpuffer

verdünnt. Fluoreszenzmarkierte Proben beider Proteine (mIgG-Cy5; BSA-AlexaTM488) wurden dieser Lösung unverdünnt bis zu einer finalen Konzentration von 0,15 mg/mL zugesetzt. Nach Einstellung des pH-Wertes mit 0,1 M HCl wurden wiederum Übernachtwerte wie bereits beschrieben hergestellt.

Die Untersuchungen mit modifizierten Hybridomaüberständen erfolgten bei drei verschiedenen pH-Werten. Die gemessenen Leitfähigkeiten bei den drei pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5 sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Tabelle 9: Leitfähigkeiten der Hybridomaüberstände bei verschiedenen pH-Werten

pH-Wert Hybridomaüberstand	Leitfähigkeiten [mS/cm]
pH 4,5	8,23
pH 5,0	8,17
pH 5,0	8,18

Die gemessenen Leitfähigkeiten der Hybridomaüberstände sind größer als der höchste gemessene Wert des 150 mM Acetatpuffers. Nutzt man die Leitfähigkeiten der Acetatpuffer in Tabelle 8 zur Kalibrierung würden die bestimmten Leitfähigkeiten der Hybridomaüberstände einem ca. 170 mM Acetatpuffer pH 5,0 entsprechen.

3.6.4 Multicoloranalyse der Proteinadsorption

3.6.4.1 Prinzip

Die Multicoloranalysen wurden für den monoklonalen Antikörper und BSA bei verschiedenen Pufferkonzentrationen und pH-Werten durchgeführt, um Informationen über den Transportmechanismus des Proteins im Porennetzwerk des Adsorbermaterials zu erhalten. Durch konsequente Inkubation von Adsorberpartikeln mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Spezies des zu untersuchenden Proteins kann man die Lage von initial gebundenem Protein im Verlaufe einer Batchadsorptionskinetik im Adsorbermaterial mit dem Konfokalmikroskop detektieren. Nach einem Inkubationsintervall werden jeweils Partikelproben konfokalmikroskopisch analysiert und so ein charakteristisches Adsorptionsmuster erhalten. Unterschiede im Adsorptionsmuster lassen hierbei Rückschlüsse auf die Art des Transportmechanismus zu. Abbildung 36 zeigt den gewünschten Konzentrationsverlauf der konsekutiven Inkubation in der Flüssigphase.

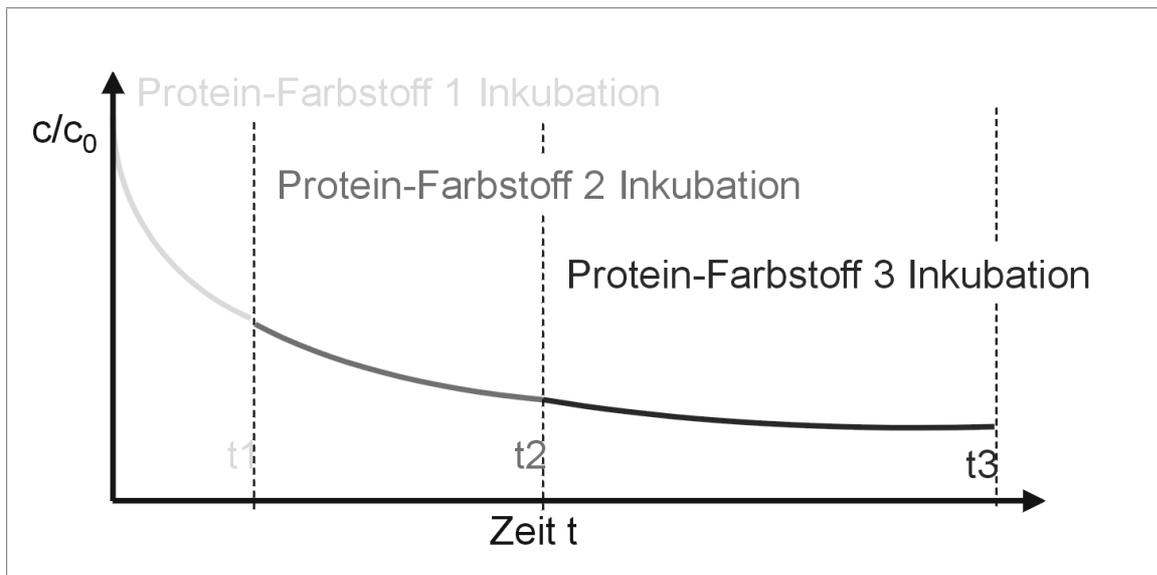


Abbildung 36: Konzentrationsverlauf in der Flüssigphase während einer konsekutiven Inkubation mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Spezies eines Proteins.

Der Konzentrationsverlauf während der konsekutiven Inkubation wird experimentell durch Austausch der Inkubationsüberstände zu verschiedenen Zeiten im Folgenden dargestellt.

3.6.4.2 Experimentelle Durchführung

Die Experimente wurden in 2 mL Gefäßen (Eppendorf, Hamburg) bei Raumtemperatur durchgeführt. Jeweils 1,5 mL verschiedener Reaktionslösungen, die jeweils andere fluoreszenzmarkierte Formen des Zielproteins (mIgG oder BSA) als selektiven Marker enthielten, wurden in 4 Gefäße gegeben (s. Abb. 38). Die Herstellung der Reaktionslösungen erfolgte wie unter 3.6.3.2 beschrieben. Das Konzentrationsverhältnis von markiertem zu unmarkiertem Protein in den Reaktionslösungen betrug bei den Experimenten mit dieser Methode 1:10. Die Ausgangsproteinkonzentrationen c_i wurden in allen Reaktionslösungen gleich eingestellt und durch UV/VIS-Spektroskopie für die jeweilige Lösung kontrolliert.

Weiterhin wurde eine Eichlösung hergestellt, die alle drei Proteinkonjugate in gleicher Konzentration, jedes im Konzentrationsverhältnis 1:10 verdünnt in unmarkierter Proteinlösung enthielt. 1 mL Proben dieser Lösung wurden mit SP-Sepharose FF durch Inkubation und Schütteln über Kopf ins Adsorptionsgleichgewicht inkubiert und zum Abgleich der verschiedenen Detektionskanäle des Konfokalmikroskops eingesetzt. Abbildung 37 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzsignale der einzelnen Detektionskanäle und die resultierenden Fluoreszenzintensitätsprofile eines SP-Sepharose FF Partikels, der mit einer Eichlösung ins Sättigungsgleichgewicht inkubiert wurde.

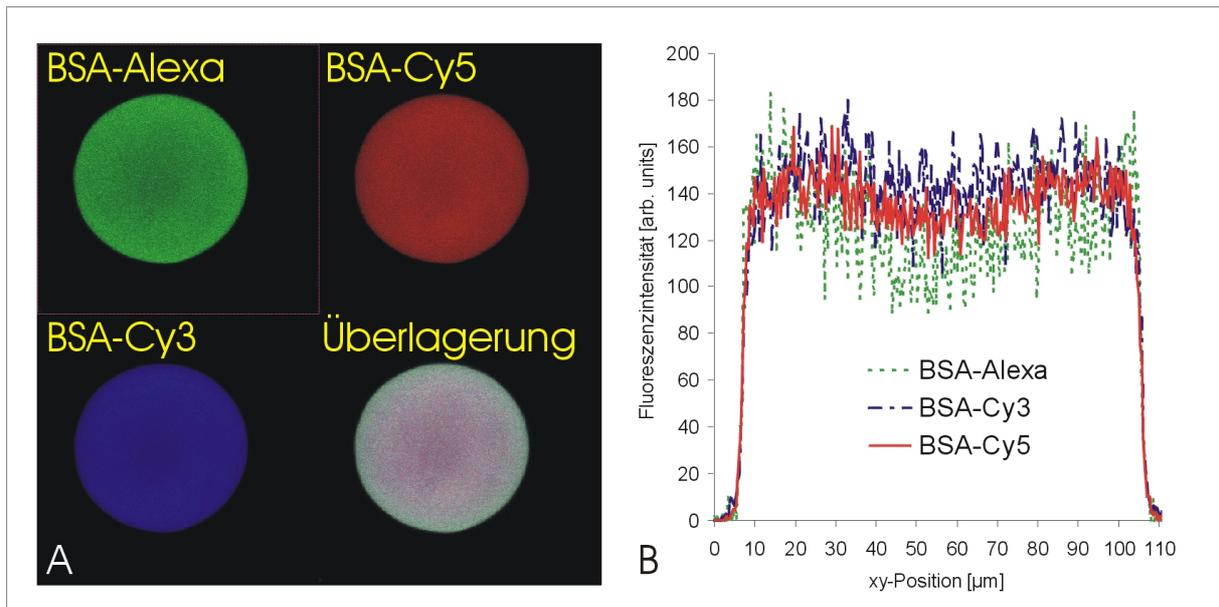


Abbildung 37: Kalibrierung der Detektionskanäle des Konfokalmikroskops mit Hilfe eines SP-Sepharose FF Partikels, der mit allen drei BSA-Farbstoffkonjugaten in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 inkubiert wurde (A) Konfokalbilder der einzelnen Kanäle und Überlagerung (B) Resultierende Fluoreszenzintensitätsprofile

Die Adsorptionskinetiken in den vier Ansätzen wurden durch Zugabe eines definierten Volumens einer equilibrierten Adsorbersuspension (1:3 (v/v) im jeweiligen Puffer) gestartet.

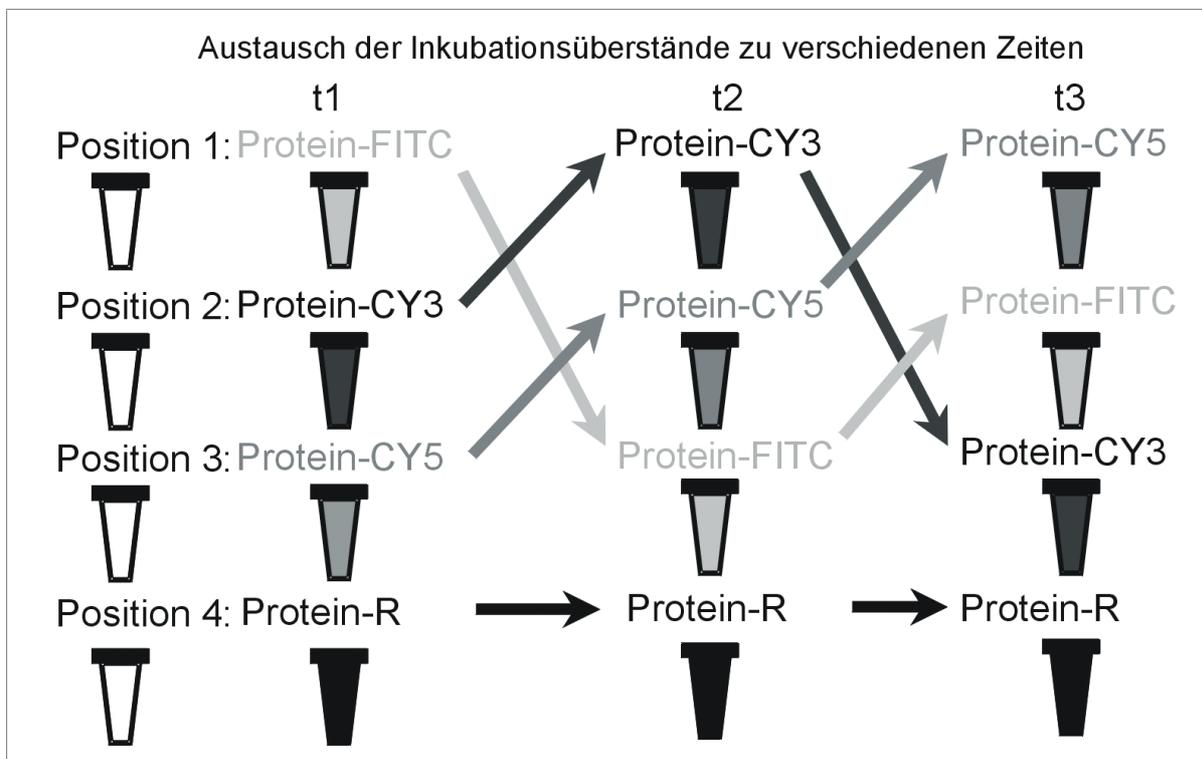


Abbildung 38: Reaktionsführung einer Multicoloranalyse

Die weitere Durchführung folgte dem in Abbildung 38 gezeigten Schema. Für eine bestimmte Zeit t_1 wurden die Versuchsansätze im Dunkeln über Kopf geschüttelt. Danach wurde schnell aus jedem Ansatz eine 0,007 mL Probe entnommen, auf ein Deckglas gegeben und direkt pro/Ansatz 3 Partikel konfokalmikroskopisch untersucht. Gleichzeitig wurden die Ansätze 30 Sekunden bei 14.000 x g zentrifugiert, pro Ansatz 0,1 mL des Überstandes abgenommen, und nach Verdünnung im Verhältnis 1:10 im jeweiligen Puffer, bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration in der Flüssigphase im Dunkeln gelagert.

Nach Abnahme der 0,1 mL Proben wurden die Überstände von drei Ansätzen wie in Abbildung 38 gezeigt, möglichst quantitativ ausgetauscht, während die jeweiligen Partikel in den entsprechenden Ursprungsgefäßen verblieben. Der vierte Ansatz war als Kontrollexperiment gedacht und in die Austauschprozedur nicht involviert.

Anschließend wurden die Ansätze für eine weitere Zeit t_2 im Dunkeln über Kopf geschüttelt. Danach wurden Partikel und Flüssigphasenproben wie bereits beschrieben nochmals analysiert, bzw. gesammelt.

Wiederum erfolgte der Austausch der Inkubationsüberstände der ersten drei Ansätze (s. Abb. 38). Die Ansätze wurden in der Folge im Dunkeln im Überkopfschüttler ins Gleichgewicht inkubiert und Partikel- und Flüssigphasen analysiert.

Die Wahl der einzelnen Inkubationszeiten t_1 , t_2 und t_3 richtete sich nach der Geschwindigkeit der Adsorptionskinetik unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen so dass für jede Farbstoffkonjugatinkubation im Gleichgewicht noch ein ausreichendes Signal im Konfokalmikroskop erhalten wurde.

3.6.5 Auswertung der experimentellen Daten

3.6.5.1 Ermittlung der relativen Kapazität Q_{rel} aus der Partikelphase

Mit den verschiedenen Messroutinen des Konfokalmikroskops werden Konfokalbilder, bzw. Fluoreszenzintensitätsverteilungen von bis zu drei verschiedenen fluoreszierenden Molekülen in einer horizontalen Ebene des Adsorberpartikels erhalten. Jede dieser Fluoreszenzintensitätsverteilungen kann getrennt betrachtet oder aber als überlagertes Konfokalbild dargestellt werden.

Mit Hilfe der Auswertesoftware des Mikroskops wurden zwei Fluoreszenzintensitätsprofile aus den Konfokalbildern generiert. Das Fluoreszenzintensitätsprofil gibt die Fluoreszenzintensitätsverteilung in unbestimmten Fluoreszenzeinheiten (arb. units) über der jeweiligen xy-Position, bzw. dem Partikeldurchmesser in μm wieder (s. 2.5.5). Diese lokal aufgelöste Fluoreszenzinformation kann zur tatsächlichen Konzentration an gebundenem Protein in Beziehung gesetzt werden.

Zur weiteren quantitativen Auswertung wurden zunächst die Spektrenflanken zur Bestimmung des realen Partikeldurchmessers korrigiert. Die Korrektur ist nötig, da unerwünschte Streustrahlung darüber- und darunter liegender Schichten zu keinen streng linearen Intensitätsanstiegen führen (s. Abb. 24). Nach Korrektur der Spektrenflanken wird für jeden Fluoreszenzintensitätswert I_{rad} in Abhängigkeit seiner radialen Position (r_a-r_i) eine Schalenvolumenintensität $I_{integr.}^{Schale}$ nach Gleichung 39 berechnet.

$$I_{integr.}^{Schale} = \bar{I}_{rad} \cdot \left[(r_a^3 - r_i^3) \cdot \frac{4}{3} \pi \right] \quad (39)$$

Eine Aufsummierung aller Schalenvolumenintensitäten führt jeweils zu den kanalspezifischen relativen Kapazitäten $Q_{rel}^{ch}(i)$ mit $i = 1 - 3$ für die einzelnen Kanäle (Gl. 40).

$$Q_{rel}^{ch}(i) = \frac{I_{integr.}}{V_p} = \frac{\sum (I_{integr.}^{Schale})}{V_p} \quad (40)$$

So wurden im Falle der Einkomponentenadsorption ($i = 1$, s. 3.6.3.2), bzw. der Zweikomponentenadsorption ($i = 2$, s. 3.6.3.3 u. 3.6.3.4) die relativen Kapazitäten Q_{rel}^{ch} für jedes Protein aus 6 Profilen pro Zeitwert berechnet und gemittelt.

Bei den Einkomponentenbatchadsorptionskinetiken wurden zusätzlich die relativen Kapazitäten Q_{rel} durch Division mit der relativen Kapazität im Gleichgewicht Q_{rel}^{∞} normiert (Fractional Approach to Equilibrium). Diese Daten wurden als Zeitkurve in Abhängigkeit des Adsorptionsverlaufes an das „Shrinking Core“ oder „Homogeneous Diffusion“ Adsorptionsmodell angepasst, um die effektive Diffusivitäten $D_p(eff)$ u. $D_H(eff)$ zu bestimmen, und die Adsorptionskinetiken bei unterschiedlichen pH-Werten und Ionenstärken vergleichen zu können (s. 2.4.6).

Bei den Zweikomponentenexperimenten wurde im Gegensatz dazu ein charakteristische Adsorptionsrate $AUR_{300}(D)$ nach 5 minütiger Adsorption für jedes Protein berechnet um zusätzliche quantitative Aussagen treffen zu können.

Im Falle der Multicoloranalysen ($i = 1 - 3$) entstehen alle Fluoreszenzintensitätsprofile durch Adsorption des gleichen Proteins. Deshalb wurden die relativen Kapazitäten Q_{rel}^{ch} der einzelnen Kanäle (1 - 3) zur relativen Gesamtkapazität Q_{rel} des Proteins weiter aufsummiert (Gl.(41)).

$$Q_{rel} = \sum_{i=1}^3 Q_{rel}^{ch}(i) \quad (41)$$

So wurde aus einem Experiment mit allen möglichen Farbstoffinkubationssequenzen und einem Kontrollexperiment 4 relative Gesamtkapazitäten Q_{rel} pro Zeitwert ($t_1 - t_3$) erhalten, die nochmals arithmetisch gemittelt wurden.

Zur Bestimmung der relativen Kapazitäten aus den Fluoreszenzintensitätsprofilen wurden, zwei Softwareprogramme mit Namen Convert und Analyse entwickelt, die die Auswertung erheblich vereinfachten. Im Anhang B sind die „Listings“ der beiden Programme gezeigt, die zur Auswertung benutzt wurden.

3.6.5.2 Ermittlung der absoluten Kapazität $Q_{abs}(t)$ aus der Flüssigphase

In den gesammelten Flüssigphaseproben der Batchadsorptionskinetiken und Multicoloranalysen wurde durch Messung der kalibrierten Fluoreszenzintensität die Proteinkonzentration zum Probenzeitpunkt bestimmt.

Durch Kenntnis der Systemvolumina V_{sys} und V_{Gel} konnte die aktuelle, absolute Kapazität $Q_{abs}(t)$ des Adsorbermaterials zu jedem Zeitpunkt aus der Massenbilanz der Proteinkonzentration ($c_i - c_t$) nach der folgenden Gleichung berechnet werden (Gl. 42).

$$Q_{abs}(t) = \frac{V_{sys} \cdot (c_i - c_t)}{V_{Gel}} \quad (42)$$

Die berechneten absoluten Kapazitäten wurden in Paritätsplots gegen die ermittelten relativen Kapazitäten Q_{rel} zur Kalibrierung der relativen Kapazität graphisch aufgetragen.

3.6.5.3 Ermittlung eines charakteristischen Adsorptionsrate $AUR_{300}(D)$

Die Zweikomponentenbatchadsorptionskinetiken bei verschiedenen experimentellen Bedingungen zeigten, dass bei der gleichzeitigen Adsorption von mIgG und BSA sehr komplexe Gleichgewichte und Verteilungen entstehen, die nicht mit den bekannten Adsorptionsmodellen mathematisch beschreibbar sind (siehe 4.4). Deshalb wurde auf die Anpassung der experimentellen Zweikomponentendaten an bestehende, mathematische Modelle verzichtet und zum quantitativen Vergleich ein charakteristische Adsorptionsrate $AUR_{300}(D)$ nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten (= 300 Sekunden) wie folgt berechnet.

Mit Hilfe des Paritätsplots in Abbildung 39 konnte für jede relative Kapazität, berechnet aus dem Fluoreszenzintensitätsprofil (5 Minuten), eine absolute Kapazität $Q_{abs}(300)$ ermittelt werden. Gleichzeitig wurden die beiden eindimensionalen Eindringtiefen D aus dem zugehörigen Fluoreszenzintensitätsprofil bestimmt und arithmetisch gemittelt.

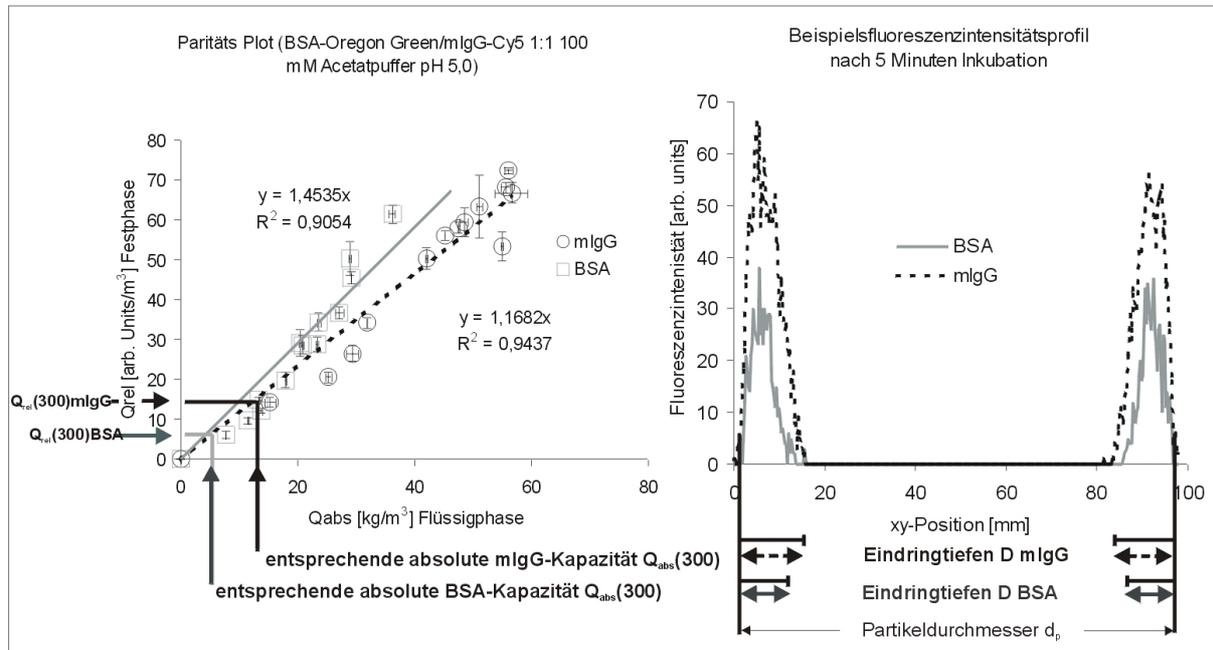


Abbildung 39: Bestimmung der molaren Adsorptionsrate $AUR_{300}(D)$

Bei Kenntnis des Partikeldurchmessers d_p kann ein von Protein besetztes Schalenvolumen berechnet werden, das anschließend noch mit der molaren Kapazität multipliziert wird und man erhält $AUR_{300}(D)$ in mol/s (Gl. 43).

$$AUR_{300}^{Protein}(D) = \left(\frac{Q_{abs}^{Protein}(300)}{M_w \cdot 300} \right) \cdot \left(\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\left(\frac{d_p}{2} \right)^3 - \left(\frac{d_p}{2} - D \right)^3 \right) \right) \quad (9)$$

Die charakteristische molare Adsorptionsrate $AUR_{300}(D)$ ist ein proteinspezifischer Wert, der zum Vergleich der Zweikomponentenadsorptionsexperimente bei den verschiedenen experimentellen Bedingungen herangezogen wurde.

3.7 Adsorptionsisothermen

3.7.1 Versuchsprinzip

Zur thermodynamischen Beschreibung der Adsorptionsgleichgewichte unter den jeweiligen Versuchsbedingungen wurden für die Einkomponenten- und Zweikomponentenadsorptionen des monoklonalen Antikörpers oder/und BSA an SP-Sepharose FF Gleichgewichtsdaten durch Batchadsorption im Mikromaßstab erzeugt. Die verwendete Methode wurde von Karol Lacki (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) entwickelt (nicht publiziert).

Zur Generierung der Gleichgewichtsdaten wurden 0,8 mL Proben einer Verdünnungsreihe des Proteins unter den gewählten Bedingungen mit 0,035 mL „Adsorberplaques“ in dicht verschließbaren Beckmann „Deep Well Platten“ Nr. 267001, (München) im Überkopfschüttler ins Gleichgewicht inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach den experimentellen Bedingungen und lag zwischen 24 und 50h. Die Proteinverdünnungen bei drei verschiedenen Pufferkapazitäten wurden ausgehend von Stammlösungen mittels eines Pipettierroboters der Marke Gilson Liquidhandler 215 (Gilson, Langenfeld) hergestellt.

Die Herstellung der Stammlösungen sowie das weitere Vorgehen erfolgte für Einkomponentenadsorptionen wie unter 3.7.3, für Zweikomponentenadsorptionen wie unter 3.7.4 beschrieben. Nach Inkubation in den Beckmann „Deep Well“ Platten wurde die Adsorberpartikel in den Ansätzen durch Zentrifugation (5 Minuten bei 1000 rpm) in einer Beckmann Zentrifuge J6 mit einem Beckmann JR3.2 Rotor (München) sedimentiert. Die Bestimmung der Gleichgewichtskonzentrationen c_{eq} erfolgte wie unter 3.7.3 bzw. wie unter 3.7.4 beschrieben.

$$Q_{eq}(\text{Protein}) = \frac{V_{sys} \cdot (c_i - c_{eq})}{V_{gel}} = \frac{0,800 \cdot (c_i - c_{eq})}{0,035} \quad (10)$$

Die jeweiligen Proteinkapazitäten $Q_{eq}(\text{Protein})$ konnten bei Kenntnis der initialen Proteinkonzentration(en) c_i anhand dieser Daten nach Gleichung 44 berechnet und gegen die jeweilige, ermittelte Gleichgewichtskonzentration c_{eq} als Adsorptionsisotherme graphisch aufgetragen werden.

3.7.2 Herstellung der „Adsorberplaques“ mit einem definierten Volumen

„Adsorberplaques“ sind kleine gepackte Adsorbtabletten, die mit Hilfe des Microcube 96 (s. Abb. 15), entwickelt von Karol Lacki (Amersham Pharmacia Biotech Uppsala, Schweden), wie folgt hergestellt wurden. Zunächst wurden 10g (für 96 Plaques) SP-Sepharose FF, mit Wasser im gesinterten Glastrichter gewaschen. Anschließend wurde eine Adsorbmischung (SP-Sepharoseanteil > 50%) mit Wasser hergestellt. Mit einer Multikanalpipette (Eppendorf,

Hamburg) wurden 0,3 mL Adsorbermischung/well in die 96 Öffnungen des Microcube 96 pipettiert. Der Microcube wurde an den Seiten mit Parafilm abgedichtet und 5 Minuten bei 1000 rpm in einer Beckmann Zentrifuge J6 mit einem Beckmann JR3.2 Rotor zentrifugiert. Anschließend wurde das Ober- und Unterteil des Microcube entfernt (s. Abb. 40). Der Mittelteil, der genau auf die „Deep Well“ Platten von Beckmann passt, enthält dann in seinen 96 Bohrungen die gepackten Adsorbentabletten. Diese wurden mit einem Metallstift geeigneten Durchmessers in die Öffnungen der Beckmann „Deep Well“ Platten gedrückt.

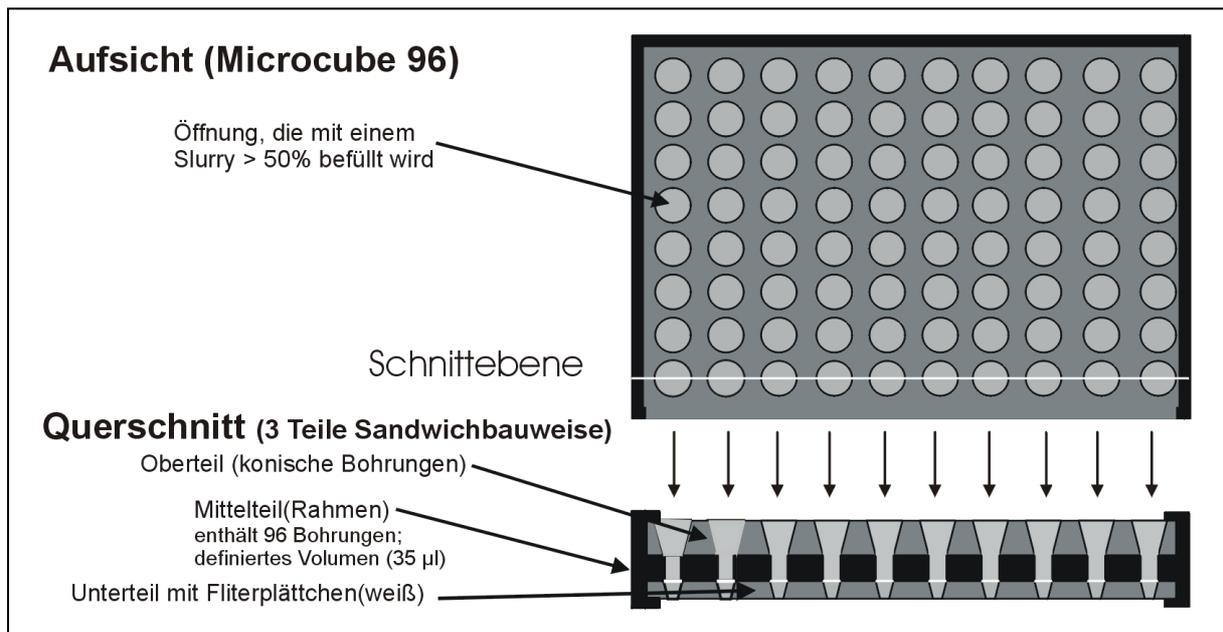


Abbildung 40: Aufbau des Microcube 96 zur Darstellung von 0,035 mL Adsorbentabletten

3.7.3 Einkomponentenadsorption monoklonaler Antikörper oder BSA

Die experimentellen Daten zur Beschreibung des Adsorptionsgleichgewichts wurden für die drei untersuchten pH-Werte 4,5; 5,0 und 5,5 für 3-4 verschiedene Pufferkonzentrationen generiert.

Dazu wurden jeweils die folgenden Stammlösungen hergestellt, aus denen der Gilson Liquid Handler 215 (Langenfeld) nach einem definierten Programm die einzelnen 0,8 mL Ansätze mischte:

Stammlösung Protein	(gelöst in 10 mM oder 50 mM Acetatpuffer pH x)
Pufferlösung	(10 mM oder 50 mM Acetatpuffer pH x)
Pufferlösung (konz.)	(500 mM Acetatpuffer pH x)

Die Konzentration von mIgG oder BSA in der Proteinstammlösung richtete sich jeweils nach den experimentellen Bedingungen (pH-Wert) und wurde durch UV-Spektroskopie bei 280 nm bestimmt.

0,2 mL der Inkubationsüberstände in den Beckmann „Deep Well“ Platten wurden mittels eines Gilson Multiprobe Liquid Handlers 215 in UV-Mikrotiterplatten überführt und die Bestimmung der Gleichgewichtsproteinkonzentration erfolgte durch Messung der kalibrierten Extinktion bei 280 nm.

Zur mathematischen Beschreibung der Isotherme wurden zwei verschiedene Isothermenmodelle, das SMA-Modell nach Brooks und Cramer (Brooks und Cramer 1992) und das einfachere Modell nach Langmuir z.B. in (Nicoud und Seidel-Morgenstern 1996) mit Scientist Programm Vers. 2.0 von MicroMath Inc. (Salt Lake City, USA) an die Gleichgewichtsdaten angepasst.

Die in allen Experimenten verwendete Charge SP-Sepharose FF besaß Sulfopropyliganden in einer Ligandendichte von 0,214 mmol H⁺/mL Gel (Ljunglöf 2000). Dieser Wert wurde bei der SMA-Anpassung als totale Ionenkapazität Q_{tot} verwendet.

3.7.4 Zweikomponentenadsorption monoklonaler Antikörper und BSA

Zur Generierung von Gleichgewichtsdaten für Zweikomponentenisothermen bei den drei verschiedenen pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5 wurden jeweils folgende Stammlösungen hergestellt, die der Gilson Liquid Handler 215 (Langenfeld) nach einem Programm in geeigneten Verhältnissen mischte:

Stammlösung Protein 1	(in 50 mM Acetatpuffer pH x)
Stammlösung Protein 2	(in 50 mM Acetatpuffer pH x)
Pufferlösung (konz.)	(in 500 mM Acetatpuffer pH x)

Für Zweikomponentenproteinadsorptionen konnte die Absorption bei 280 nm nicht zur selektiven Detektion herangezogen werden, da sowohl der monoklonale Antikörper als BSA aromatische Aminosäuren besitzen, die bei dieser Wellenlänge Licht absorbieren. Eine selektive Detektion wurde durch Markierung beider Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften erreicht. Proben des monoklonalen Antikörpers wurden hierzu mit Cy5 und BSA-Proben mit dem Alexa Fluoreszeinderivat markiert. Die Herstellung der Stammlösungen 1 und 2 erfolgte durch Mischung der jeweiligen markierten und unmarkierten Proteinspezies in einem Verhältnis von 1:10. Nach Inkubation der Ansätze und Sedimentation der Adsorberpartikel erfolgte die Bestimmung der Gleichgewichtskonzentration im Überstand durch Messung der kalibrierten Fluoreszenzintensitäten mit einem SPEX Fluorolog-3 Fluoreszenzspektrometer der Firma JY

Horiba (Edison, NJ, USA). Die spezifischen Geräteeinstellungen für die beiden Fluorophore sind in Tab. 6 aufgeführt.

Die SMA-Parameter des SMA-Modells (Brooks und Cramer 1992) wurden mit dem Scientist Programm Vers. 2.0 von MicroMath (Salt Lake City, USA) durch 6 Parameteranpassung an Gleichgewichtsdaten der Zweikomponentenadsorption und der zugehörigen Einkomponentendaten ermittelt, um das Zweikomponentengleichgewicht mathematisch zu beschreiben. Die experimentellen Daten sind im Anhang aufgeführt (s. Anhang F).

3.8 Proteintitration

Um die Abhängigkeit der Gesamtladung eines Proteins vom pH-Wert zu untersuchen wurden Titrationskurven von entsalzten Proben des monoklonalen IgG 2a Antikörpers (mIgG) und BSA aufgenommen.

Dazu wurden konzentrierte Proben der Proteine durch Gelfiltration (2 Läufe pro Probe) unter folgenden Bedingungen entsalzt und auf Aqua dest eingestellt:

Chromatographiesäule:	XK50 (r = 5 cm, h = 44 cm) AP-Biotech (Freiburg)
Volumen:	865 mL mit Aqua dest. equilibriert
Material:	Sephadex TM -G25 AP-Biotech (Freiburg)
Pumpe:	Abimed Miniplus S3 (Langenfeld)
Fliessgeschwindigkeit:	10 mL/min (~30 cm/h)
Isokratische Elution:	Aqua dest.

Die Elution des Proteins wurde durch Detektion bei 280 nm mit einen variablen Wellenlängenmonitor der Firma Knauer (Berlin) kontrolliert. Die Proteinkonzentration der umgepufferten Proteinlösung wurde durch UV-Spektroskopie bestimmt.

Der Titer der beiden Titrationslösungen 0,1 M HCl und 0,1 M NaOH, bezogen als Fixanal von Riedel de Haen, bzw. der Sigma Aldrich GmbH (Seelze) wurde mit Natriumcarbonat (HCl) und Natriumphtalat (NaOH) bestimmt.

Titer der Titrationslösungen:

HCl: 0,1002

NaOH: 0,0999

Eine definierte Menge der Proteinlösung wurde als Vorlage V_0 in einen dicht verschließbaren, thermostatisierten Behälter ($T = 25^\circ\text{C}$) gegeben, der in der Folge mit Stickstoff begast wurde, um einen CO_2 -Eintrag in die Lösung zu unterbinden.

Das Volumen der Vorlagen V_0 wurde durch differentielle Wägung ermittelt. Genähert wurde hierbei, dass die Dichte der wässrigen Proteinlösung $\rho = 1,0 \text{ kg/m}^3$ beträgt. Die Vorlage wurde auf einem 728 DMS Magnetprüher der Firma Methrom GmbH (Herisau, Schweiz) mit konstanter Drehzahl gerührt. Die Zudosierung während der Titration erfolgte automatisch mit einem 716 DMS Titrimo der Metrohm GmbH (Herisau, Schweiz). Nach jeder Dosage (0,002-0,010 mL) wurde 50 Sekunden zur Gleichgewichtseinstellung gewartet, bevor mit einer 6.0204.100 Glaselektrode der pH-Wert jeweils gemessen und gespeichert wurde (Methrom GmbH, Herisau, Schweiz).

Zwei Vorlagen pro Protein wurden einmal mit NaOH bzw. HCl in eine Richtung titriert und in der Folge mit der entgegengesetzten Lösung nochmals zurücktitriert.

Zur Auswertung wurde die Änderung der Proteingesamtladung Δz bei jedem gemessenen pH-Wert nach folgender Gleichung berechnet (Gl. 45).

$$\Delta z = \frac{\frac{mL_{\text{zugegeben}} \cdot \text{Titer}_{\text{NaOHo.HCl}}}{1000} - \left[(V_0 + mL_{\text{zugegeben}}) \cdot \frac{K_w^0}{(10^{-\text{pH}_{\text{gemessen}}})} - V_0 \cdot \frac{K_w^0}{(10^{-\text{pH}_0})} \right]}{n_{\text{Proteinlösung}}} \quad (45)$$

Bei Kenntnis des isoelektrischen Punktes der Proteine kann Δz in die absolute Proteinladung z umgerechnet werden.

Die eigentliche Titrationskurve ergibt sich dann aus einer Auftragung der absoluten Proteinladung z gegen den pH-Wert.

4. Experimentelle Ergebnisse

4.1 Validierung des experimentellen Systems

4.1.1 Biochemische- und chromatographische Charakterisierung der Proteinkonjugate

4.1.1.1 Problematik

Fluoreszenzmarkierte Proteinkonjugate dienen als selektive Marker zur Lokalisierung der Spezies in porösen Adsorberstrukturen mittels konfokaler Laser-Raster Mikroskopie. Die Fluoreszenzintensität der gebundenen Konjugate wird zur Quantifizierung aus den Konfokalbildern nach Generierung von Fluoreszenzintensitätsprofilen ermittelt (s. 2.5.5). Die experimentellen Ergebnisse sind deshalb sehr stark von dem jeweiligen fluoreszenzmarkierten Proteinkonjugat abhängig. Die Markierungsgrade (D/P), bzw. die Anzahl Farbstoffmoleküle, die an ein Proteinmolekül gebunden sind, betragen in Abhängigkeit vom Fluorophor im Rahmen dieser Arbeit zwischen 0,4 und 2,5. Inwieweit sich diese Modifizierung auf die biochemischen- und chromatographischen Eigenschaften der Spezies auswirkt, wurde näher untersucht. In verschiedenen, experimentellen Ansätzen wurden dazu die Proteinkonjugate und unmarkierten Spezies in bezug auf die nachfolgend aufgelisteten Faktoren charakterisiert und verglichen:

- Ladungszustand
- Molekulargewicht und molekulare Struktur
- Aggregatbildung oder Abbau der Proteine
- Adsorptions-/Desorptionsverhalten

Die kovalente Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die Modellproteine erfolgt unter den verwendeten Reaktionsbedingungen nahezu ausschließlich über die freien Aminogruppen des Proteins. Der sehr geringe Anteil an Fluorophormolekülen, der über die Sulfhydryl- und Hydroxylgruppen der Aminosäureseitenketten unter den gewählten Reaktionsbedingungen an das Protein bindet, kann hierbei vernachlässigt werden.

Die freien Aminogruppen des Proteins, der N-Terminus, aber auch die ϵ -Aminogruppen des Lysins und die Guanidinogruppe im Arginin tragen durch ihr Protonierungs-/Deprotonierungsgleichgewicht zur Ladung des Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert bei. Durch die Modifizierung der Aminogruppen mit Fluoreszenzfarbstoffen wird der Ladungszustand des Proteins durch das Wegfallen potentieller Ladungsträger geändert. Zusätzlich werden bei einigen Fluoreszenzfarbstoffen 1-4 neue Ladungen pro

Fluorophormolekül, das an das Proteinmolekül konjugiert ist, zugeführt. Das Ausmaß dieser Änderungen kann durch die Bestimmung der isoelektrischen Punkte pI , bzw. dem pH-Wert bei dem sich die Ladungen des Proteins egalieren und die Nettoladung null ist, ermittelt werden.

Die Bindung von Fluoreszenzfarbstoffmolekülen an Proteinmoleküle beeinflusst die molekulare Masse und die Struktur des Proteins. Je nach Fluoreszenzfarbstoff wird das Molekulargewicht des Proteins durch die Bindung eines Farbstoffmoleküls um ca. 400 – 700 Da erhöht.

Weiterhin kann es, bedingt durch die alkalischen Reaktionsbedingungen (pH 9,3) der Kopplungsreaktion, zu verstärkten Aggregationen, aber auch Degradationen der Proteinmoleküle kommen. Größen- und Strukturunterschiede der Spezies können durch isokratische Elution von Proteinproben von einer kalibrierten Gelpermeationschromatographiesäule und Bestimmung der K_{av} -Werte näher untersucht werden.

Eine Änderung der chromatographischen Eigenschaften der Proteinkonjugate ist bei der im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Kationenaustauschchromatographie durch einen geänderten Ladungszustand möglich. Eine veränderte Proteinstruktur könnte die Bindungseigenschaften des Proteins sterisch beeinflussen. In einer HPLC-Analyse wurden zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Spezies die Retentionszeiten R_t im linearen Salzgradienten bestimmt und gegenübergestellt.

4.1.1.2 Vergleich der isoelektrischen Punkte (Isoelektrische Fokussierung)

Zunächst wurden alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe an BSA wie unter 3.5.2 beschrieben konjugiert und zusammen mit unmarkiertem BSA die pI -Werte, durch isoelektrische Fokussierung im Agarosegel bestimmt.

Zu Beginn des Projektes, als noch sehr wenig Protein (6 mg Protein/Markierungsansatz) in der Kopplungsreaktion eingesetzt wurde, konnte eine Erniedrigung des isoelektrischen Punktes beobachtet werden (s. 3.3.1 Abb. 26). Später wurde das Protein/Farbstoffkonzentrationsverhältnis auf 15 mg Protein/Markierungsansatz erhöht und folglich die Anzahl der Farbstoffmoleküle, die pro Proteinmolekül gebunden sind, gesenkt.

Tabelle 10: Isoelektrische Punkte pI verschiedener BSA/Farbstoffkonjugate und prozentuale Abweichungen im Vergleich mit unmarkiertem BSA.

Proteinkonjugat	pI
BSA (unmarkiert)	4,68
BSA-Alexa	4,68
BSA-Oregon	4,71
BSA-Cy3	4,71
BSA-Cy5	4,74

In Tabelle 10 sind die pI -Werte aller BSA-Konjugate zusammengefasst.

Es wurden bei dieser experimentellen Serie Abweichungen von maximal 1,3 % gefunden. Der Messfehler, der sich bei der Bestimmung des pI im Agarosegel, durch Vergleich der charakteristischen Wanderungstrecken mit denen von Standardproteinen ergibt, ist hierbei noch nicht berücksichtigt und schwer bestimmbar.

Es ist in keinem Fall eine signifikante Änderung des Protonierungs-/Deprotonierungsgleichgewichtes durch eine kovalente Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an BSA zu beobachten.

4.1.1.3 Vergleich der K_{av} -Werte und des Molekulargewichts M_w (Gelpermeationschromatographie)

Eine Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts M_w eines Proteins ist die analytische Gelpermeationschromatographie oder Gelfiltration. Hierbei hängt die Verweilzeit des Moleküls in der Säule bei isokratischer Elution stark von den Diffusionseigenschaften des Moleküls im Porengerüst der Matrix ab. Als charakteristische Größe zur Vergleichbarkeit dieser Eigenschaften dient der K_{av} -Wert, der mit Gleichung 35 ermittelt wurde. Unter den gewählten Bedingungen ist das Elutionsvolumen V_e der Proteinmoleküle dabei nur noch vom Molekulargewicht und der molekularen Struktur des Moleküls abhängig und so kann zusätzlich das Molekulargewicht der Moleküle nach Eichung der Chromatographie näherungsweise bestimmt werden.

Im Rahmen des Projektes kamen vier verschiedene Fluorophore zum Einsatz, die zwei verschiedenen Farbstoffklassen angehören. Es wurden deshalb von jeder Proteinspezies das unmarkierte Protein und ein Konjugat jeder Farbstoffklasse durch Gelpermeationschromatographie analysiert und aus den ermittelten Elutionsvolumina V_e die K_{av} -Werte und das Molekulargewicht M_w bestimmt. Als Fluoreszeinderivat wurde Oregon Green und als Cyaninfarbstoff Cy5 gewählt, da mit diesen Konjugaten die meisten kinetischen Experimente durchgeführt wurden.

Tabelle 11 fasst die ermittelten Werte aus diesen Experimenten für beide Proteine und die Derivate zusammen. In allen Fällen waren die Elutionsprofile der markierten Spezies und unmarkierten Spezies von gleicher Form. Es wurden bei den Proteinkonjugaten keine zusätzlichen Elutionspeaks, die durch abgebaute oder aggregierte Proteine entstehen könnten, beobachtet.

Tabelle 11: K_{av} -Werte und berechnete Molekulargewichte M_w aus den Gelfiltrationsexperimenten für verschiedene Protein/Farbstoffkonjugate (n=2)

Proteinkonjugat	K_{av}	Prozentuale Abweichung [%]	M_w [Da]
mIgG	0,383	-	150.494
mIgG-Oregon	0,392	5,87	141.628
mIgG-Cy5	0,385	0,52	148.979
BSA	0,500	-	68.391
BSA-Oregon	0,504	0,79	66.680
BSA-Cy5	0,500	-	68.548

Im Falle des Antikörpers zeigen die beiden Konjugate eine maximale Abweichung von 6%. Die berechneten Molekulargewichte liegen im Bereich von 140 – 150 kDa und somit nahe dem massenspektroskopisch bestimmten Molekulargewicht des monoklonalen Antikörpers. Die K_{av} -Werte der markierten Spezies sind im Vergleich zum unmarkierten Protein erhöht und das berechnete Molekulargewicht M_w folglich niedriger als der Wert des nativen Proteins. Da sich das Molekulargewicht des Proteins aber aufgrund der Stöchiometrie der Kopplungsreaktion eigentlich erhöhen muss, ist wiederum die Signifikanz dieser Abweichungen in Frage gestellt.

Die bestimmten Molekulargewichte der BSA-Spezies mit Werten zwischen 67 – 69 kDa stimmen wiederum gut mit massenspektroskopischen Daten überein. Die Variation der bestimmten K_{av} -Werte der untersuchten BSA-Spezies ist noch geringer. Hier kommt es nur beim Oregonkonjugat zu einer positiven Abweichung von ca. 1%, die wiederum der erwarteten Molekulargewichtserhöhung widerspricht. Diese Größenordnungen liegen aber mit Sicherheit im Bereich des experimentellen Fehlers der Bestimmungsmethode.

Das Elutionsverhalten der Farbstoffkonjugate unterscheidet sich nicht signifikant von den unmarkierten Proteinen. Mit dieser Methode konnten auch keine zusätzlichen Aggregate oder Molekülfragmente detektiert werden, was auf konservierte Moleküleigenschaften schließen lässt und einen Einsatz der Farbstoffkonjugate in den Transportexperimenten rechtfertigt.

4.1.1.4 Vergleich der charakteristischen Retentionszeiten R_t (Ionenaustauschchromatographie)

Die Adsorptionseigenschaften der Konjugate wurden im Vergleich zu den unmarkierten Proteinen durch Elutionsstudien im linearen Salzgradienten charakterisiert. Bei dieser Untersuchung erfolgte die Analyse des Elutionsverhaltens aller im Rahmen des Projektes eingesetzten Proteinkonjugate von BSA und mIgG. Als chromatographischer Träger wurde hierbei der Kationenaustauscher SP-Sepharose FF eingesetzt, der auch bei den Transportuntersuchungen Verwendung fand. Proben der markierten und unmarkierten Proteine wurden wie unter 3.3.6 beschrieben im linearen Salzgradienten analysiert.

Tabelle 12: Retentionszeiten R_t verschiedener Protein/Farbstoffkonjugate nach Elution im linearen Salzgradienten von SP-Sepharose FF

Proteinkonjugat	Retentionszeit R_t	Prozentuale Abweichung [%]
mIgG (unmarkiert)	18,63	-
mIgG-Alexa	18,59	0,21
mIgG-Oregon	18,07	3,09
mIgG-Cy3	18,37	1,41
mIgG-Cy5	18,50	0,68
BSA (unmarkiert)	13,93	-
BSA-Alexa	13,79	1,04
BSA-Oregon	14,06	0,95
BSA-Cy3	13,68	1,80
BSA-Cy5	13,81	0,86

Die gemittelten Retentionszeiten R_t und prozentualen Abweichungen dieser experimentellen Serie sind in Tabelle 12 gezeigt. Wiederum waren die Elutionsprofile aller markierten Spezies mit den zugehörigen Profilen der unmarkierten Proteine von der Form her vergleichbar. Es wurden keine zusätzlichen Elutionspeaks detektiert.

Ein Vergleich der Retentionszeiten der mIgG-Derivate zeigt, dass die Retentionszeiten der markierten Spezies allesamt kleiner als der Bezugswert des unmarkierten, monoklonalen Antikörpers sind. Die Abweichungen betragen dabei maximal 3,1 %. Im Falle der BSA-Konjugate beträgt die größte Abweichung der Retentionszeit 1,8% bei der Elution des BSA-Cy3 Konjugates. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das Retentionsverhalten der Proteine durch die Fluoreszenzmarkierung nicht verändert wird.

4.1.2 Optische Charakterisierung der Fluoreszenzfarbstoffe und Proteinkonjugate

4.1.2.1 Problematik

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transportuntersuchungen mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie werden teilweise bis zu drei verschiedene Proteinkonjugate, bzw. Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Die Fluoreszenzemission, bzw. die Quantenausbeute eines Fluorophores kann dabei durch das umgebende Milieu im Experiment beeinflusst werden. Das Ausmaß dieses Einflusses ist hierbei vor allen Dingen von der Art des Fluorophores abhängig. Zur Charakterisierung der optischen Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe wurden dabei die folgenden Eigenschaften näher untersucht.

- Fluoreszenzeigenschaften bei niedrigem pH-Wert
- Fluoreszenzeigenschaften in der Adsorbermatrix
- Gegenwart anderer Fluorophore

Die Transportuntersuchungen erfolgten alle in einem Acetatpuffersystem bei einem leicht sauren pH-Wert von 4,5 bis 5,5. Für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe wurden Anregungs- und Emissionsspektren in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 aufgenommen, um potentielle Verschiebungen der Anregungs- und Emissionsmaxima und gravierende Änderungen der Quantenausbeute in dem sauren pH-Bereich zu ermitteln.

Das Trägermaterial selbst kann durch optische Attenuations- und Aberrationseffekte auch die detektierbare Signalintensität beeinflussen und die Geometrie der Fluoreszenzemission wird regional von der molekularen Umgebung abhängig. Bei den Transportuntersuchungen wird die emittierte Fluoreszenz mit dem Konfokalmikroskop aus einem kugelförmigen Adsorberpartikel gemessen. Ein optischer Einfluss der Agarosematrix durch Attenuationseffekte könnte die Konfokalbilder verfälschen, da die detektierbare Strahlungsmenge von Fluorophoren aus einem Voxel, aufgrund unerwünschter Absorptions- und Streuungseffekte an der Matrix regional unterschiedlich sein kann (Margadant et al. 1996).

Zusätzlich kann es bei einem großen Unterschied der Brechungsindizes der wässrigen Proteinlösung und der Adsorbermatrix zu Aberrationseffekten kommen. Diese könnten aufgrund der kugelförmigen Geometrie des Adsorberpartikels die lokal detektierbare Fluoreszenzemission verändern (Hell et al. 1993).

Das Ausmaß dieser Effekte wurde für den betrachteten SP-Sepharose FF Träger durch konfokalmikroskopische Analyse von Partikelproben untersucht, die homogen mit

Proteinkonjugat gesättigt waren. Ohne diese Effekte müsste dabei eine homogene Fluoreszenzintensität über die ganze betrachtete Partikelebene beobachtet werden.

Bei der Verwendung mehrerer verschiedener Fluorophore in einem Experiment kann es bei dem Versuch der unabhängigen Detektion einzelner Fluoreszenzsignale mit dem Konfokalmikroskop und den Fluoreszenzspektrometern zu „Crosstalk“ und Energietransportphänomenen zwischen den Fluorophoren kommen, die die individuelle Quantenausbeute stark beeinflussen können. Die Veränderung der individuellen Quantenausbeute durch Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) oder ähnliche Lösprozesse könnte die detektierten Fluoreszenzintensitäten im Konfokalbild bei der Zweikomponentenadsorption und bei der Multicoloranalyse verfälschen.

4.1.2.2 Spektrale Eigenschaften der Fluorophore bei pH 5,0

Die Aufnahme von Anregungs- und Emissionsspektren erfolgte mit Proben der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in 50 mM Acetatpuffer bei pH 5,0 im Fluoreszenzspektrometer. Der Fluoreszenzfarbstoff lag in der Probenlösung in einer Konzentration von 10^{-7} M vor. Die aufgenommenen Spektren der einzelnen Fluorophore sind in Abbildung 41 (A-D) gegenübergestellt und normiert auf die Maximalintensität bezogen.

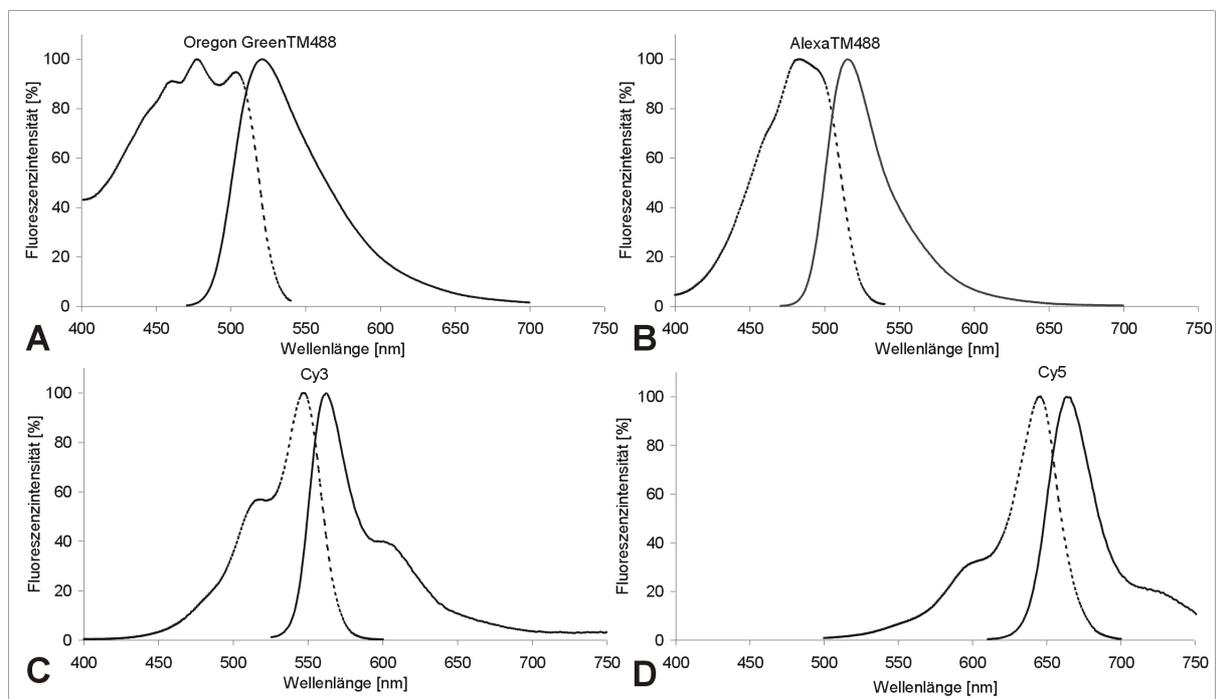


Abbildung 41: Anregungs- und Emissionsspektren der reinen Fluoreszenzfarbstoffe (A) Oregon Green™488, (B) Alexa™488, (C) Cy3 und (D) Cy5 in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0. Die Anregungsspektren sind gestrichelt markiert

Alle verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe besitzen auch bei einem pH-Wert von 5,0 ein charakteristisches Anregungs- und Emissionsspektrum. Die Anregungs- und Emissionsmaxima der Fluorophore sind bis auf 2 – 3 nm mit den vom Hersteller angegebenen Maxima bei pH 7,0 – 9,0 identisch.

Lediglich das Anregungsspektrum von Oregon Green zeigt einen untypischen Verlauf, da hier um das Anregungsmaximum bei 496 nm lokale Minima detektiert wurden (s. Abb. 41 (A)). Bei diesem Fluoreszeinderivat handelt es sich nach Angaben des Herstellers um ein Fluorophor, bei dem die Quantenausbeute mit Erniedrigung des pH-Wertes im Bereich um 5,0 bereits deutlich sinkt (Verschiedene 1999). Es wird daher teilweise zur fluorimetrischen Bestimmung von pH-Werten im Fluoreszenzspektrometer und Konfokalmikroskop verwendet (Sjoback et al. 1995; Spiess und Kasche 2001).

Das Emissionsspektrum des Oregon Greens (Abb. 41 (A)) zeigt den für Fluoreszeinderivate typischen Verlauf mit einem Maximum bei 522 nm. Im Vergleich dazu ist der Emissionsbereich des Alexa-Farbstoffs bei vergleichbarem Emissionsmaximum etwas schmaler, was sich günstig für die selektive Detektion bei Verwendung mehrerer Fluorophore im Transportexperiment auswirken kann.

Die spektralen Eigenschaften der beiden Cyaninfarbstoffderivate Cy3 (Abb. 41 (C)) und Cy5 (Abb. 41 (D)) sind bei pH 5,0 völlig identisch mit den Herstellerangaben im neutralen Bereich. Ihr Einsatz ist unter den experimentellen Bedingungen unbedenklich.

4.1.2.3 Einfluss der Adsorbermatrix auf die spektralen Eigenschaften

In diesem Abschnitt soll der Einfluss der Adsorbermatrix auf die spektralen Eigenschaften der Fluorophore näher untersucht werden. Ein experimenteller Ansatz, bei dem die detektierbare Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit vom Ort innerhalb des Adsorberpartikels bestimmt werden kann, ist eine Einkomponenteninkubation von markierten Proteinkonjugaten mit den verwendeten SP-Sepharose FF Partikeln ins Sättigungsgleichgewicht. Bei homogener SP-Ligandenverteilung und Porosität im Adsorberpartikel sind die gebundenen Proteine im Adsorberpartikel im Gleichgewicht auch homogen verteilt.

Abbildung 42 zeigt die Fluoreszenzintensitätsprofile von Konfokalbildern, die nach 15 – 20 h Inkubation mit verschiedenen BSA-Proteinfarbstoffkonjugaten in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 mit dem Konfokalmikroskop mit den individuellen Messeinstellungen aufgenommen wurden. Die experimentellen Bedingungen sind in allen Fällen so gewählt, das jeweils im Sättigungsbereich der Isotherme gearbeitet wurde.

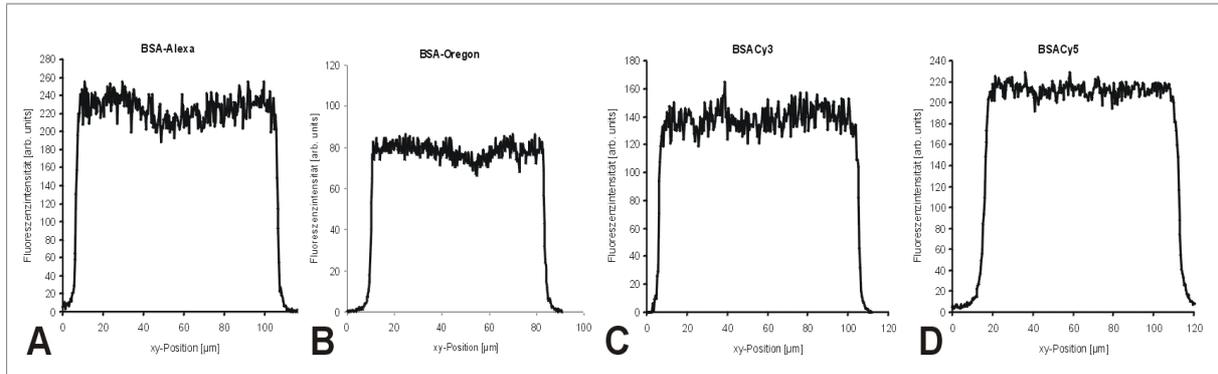


Abbildung 42: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Konfokalbildern, die 15-20h mit BSA Lösungen in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 inkubiert wurden. Als markiertes Proteinkonjugat wurde bei (A) BSA-Alexa; (B) BSA-Oregon; (C) BSA-Cy3 und (D) BSA-Cy5 verwendet

Die Ansätze unterscheiden sich lediglich im Fluoreszenzfarbstoff, bzw. im Proteinkonjugat, das als Marker in einem Konzentrationsverhältnis von 1:20 mit unmarkiertem BSA bei der Inkubation eingesetzt wurde. Nach einer Inkubationsdauer von 15 – 20 h ist bei einer Einkomponentenadsorption mit BSA in 50 mM Acetatpuffer bei pH 5,0 der SP-Sepharose FF Adsorber homogen gesättigt und es kommt zu keinen weiteren Änderungen der Protein-, bzw. Konjugatkonzentration in der Flüssig- und Festphase.

Die gemessenen Fluoreszenzintensitätsprofile in Abbildung 42 zeigen, dass mit dem Konfokalmikroskop in allen Fällen ein nahezu homogenes Fluoreszenzsignal über den Partikeldurchmesser detektiert wurde.

In den betrachteten optischen xy-Ebenen spielen regional unterschiedliche Attenuations- und Aberrationseffekte bei der Messung der Proteinverteilung in der SP-Sepharose FF Adsorbermatrix mit den verwendeten Fluorophoren nur eine untergeordnete Rolle.

4.1.2.4 Einfluss der Gegenwart anderer Fluorophore (selektive Detektion)

Eine selektive Detektion der gebundenen Proteinkonjugate im Partikel und frei in der Lösung ist eine unbedingte Voraussetzung für die parallele Quantifizierung der verwendeten Fluorophore.

Von einer mIgG-Proteinlösung in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0, die drei verschiedene Proteinkonjugate, jeweils im Konzentrationsverhältnis von 1:20 enthielt, wurden

Emissionsspektren bei mehreren Anregungswellenlängen mit dem Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Das Ergebnis ist in einer zweidimensionalen Auftragung der Anregungs- gegen die Emissionswellenlängen in Abbildung 43 gezeigt.

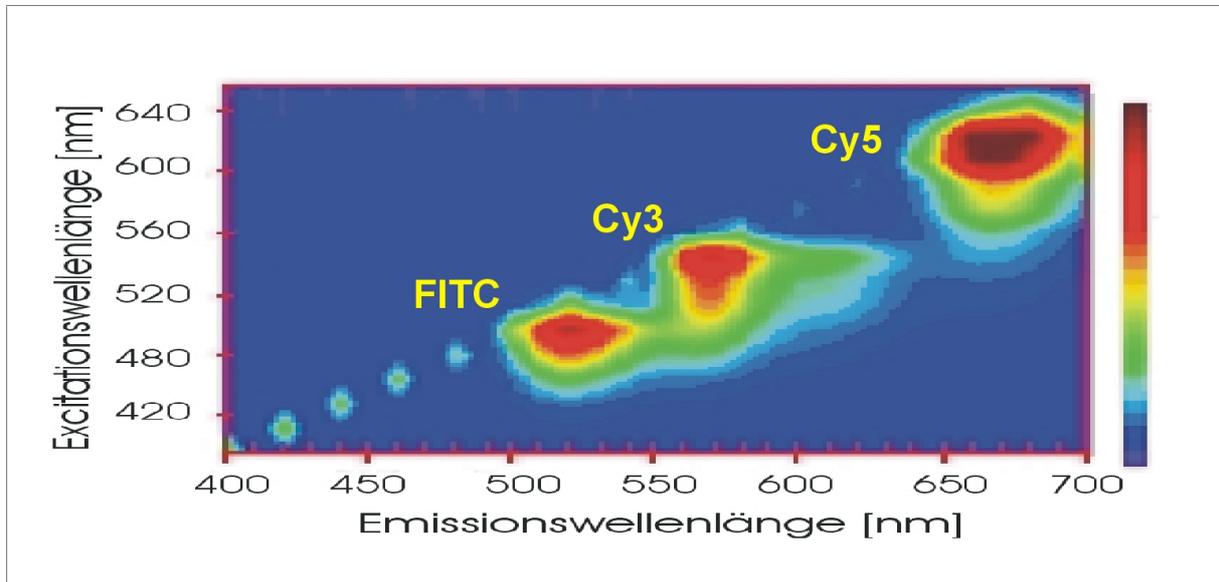


Abbildung 43: Auftragung der Anregungs- gegen die Emissionswellenlänge für eine mIgG-Proteinlösung in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0, die drei Proteinkonjugate in gleichem Konzentrationsverhältnis enthält (mIgG-Alexa; mIgG-Cy3 und mIgG-Cy5)

Die Fluoreszenzintensität in diesem „Konturplot“ ist hierbei, genau wie in den Konfokalbildern durch einen Farbcode dargestellt. Die zunehmende Fluoreszenzintensität ist dabei durch einen Farbumschlag von blau nach rot abgebildet.

Die Auftragung zeigt, dass es entlang der Diagonalen von links unten nach rechts oben für jedes Konjugat Wellenlängeneinstellungen für das Fluoreszenzspektrometer gibt, die eine nahezu unabhängige Detektion der drei Farbstoffe ermöglichen.

Beim Konfokalmikroskop ist im Vergleich dazu die Anzahl der verfügbaren Anregungswellenlängen durch die vier Laserlinien des Argon/Kryptonmischgaslasers stark limitiert und der Parameterspielraum für eine selektive Detektion zumindest in bezug auf die Anregungswellenlänge beschränkt.

Inwieweit sich der Einfluss anderer Fluorophore auf das Konfokalbild bei der Zweikomponentenadsorption auswirken könnte, wurde in einer experimentellen Serie mit vier unterschiedlichen Ansätzen durch eine Inkubation von SP-Sepharose mit den beiden Proteinen hlgG und BSA in verschiedenen Protein/Farbstoffkombinationen unter gleichen Bedingungen und Konzentrationsverhältnissen untersucht. Dazu wurden Proben beider Proteine in den unten aufgeführten Kombinationen (A-D) in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 für 20 h inkubiert und Proben der Partikel anschließend unter dem Konfokalmikroskop analysiert (s. 3.6.1.2).

- (A) hlgG markiert mit Oregon Green und BSA mit Cy5
- (B) hlgG markiert mit Cy5 und BSA mit Oregon Green
- (C) hlgG markiert mit Cy5 und BSA unmarkiert
- (D) hlgG unmarkiert und BSA markiert mit Cy5

Exemplarische Konfokalbilder und Fluoreszenzintensitätsprofile der verschiedenen Inkubationsansätze sind in Abbildung 44 A-D gegenübergestellt.

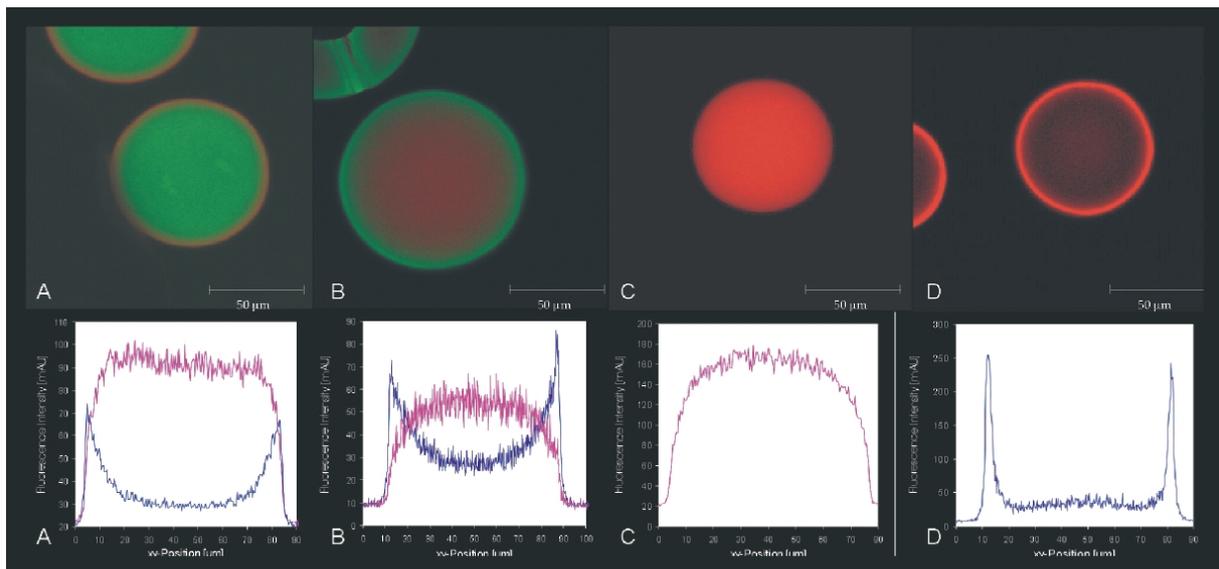


Abbildung 44: Konfokalbilder und Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln nach 20 stündiger Inkubation mit BSA und hlgG im Konzentrationsverhältnis 1:2 (w/w) in verschiedenen Protein/Farbstoffkombinationen. (A) hlgG markiert mit Oregon Green und BSA mit Cy5; (B) hlgG markiert mit Cy5 und BSA mit Oregon Green; (C) hlgG markiert mit Cy5 und BSA unmarkiert; (D) hlgG unmarkiert und BSA markiert mit Cy5

Die Bilder in Abbildung 44 ergeben sich aus der Überlagerung zweier, individuell detektierter und lokal aufgelöster, Fluoreszenzsignale, die durch einen Zweifarbencode dargestellt werden. Das Fluoreszenzsignal des Fluoreszeinderivats Oregon Green, das bei dieser Serie verwendet wurde, ist in Abbildung 44 grün dargestellt, während das Cy5-Signal durch eine

rote Farbe in den Konfokalbildern gekennzeichnet ist. Die Farben sind wie bereits erwähnt, zufällig von der Bildgebungssoftware des Konfokalmikroskopes gewählt und es besteht kein Bezug zu den tatsächlichen Emissionswellenlängen der Farbstoffe.

Zusätzlich sind unter den Konfokalbildern die Fluoreszenzintensitätsprofile gezeigt, die aus den Bildern mit der Auswertesoftware des Mikroskops generiert wurden (Abb. 44 unten). Das resultierende Profil des Immunglobulins ist hierbei magenta, und die BSA-Fluoreszenzintensitätsprofile blau eingefärbt. Alle Profile zeigen qualitativ den gleichen Effekt. BSA ist eher in den äußeren Regionen des SP-Sepharose FF gebunden, während gebundenes hlgG in der Mitte des Partikels akkumuliert. Diese Verteilung ist unerwartet und wird in späteren Versuchsreihen noch genauer untersucht und erklärt. An dieser Stelle steht jedoch als experimentelles Resultat im Vordergrund, dass die Art des Fluorophors bei den untersuchten Farbstoffkombinationen keinen signifikanten Einfluss auf die detektierte Verteilung der Proteine besitzt. Diese Behauptung wird noch gestützt durch Vergleich der beiden experimentellen Ansätze (A) und (B), bei denen beide Proteine mit fluoreszenzmarkierten Markern eingesetzt wurden, mit den Ansätzen (C) und (D) mit nur einem markierten Proteinkonjugat.

Im Falle dieser Zweikomponentenadsorption bilden die Konfokalaufnahmen die reale Verteilung von zwei verschiedenen Proteinen im porösen Netzwerk des Adsorbers ab.

Die Verwendung des dritten Fluorophores Cy3 im Rahmen der Multicoloranalysen bei den konsekutiven Inkubationen ist zunächst kritisch zu sehen, da Cy3 sein Anregungs- und Emissionsspektrum zwischen den FITC-Derivaten und Cy5 besitzt. Von den spektralen Voraussetzungen sind also Energietransferprozesse zu beiden anderen Fluorophoren denkbar, wobei es im Falle des FITC als Akzeptor- und im Falle des Cy5 als Donormolekül fungieren würde (s. 2.5.1).

Wie aber später im experimentellen Teil der Multicoloranalysen gezeigt werden wird, liefern die Konfokalbilder, auch bei Verwendung von drei verschiedenen Fluorophoren, reproduzierbare Ergebnisse, die unabhängig von der jeweiligen Farbstoffsequenz sind. Ein möglicher „Crosstalk“ zwischen den einzelnen Detektorkanälen kann mit dem verwendeten, sequentiellen Rastermodus bei einer Partikelprobe mit drei verschiedenen, gebundenen Proteinkonjugaten durch Variation der Messparameter näher untersucht werden. Durch An- und Abschaltung einzelner Laseranregungslinien bei einer Aktivierung aller Detektionskanäle sollte die angeregte Fluoreszenzemission nur in dem vorgesehenen Detektorkanal gemessen werden, wenn kein „Crosstalk“ der Kanäle vorliegt. Der beschriebene Test wurde besonders bei den Multicoloranalysen (s. 3.6.4) gesättigten Partikelproben im Vorfeld der Untersuchungen zur Validierung der sequentiellen Messprogramme durchgeführt. Dieses Ergebnis unterstreicht zusätzlich, dass auch eine unabhängige Detektion von drei

Fluorophoren im Konfokalmikroskop bei Verwendung eines sequentiellen Messprogramms möglich ist.

4.2 Intensitätsexperimente und Konzentrationsabhängigkeit

4.2.1 Problematik

Während der Adsorption von Proteinmolekülen an die Adsorbermatrix kommt es im Verlauf einer Kinetik zu einer lokalen Aufkonzentrierung von Protein im Partikel. Die Konzentration des gebundenen Proteins ist folglich im Gleichgewicht in der Festphase gegenüber der Konzentration in der Ausgangslösung erhöht. Konfokale Laser-Raster-Mikroskope können als lokal auflösende Fluoreszenzspektrometer angesehen werden und unterliegen deshalb auch etwa den gleichen Fluorophorkonzentrationslimitierungen der konventionellen Fluoreszenzspektroskopie (s. 2.5.3).

Demnach besteht eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Fluorophorkonzentration nur in einem relativ kleinen Bereich bei sehr verdünnten Fluorophorlösungen. Abbildung 45 verdeutlicht diese Problematik. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind an Proteine gebunden und durch eine Verdünnung des Proteinkonjugates mit unmarkiertem Protein kann die Fluoreszenzfarbstoffkonzentration in der Lösung, aber vor allen Dingen auch im Partikel im Vorfeld der Transportuntersuchungen reguliert werden.

In Abbildung 45 sind die Abhängigkeiten der Fluoreszenzintensitäten in der Fest- und Flüssigphase exemplarisch für ein BSA-Alexa-Konjugat gezeigt.

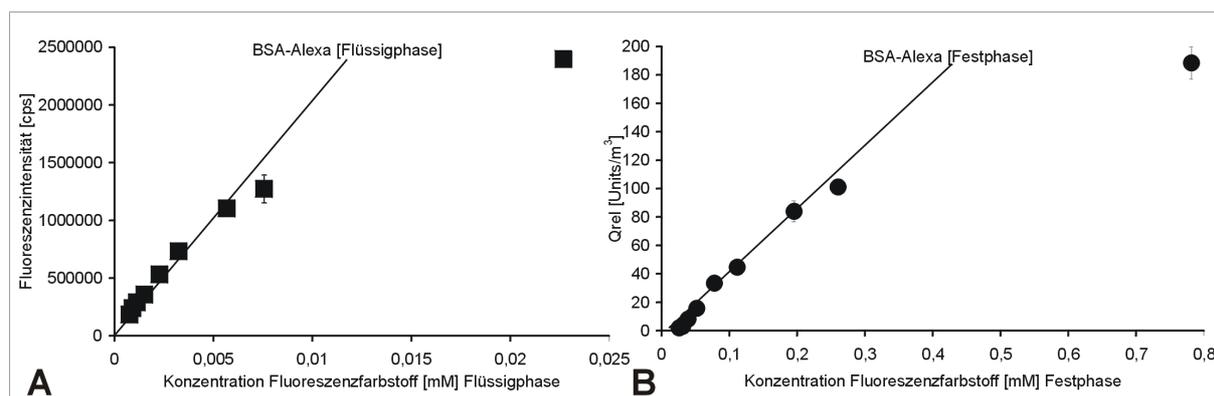


Abbildung 45: Abhängigkeit (A) der Fluoreszenzintensität eines BSA-Konjugats in der Flüssigphase und (B) der relativen Kapazität Q_{rel} (Festphase) von der Konzentration an AlexaTM488 Farbstoff

Bei dieser Messreihe wurde zunächst in verschiedenen Ansätzen eine Verdünnungsreihe des BSA-Alexa-Konjugates mit unmarkiertem BSA in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 hergestellt. Die Gesamtproteinkonzentration war in allen Ansätzen gleich (4 mg/mL). Proben dieser Ansätze wurden bei konstanten Messparametern im Fluoreszenzspektrometer vermessen.

Abbildung 45 (A) zeigt die resultierende Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs in der Lösung. Diese kann bei bekannter Proteinkonzentration einfach über den Markierungsgrad ($D/P =$ Anzahl Farbstoffmoleküle pro Proteinmolekül) berechnet werden (s. Gl. 38).

Anschließend erfolgte eine Inkubation der gleichen Ansätze mit einer definierten Menge SP-Sepharose FF für ca. 15 h. Partikelproben wurden nach der Inkubationszeit konfokalmikroskopisch bei konstanten Geräteeinstellungen analysiert. Aus den Fluoreszenzintensitätsprofilen, die mit Hilfe der Auswertesoftware des Mikroskops aus den Konfokalbildern generiert wurden, konnte schließlich mit Gleichung 40 die relative Kapazität Q_{rel} berechnet werden (s. Gl. 40).

Dieser Wert repräsentiert die gesamte Fluoreszenzintensität des Partikels bezogen auf das Partikelvolumen. Die Fluoreszenzfarbstoffkonzentration kann auch in der Festphase aus dem Markierungsgrad (D/P) berechnet werden, da die Gesamtproteinkapazität Q_{max} für BSA in den verschiedenen Ansätzen gleich ist (Gl. 37).

Abbildung 45 (B) zeigt die entsprechende Auftragung der beiden ermittelten Größen in der Festphase. Die Auftragungen (A) und (B) in Abbildung 45 zeigen qualitativ den gleichen Verlauf. Nach einer linearen Anfangssteigung erfolgt, wie theoretisch angenommen der Übergang in eine Sättigungskurve im untersuchten Konzentrationsbereich. Die lineare Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und der Fluorophorkonzentration wird zu höher konzentrierten Lösungen hin durch zwei physikalische Phänomene maßgeblich beeinträchtigt. Bei der Reabsorption kann die emittierte Fluoreszenzstrahlung geeigneter Wellenlänge erneut weitere Fluorophore der gleichen Spezies anregen, während der „inner filter“ Effekt die Intensität des zur Verfügung stehenden Anregungslichtes mit zunehmender Fluorophorkonzentration schwächt. In beiden Fällen ist die messbare Fluoreszenzintensität gegenüber der Fluorophorkonzentration bei konzentrierten Proben erniedrigt.

Ein Vergleich der Konzentrationsbereiche (x-Achsen in Abb. 45) in beiden Auftragungen zeigt deutlich den Aufkonzentrierungseffekt, der durch die Bindung der Proteine an die Liganden des Adsorbermaterials erzielt wurde. Die BSA-Proteinkapazität der SP-Sepharose FF beträgt in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 ca. 145 mg/mL (2,2 mM) und somit ist das Protein gebunden an die Festphase im Vergleich zur Flüssigphase vor der Inkubation ca. 36-fach aufkonzentriert.

Die beschriebenen Konzentrationseffekte sind deshalb wahrscheinlich bei der Fluoreszenzdetektion mit dem Konfokalmikroskop im Vergleich zur Flüssigphase noch stärker ausgeprägt.

Die relative Kapazität Q_{rel} hängt neben Geräteparametern (Laserintensität, Detektorempfindlichkeit, Breite der konfokalen Lochblende) unmittelbar von der lokal aufgelösten Fluoreszenzintensität ab. Deshalb ist bei der Durchführung kinetischer

Adsorptionsuntersuchungen mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie ein Arbeitsbereich, in dem die Fluoreszenzintensität mit der Fluorophorkonzentration linear korreliert, unbedingte Voraussetzung.

4.2.2 Abhängigkeit der relativen Kapazität Q_{rel} von der Fluorophorkonzentration im Adsorberpartikel

Die Intensitätsexperimente wurden mit BSA-Konjugaten von allen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt, um ein lineares Betriebsfenster für den Einsatz der einzelnen Fluorophore in Transportexperimenten zu finden.

Abbildung 46 zeigt die Abhängigkeit der relativen Kapazität von der Konzentration des zweiten FITC-Derivates des Oregon GreenTM 488.

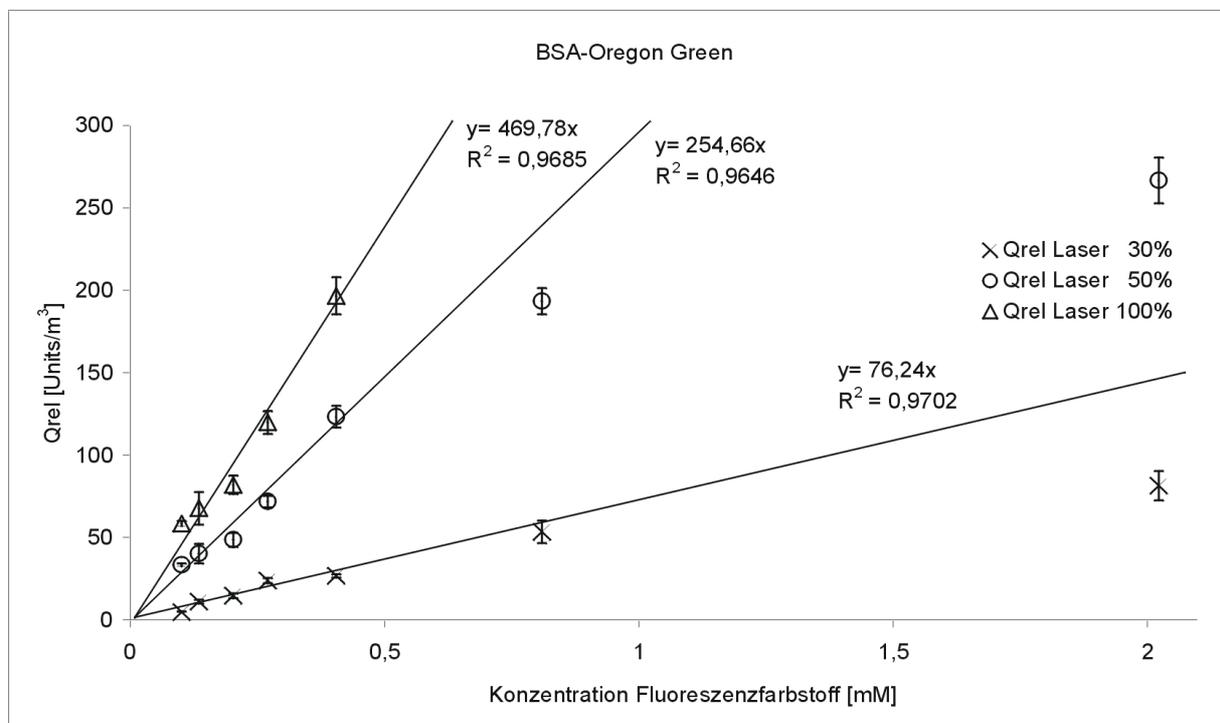


Abbildung 46: Konzentrationsabhängigkeit der relativen Kapazität Q_{rel} ermittelt mit BSA-Oregon Green bei drei verschiedenen Laserintensitäten (100%, 50%, 30%). Die Linien zeigen uneingeschränkte Linearität zwischen den beiden Größen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der bestimmten relativen Kapazitäten ($n = 3$). Zur Berechnung der Regressionsgeraden wurden nur Werte bis zu einer Farbstoffkonzentration von 0,4 mM herangezogen.

Als zusätzlicher Parameter wurde bei dieser Serie die Laserstärke der 488 nm Laserlinie des Argon/Krypton-Mischgaslasers bei der konfokalmikroskopischen Analyse von Partikelproben der verschiedenen Ansätze variiert. Die übrigen Messparameter, wie die Breite der konfokalen Lochblende und Detektorempfindlichkeit waren bei allen analysierten Proben gleich.

Bei der höchsten gewählten Anregungsintensität (100 %) konnte die relative Kapazität nur bis zu 0,4 mM bestimmt werden, da die Fluoreszenzintensitätsprofile der konzentrierteren Proben, unter den sonst konstanten Geräteparametern, übersättigt waren und deshalb zur Auswertung nicht herangezogen werden konnten. Die beiden anderen Serien zeigen qualitativ den gleichen Verlauf über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich. Nach einem linearen Bereich bis zu einer Farbstoffkonzentration von ca. 0,4 mM im Partikel kommt es bei den drei gewählten Einstellungen mit steigender Farbstoffkonzentration zu einer negativen Abweichung der bestimmten Q_{rel} -Werte.

Die Laserstärke beeinflusst hierbei nicht den qualitativen Verlauf, sondern nur der Anstieg der relativen Kapazitäten ist bei höheren Anregungsintensitäten steiler (Abb. 46). Die gezeigten Daten verdeutlichen, wie stark die berechnete relative Kapazität von BSA von konstanten Messeinstellungen und Anregungsintensitäten abhängig ist.

Im Falle des Oregon GreenTM488 Fluoreszenzfarbstoffs als fluoreszierendem Marker kann im untersuchten Messparameterbereich weitgehend unabhängig vom Markierungsgrad bis zu einer Farbstoffkonzentration von ca. 0,4 mM im Partikel gearbeitet werden.

In einer weiteren experimentellen Serie wurden zur Findung eines linearen Arbeitsbereiches für den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 vergleichbare Untersuchungen mit einer „Verdünnungsreihe“ des BSA-Cy3-Konjugates in beschriebener Weise durchgeführt. Abbildung 47 zeigt die Auftragungen der erhaltenen Ergebnisse für das BSA-Cy3-Konjugat bei drei verschiedenen Laserintensitäten der 568 nm Laserlinie des Argon/Krypton-Mischgaslasers.

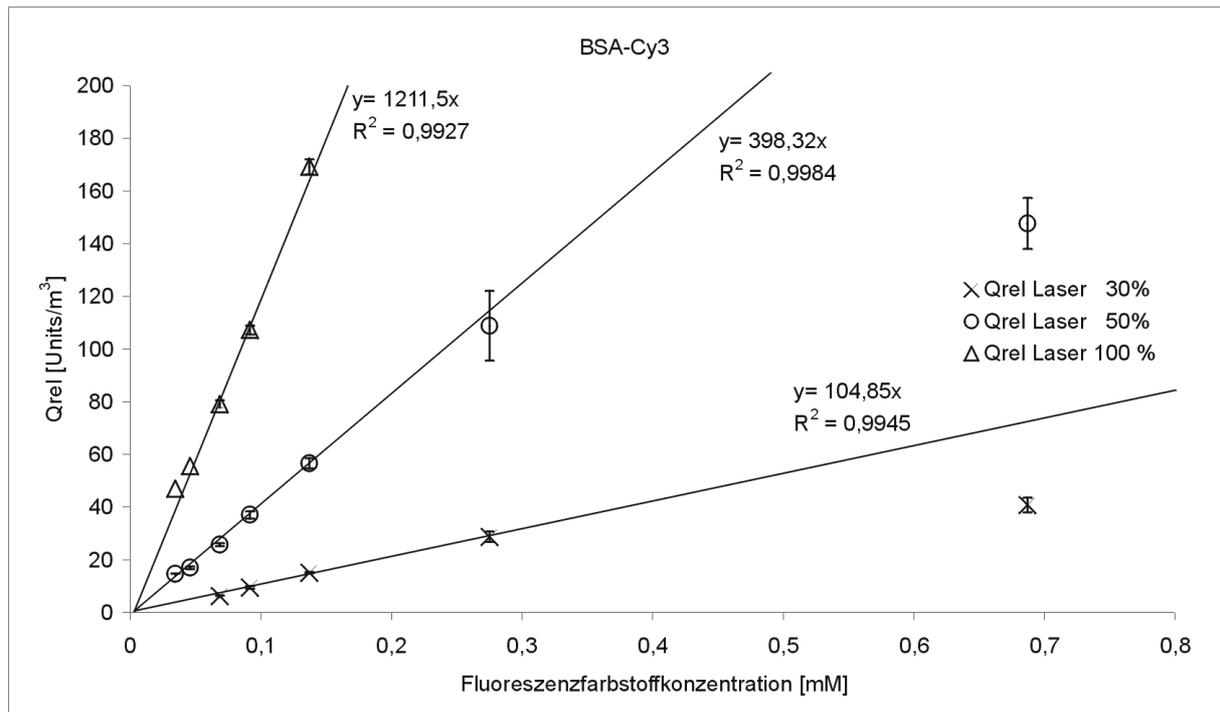


Abbildung 47: Konzentrationsabhängigkeit der relativen Kapazität Q_{rel} ermittelt mit BSA-Cy3 bei drei verschiedenen Laserintensitäten (100%, 50%, 30%). Die Linien zeigen uneingeschränkte Linearität zwischen den beiden Größen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der bestimmten relativen Kapazitäten ($n = 3$). Zur Berechnung der Regressionsgeraden wurden nur Werte bis zu einer Farbstoffkonzentration von 0,3 mM herangezogen

Auch bei Verwendung des BSA-Cy3-Konjugates im Intensitätsexperiment kommt es im untersuchten Konzentrationsbereich zu einem leichten Intensitätssättigungseffekt und der damit verbundenen Abweichung der linearen Korrelation zwischen Q_{rel} und der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration im Partikel bei konzentrierteren Proben. Wiederum konnte durch eine Variation der Laserstärke keine qualitative Veränderung der Korrelationsverläufe im untersuchten Bereich erzielt und lediglich die Steigung der Korrelationen beeinflusst werden. Für den Cy3-Farbstoff wurde anhand dieser Daten der lineare Arbeitsbereich des Fluorophores im Adsorberpartikel bis zu einer maximalen Konzentration von 0,3 mM bestimmt.

Schließlich wurden die Untersuchungen auch mit dem Cy5-Derivat von BSA bestimmt. Diesmal wurde zur selektiven Anregung der Cy5-Fluoreszenz die Intensität der 647 nm Linie des Lasers genutzt und variiert. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 48 gezeigt.

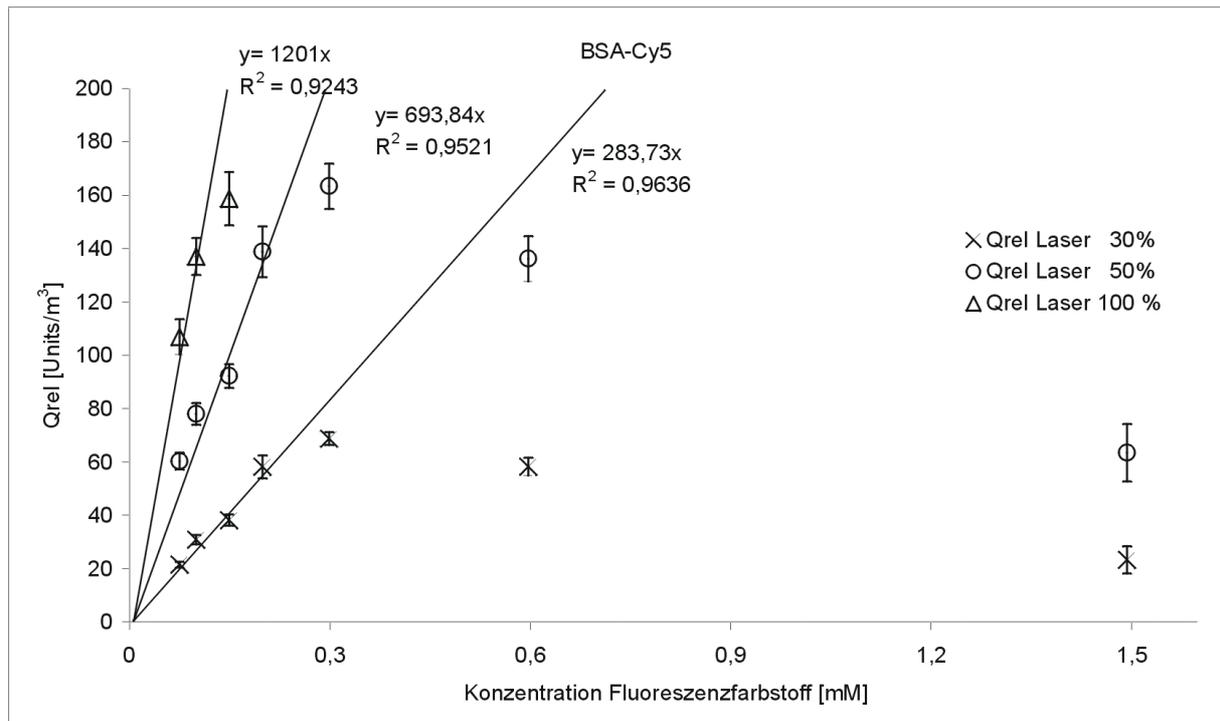


Abbildung 48: Konzentrationsabhängigkeit der relativen Kapazität Q_{rel} ermittelt mit BSA-Cy5 bei drei verschiedenen Laserintensitäten (100%, 50%, 30%). Die Linien zeigen uneingeschränkte Linearität zwischen den beiden Größen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der bestimmten relativen Kapazitäten ($n = 3$). Zur Berechnung der Regressionsgeraden wurden nur Werte bis zu einer Farbstoffkonzentration von 0,2 mM herangezogen

Ein Blick auf die Daten in Abbildung 48 verdeutlicht, dass bei Verwendung dieses Fluorophores ein gravierender Einfluss der Cy5-Konzentration im Partikel auf die berechnete relative Kapazität von BSA besteht. Bis auf die Daten bei der höchsten Laserintensität, die wiederum aufgrund einer Übersättigung der Fluoreszenzintensitätsprofile nur bis zu einer Fluorophorkonzentration von 0,2 mM Cy5 berechnet werden konnten, zeigen die beiden Kurvenverläufe nach einem relativ kurzen linearen Bereich einen Sättigungseffekt. Bei diesem Farbstoff kommt es jedoch im Vergleich zu den anderen Fluoreszenzfarbstoffen bei einer weiteren Zunahme der Cy5 Konzentration im Partikel zu einer erneuten Erniedrigung der berechnete Q_{rel} -Wert im Verhältnis zur Fluorophorkonzentration. Bei diesem Fluorophor spiegelt der Kurvenverlauf das gesamte mögliche Ausmaß eines Konzentrationseinflusses auf die messbare Fluoreszenzintensität wieder (vgl. Abb. 17).

Bei Verwendung des Cy5-Fluoreszenzfarbstoffes als selektivem Proteindetektionsmarker darf während konfokalmikroskopischer Proteintransportuntersuchungen die maximale Cy5-Konzentration in den Adsorberpartikeln nach Möglichkeit 0,2 mM nicht überschreiten, um noch in einem linearen Detektionsfenster zu arbeiten.

Die gesamte experimentelle Studie zeigt, dass bei allen untersuchten Fluorophoren, bzw. Proteinkonjugaten bei höheren Fluorophorkonzentrationen eine Abweichung von der linearen

Korrelation zwischen der relativen Kapazität Q_{rel} , berechnet aus den Fluoreszenzintensitätsprofilen der aufgenommenen Konfokalbilder, und der Fluorophorkonzentration im Adsorberpartikel zu beobachten ist.

Am deutlichsten trat dieser Konzentrationseffekt bei der Verwendung der Cy5-Fluoreszenzemission zur konfokalen Bildgebung auf (s. Abb. 48). Interessant ist, wie sich die gezeigten Abweichungen bei höheren Fluorophorkonzentrationen im Partikel auf den Verlauf des Fluoreszenzintensitätsprofils auswirken können. Um dies zu verdeutlichen, sind in Abbildung 49 exemplarische Profile aus Konfokalbildern von SP-Sepharose FF Partikeln zusammengestellt, die mit verschiedenen BSA-Cy5-Konjugatverdünnungen 15 h inkubiert wurden. Die Gesamt-BSA-Konzentration war in allen Ansätzen gleich, nur das Verhältnis zwischen markiertem – und unmarkiertem Protein variierte.

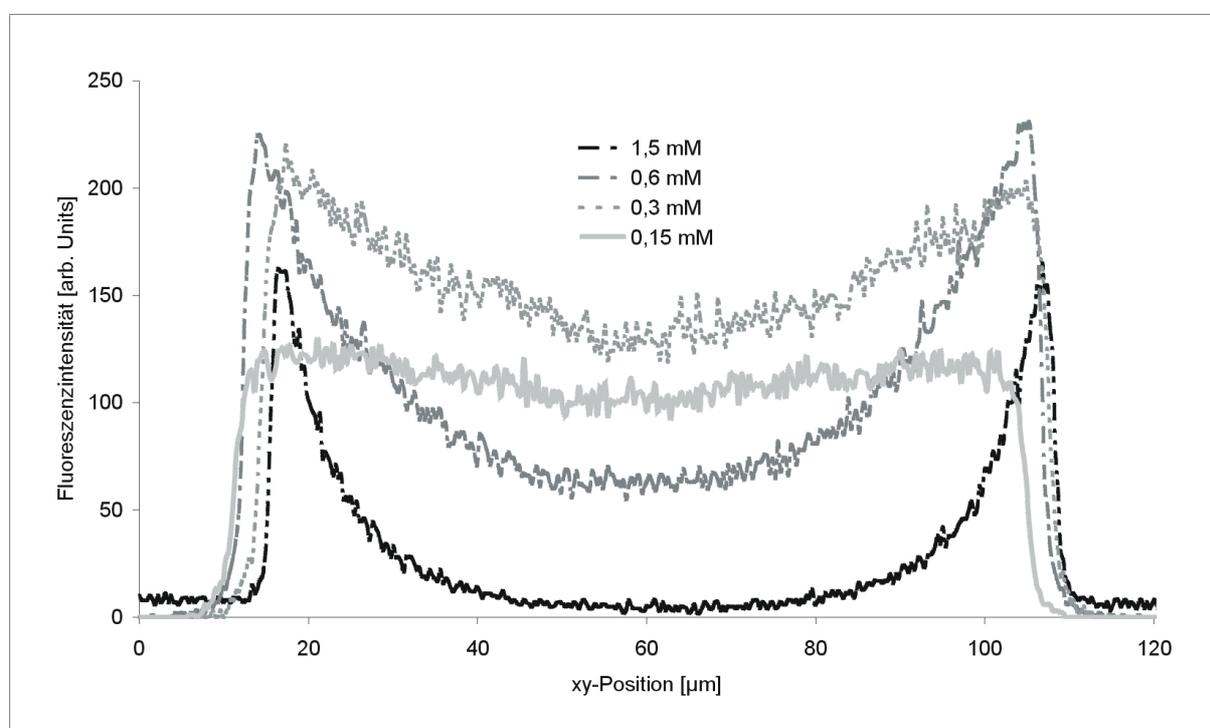


Abbildung 49: Exemplarische Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln, die mit vier verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von markiertem Protein (BSA-Cy5) und unmarkiertem Protein 15 h inkubiert wurden. Die Fluorophorkonzentrationen der Konjugatverdünnungen sind (0,15 mM hellgrau, 0,3 mM grau gestrichelt; 0,6 mM dunkelgrau gestrichelt und 1,5 mM schwarz gestrichelt)

Die korrespondierenden relativen Kapazitäten, die aus den gezeigten Profilen berechnet wurden entsprechen einigen Punkten der Serie bei einer Laserintensität von 50% in Abbildung 49. Während das Intensitätsprofil bei einer Farbstoffkonzentration von 0,15 mM (grau) noch den erwarteten Verlauf eines Sättigungsspektrums für BSA unter den experimentellen Bedingungen repräsentiert, kommt es bei einer Verwendung von höheren Farbstoffkonzentrationen zu anderen Intensitätsverläufen. Diese Profile können überhaupt

nicht mit dem erwarteten Gleichgewichtszustand der BSA-Adsorption unter den Bedingungen in Beziehung gesetzt werden.

Bei Betrachtung der übrigen Profile ist mit zunehmender Fluorophorkonzentration eine zunehmende Absenkung der gemessenen Fluoreszenzintensität, zunächst in der Partikelmitte zu verzeichnen. Bei dem Fluoreszenzintensitätsprofil der höchsten Fluorophorkonzentration (1,5 mM) im Partikel (schwarz), ist zusätzlich auch noch die Randintensität im Vergleich zu den anderen Profilen erniedrigt.

Das Ausmaß der beiden verantwortlichen Effekte Reabsorption und „inner filter“ Effekt kann möglicherweise durch eine Veränderung der Messparameter minimiert werden. Eine Erhöhung der Intensität des Anregungslichts könnte die Korrelation zwischen der Fluoreszenzemission und der Fluorophorkonzentration unter Umständen positiv beeinflussen, da ein Verlust der Anregungsenergie durch den „inner filter“ Effekt sich nicht mehr so gravierend auf die messbare Intensität auswirken würde.

Eine weitere konfokalmikroskopische Analyse von Partikelproben bei verschiedenen Laserintensitäten wurde deshalb durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der Laserintensität auf das Cy5-Fluoreszenzintensitätsprofil bei einer Farbstoffkonzentration von 1,5 mM noch genauer zu untersuchen. Bei dieser Serie wurden die Detektoreinstellungen in der Art verändert, dass bei allen Anregungsintensitäten eine nahezu gleiche Signalstärke detektiert werden konnte. Die Fluoreszenzintensitätsprofile sind dadurch besser vergleichbar, da sie sich im selben Intensitätsbereich befinden. Die Ergebnisse dieser Serie sind in Abbildung 50 (A) dargestellt.

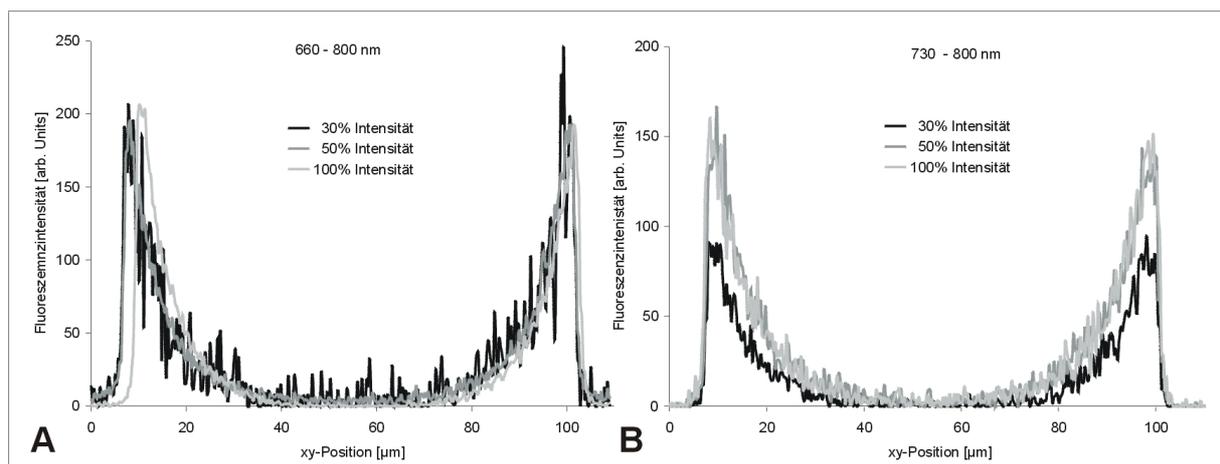


Abbildung 50: Exemplarische Fluoreszenzintensitätsprofile bei drei verschiedenen Laserintensitäten. 30 % (schwarz); 50 % (grau); 100 % (hellgrau). Detektionsbereich bei (A) 660 – 800 nm; (B) 730 – 800 nm

Ein Vergleich der Fluoreszenzintensitätsprofile in Abb. 50 (A) bestätigt, dass eine Erhöhung der Laserintensität, wie bereits anhand der Kurvenverläufe in Abb. 46; 47 und 48 angenommen, im untersuchten Bereich zu keiner qualitativen Veränderung der

Intensitätsprofile führt. Eine Variation der Laserintensität kann folglich bei zu hoher Farbstoffkonzentration im Partikel nicht zu einer Ausweitung des linearen Arbeitsbereiches beitragen.

Bei vorliegender Reabsorption kann das Intensitätsprofil unter Umständen durch veränderte Messeinstellungen korrigiert werden. Theoretisch kann nur die Fluoreszenzemission von benachbarten Fluorophoren der gleichen Spezies reabsorbiert werden, die eine Energie, bzw. Wellenlänge aus dem Überlappungsbereich von Anregungs- und Emissionsspektrum besitzt (s. Abb. 41 (A-D)). Längerwellige Emissionen besitzen nicht genug Energie, um Elektronen anderer Fluorophore anzuregen und die Emission wird folglich von diesem Phänomen nicht beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurde in einer zweiten Messreihe neben der Laserintensität auch das Detektionsfenster auf einen Wellenlängenbereich (730 nm – 800 nm) eingengt, der nicht mehr mit dem Anregungsspektrum des Farbstoffs überlappt (s. Abb. 50 (B)). Der Profilverlauf zeigt sich im Vergleich zu der experimentellen Serie in Abbildung 50 (A) weiterhin unverändert. Folglich konnte auch diese Veränderung nicht zu einer „Verbesserung“ des Profils beitragen, da weder eine zunehmende Laserintensität, noch die Verschiebung des Detektionsfensters den Arbeitsbereich erweitert. Da beide geänderten Parameter keine Veränderung des Intensitätsprofils hervorrufen, kann anhand der gezeigten Experimente auch nicht eindeutig identifiziert werden, welcher der beiden physikalischen Effekte hauptsächlich für die gemessenen Abweichungen von der linearen Korrelation der beiden Parameter verantwortlich ist. Die Profile der zweiten Serie in Abbildung 50 (B) weisen jedoch daraufhin, dass die Reabsorption im untersuchten Konzentrationsbereich wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle spielt.

4.3 Adsorption von Rinderserumalbumin an SP-Sepharose FF

4.3.1 Problematik

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchungen der Einkomponentenadsorptionskinetik von Rinderserumalbumin BSA an SP-Sepharose FF unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gegenübergestellt. Insbesondere der Einfluss des pH-Wertes und der Pufferkonzentration, bzw. Ionenstärke auf die Adsorptionskinetik (4.3.2) und die Adsorptionsgleichgewichte (4.3.3) wird in verschiedenen experimentellen Ansätzen untersucht.

Dabei wurden als Parameter der pH-Wert im Bereich von 4,5 bis 5,5 und die Pufferkonzentration von 10 mM bis 150 mM Acetatpuffer bei einem konstanten pH-Wert von 5,0 variiert.

Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen erfolgte die Durchführung der Versuche in einem thermostatisierten Glasreaktor mit hängendem Rührer.

Neben der Ermittlung von kinetischen Parametern ist auch eine thermodynamische Beschreibung der Adsorptionsgleichgewichte sinnvoll, um quantitative Aussagen über die Affinität und die Gesamtkapazität des Adsorbentmaterials für die beiden Proteine bei verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken treffen zu können.

Die Generierung experimenteller Daten zur Charakterisierung der Ein- und Zweikomponentengleichgewichte von BSA und mIgG erfolgte wie unter 3.7 beschrieben für drei pH-Werte 4,5; 5,0 und 5,5 bei unterschiedlichen Acetatpufferkonzentrationen. Aus den experimentellen Daten wurden die Gleichgewichtskapazitäten Q_{eq} in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration in der Flüssigphase c_{eq} nach Gleichung 42 ermittelt. Die Inkubationszeiten bis zur Gleichgewichtseinstellung richteten sich nach den experimentellen Bedingungen und wurden individuell anhand der Kinetiken ausgewählt.

Unter 4.3.3 werden nur die Isothermen zu den experimentellen Bedingungen diskutiert, bei denen auch kinetische Untersuchungen durchgeführt wurden. Im Anhang sind alle experimentellen Daten der Ein- und Zweikomponentenadsorptionen aufgeführt, die zur Bestimmung der SMA-Parameter K_i , ρ_i , und z_i bei den einzelnen pH-Werten dienen (s. Anhang D und Anhang F).

4.3.2 Adsorptionskinetik von Rinderserumalbumin (BSA) im Rührreaktor

4.3.2.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik von BSA

Das prinzipielle Vorgehen bei der Analyse konfokaler Daten wird im Folgenden am Beispiel einer Adsorptionskinetik von BSA in 50 mM Acetatpuffer bei pH 4,5 exemplarisch erläutert. Im Verlauf einer Batchadsorptionskinetik erfolgt zu definierten Zeiten eine parallele Untersuchung der Festphase über die Erzeugung von Konfokalbildern von Partikelproben und der Flüssigphase durch Fluoreszenzspektroskopie.

Von Partikelproben des SP-Sepharose FF, die zu verschiedenen Zeiten genommen wurden, erhält man durch konfokale Abrasterung der fokussierten, mittleren Sektion der Adsorbentpartikel Bilder, die den aktuellen Status der Proteinpenetration repräsentieren (s. 2.5.5). In Abbildung 51 ist exemplarisch eine Serie von Konfokalbildern gezeigt, die zu verschiedenen Zeiten von SP-Sepharose FF Partikelproben im Verlauf einer Adsorption von BSA an den porösen Träger erzeugt wurden.

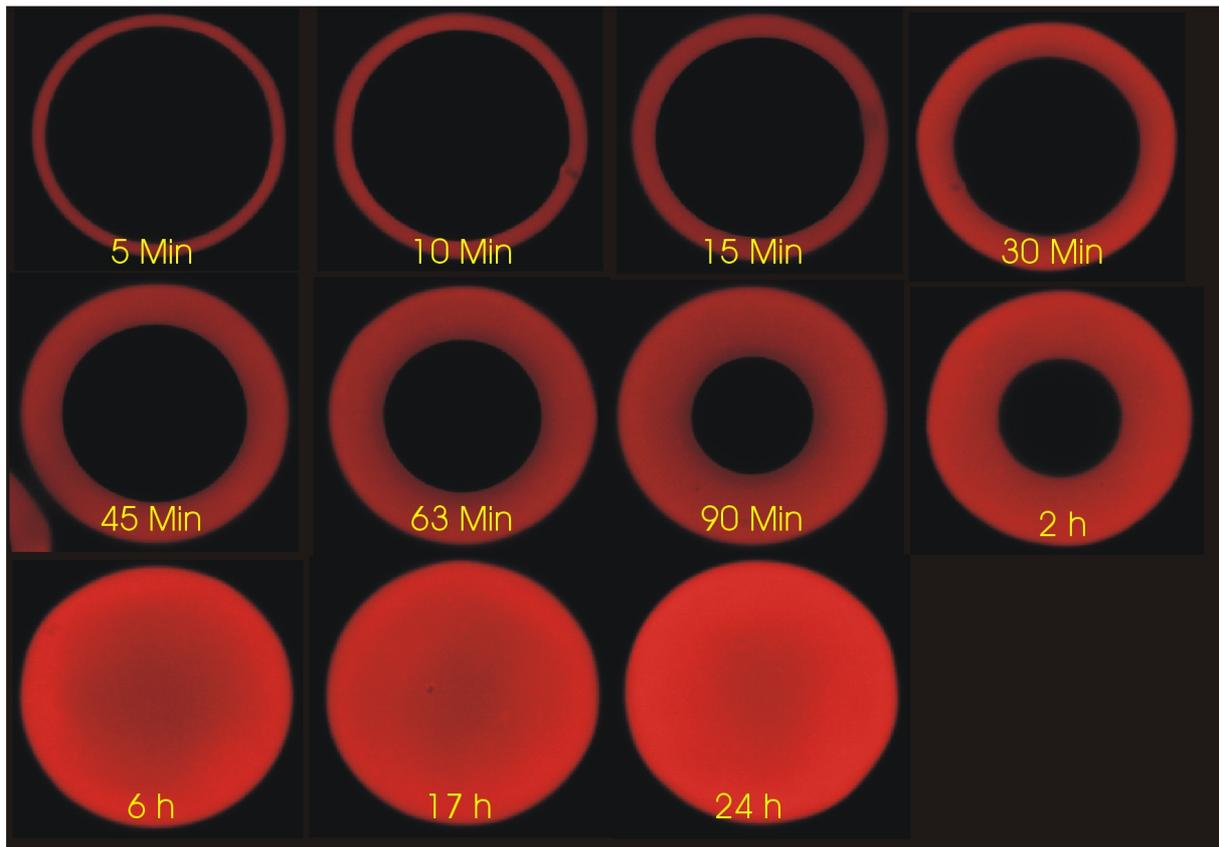


Abbildung 51: Konfokalbilder von SP-Sepharose FF-Partikeln im zeitlichen Verlauf einer Inkubation mit BSA (BSA-Cy5 als Proteinkonjugat) in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5

Als markiertes Proteinkonjugat kam bei diesem Experiment, wie auch in allen in der Folge gezeigten BSA-Adsorptionskinetiken, BSA-Cy5 zum Einsatz, das jeweils in einer Verdünnung im Verhältnis von 1:20 mit unmarkiertem Protein der Ausgangslösung zugesetzt wurde. In den Konfokalbildern ist das Fluoreszenzsignal des Cy5-Farbstoffes, bzw. des Proteinkonjugates durch einen roten Farbcode dargestellt.

Die Konfokalbilder zeigen, wie das poröse Adsorbermaterial sich von außen zu den inneren Regionen hin mit Protein füllt, bis nach ca. 6 Stunden die Partikel auch in der Mitte mit Protein beladen sind und die Konfokalbilder sich in der Folge qualitativ nicht mehr verändern. Der Adsorberpartikel selbst ist mit dem Konfokalmikroskop nicht beobachtbar und wird nur durch das Fluoreszenzsignal des gebundenen Proteins in Form und Größe definiert.

In der Literatur ist ein sehr einfaches Adsorptionsmodell beschrieben, das mit seinen Annahmen den hier gezeigten Verlauf der Adsorptionskinetik sehr gut beschreiben kann. Im sogenannten „Shrinking Core“ Modell penetriert das Adsorptiv, in diesem Fall das Protein, den kugelförmigen Adsorberpartikel von der Außenseite her als steile Adsorptionsfront bis die zwei Adsorptionsfronten unmittelbar vor dem Gleichgewichtszustand der Reaktion in der Mitte des Partikels aufeinander treffen (Yagi und Kunii 1955; Ruthven 1984). In den gezeigten Konfokalbildern ist auch bei frühen Zeitwerten der Kinetik eine Zone im Partikel, in

der noch kein Protein gebunden hat, bzw. ein dunkler Kern im Zentrum der Partikel zu sehen, der mit der Zeit kleiner wird, bzw. schrumpft („to shrink = schrumpfen; core = Kern).

In Abbildung 52 (A) sind exemplarisch die Fluoreszenzintensitätsprofile der Konfokalbilder von SP-Sepharose FF Partikeln aus Abbildung 51 für eine Adsorption von BSA in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 gezeigt.

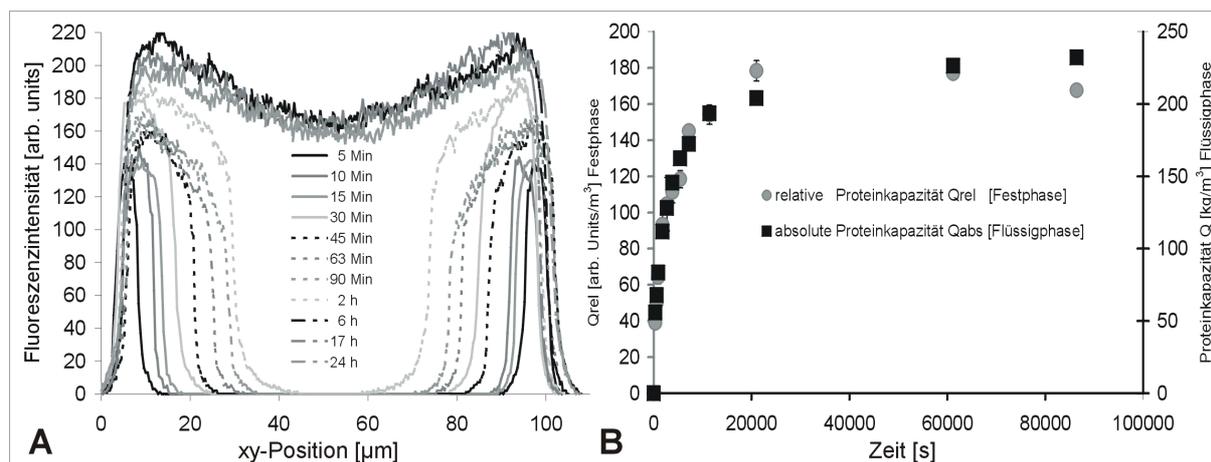


Abbildung 52: Fluoreszenzintensitätsprofile der Konfokalbilder von SP-Sepharose FF Partikeln, die mit BSA-Cy5 in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 inkubiert wurden und resultierende Auftragung der bestimmten relativen und absoluten Kapazitäten Q_{rel} (hellgraue Punkte) und Q_{abs} (schwarze Kreuze) gegen die Zeit

Der Fluoreszenzfarbstoff ist nahezu stöchiometrisch an das BSA gebunden. Es besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen dieser Fluoreszenzintensitätsverteilung und der aktuellen Konzentration von BSA über dem Partikeldurchmesser. Das Profil repräsentiert demnach die aktuelle Konzentrationsverteilung des Proteins im Partikel zu einer bestimmten Zeit. (Abb. 52 (A)). Nach Gleichung 39 und 40 kann zur weiteren Quantifizierung aus den Fluoreszenzintensitätsprofilen die relative Kapazität Q_{rel} des Proteins am Adsorbentmaterial berechnet werden. Eine Auftragung der relativen Kapazitätswerte Q_{rel} gegen die Zeit ergibt eine für die experimentellen Bedingungen charakteristische Sättigungskurve.

Die Form der Kurve wird dabei nur von den experimentellen Bedingungen bestimmt, während die Absolutwerte der relativen Kapazität mehr von den gewählten Messparametern abhängen (s. 4.2).

Die absolute Menge an Gesamtprotein, die zu jedem Zeitpunkt im Verlauf der Adsorptionskinetik an die Adsorbentmatrix gebunden hat, genauer die absolute Kapazität $Q_{\text{abs}}(t)$ wird über die Konzentrationsbilanz in der Flüssigphase aus den parallel genommenen Proben berechnet.

Der zeitliche Verlauf der beiden bestimmten Kapazitätsgrößen ist in Abbildung 52 (B) aufgetragen. Die Werte der relativen- und absoluten Kapazität unterscheiden sich, aber der

qualitative Verlauf der beiden Adsorptionssättigungskurven, der nur von den experimentellen Bedingungen abhängt, ist vergleichbar. Offensichtlich besteht eine weitgehend lineare Korrelation zwischen der relativen Kapazität Q_{rel} , die aus der Festphase berechnet wurde und der tatsächlichen, lokalen Proteinkonzentration im Adsorberpartikel. Eine Quantifizierung eines Adsorptionsprozesses über die Festphase nach dieser Methode ist folglich gerechtfertigt.

Eine Erhöhung des pH-Wertes verändert den aktuellen Ladungszustand eines Proteins. Die positiven Ladungen auf der Proteinoberfläche fungieren als potentielle Bindungspunkte an den Sulfopropylgruppen des Kationenaustauschers. Die Affinität des Proteins zum Liganden wird mit zunehmendem pH-Wert erniedrigt. Inwieweit sich eine Erhöhung des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik von BSA auswirkt, soll anhand der folgenden Experimente beschrieben werden. In Abbildung 53 sind die Verläufe von BSA-Adsorptionen an SP-Sepharose FF bei drei verschiedenen pH-Werten (pH 4,5; 5,0 und 5,5) anhand der Fluoreszenzintensitätsprofile, die aus Konfokalbildern von SP-Sepharose FF Partikelproben zu verschiedenen Zeiten im Verlauf der Adsorptionskinetik aufgenommen wurden, gezeigt.

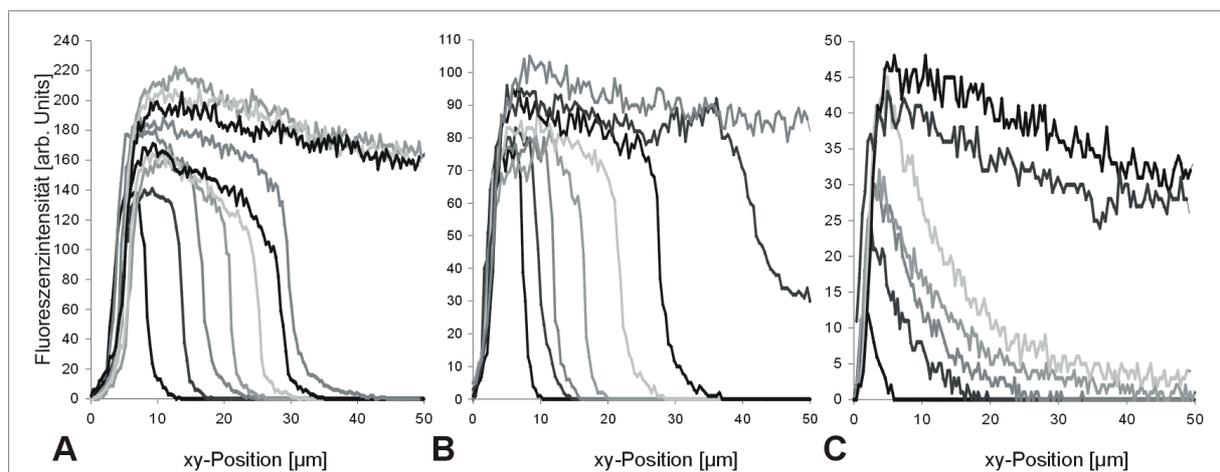


Abbildung 53: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln, die zu verschiedenen Zeiten aus den Konfokalbildern im Verlauf von BSA-Adsorptionskinetiken bei unterschiedlichen pH-Werten in 50 mM Acetatpuffer generiert wurden. (A) pH 4,5 [Zeiten: 5 Min, 15 Min, 30 Min, 45 Min, 63 Min, 90 Min, 2 h, 6 h, 17 h, 24 h]; (B) pH 5,0 [Zeiten: 5 Min, 10 Min, 16 Min, 33 Min, 60 Min, 93 Min, 3 h, 10 h]; (C) pH 5,5 [Zeiten: 5 Min, 32 Min, 66 Min, 2 h, 3 h, 39 h, 59 h]

Die Fluoreszenzintensitätsprofile sind in Abbildung 53 nur über den halben Partikeldurchmesser aufgetragen, um die Serien bei den unterschiedlichen, experimentellen Bedingungen untereinander besser vergleichen zu können. Die korrespondierenden Zeiten zu den Fluoreszenzintensitätsprofilen spielen für die weitere Erläuterung der intrapartikulären Adsorptionsverläufe zunächst keine Rolle, da der Transport im Folgenden qualitativ betrachtet wird.

Ein Vergleich der drei Serien von Fluoreszenzintensitätsprofilen bei unterschiedlichen pH-Werten in der Lösung zeigt, dass eine Erhöhung des pH-Werts von 4,5 auf 5,0 keine qualitative Veränderung der Form der Fluoreszenzintensitätsprofile im Verlauf der Adsorptionskinetiken hervorruft (Abb. 53 (A) und (B)). In beiden Fällen penetriert BSA die poröse Adsorbermatrix als steile Adsorptionsfront, wie es im „Shrinking Core“ Modell angenommen wird.

Eine weitere Zunahme des pH-Wertes auf 5,5 führt hingegen zu einer gravierenden Veränderung der Profile. Die Adsorptionsfront, die sich im Verlauf der Adsorption ausbildet, ist bei diesem pH-Wert im Vergleich zu den niedrigeren pH-Werten stark abgeflacht (Abb. 53 (C)). In diesem Fall trifft die Annahme des Modells, die eine steile Adsorptionsfront voraussetzt, nur noch bedingt zu. Anhand der Fluoreszenzintensitätsprofile konnte bereits qualitativ ein Unterschied im Adsorptionsverhalten des Proteins in Abhängigkeit vom pH-Wert beobachtet werden. Um die Kinetiken unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen besser vergleichen zu können, wurde als charakteristische Größe der effektive Porendiffusionskoeffizient $D_P(\text{eff})$ durch mathematische Anpassung der experimentellen Daten an das „Shrinking Core“ Adsorptionsmodell wie folgt bestimmt. Durch Division der berechneten relativen Kapazitäten Q_{rel} mit dem zugehörigen Kapazitätswert der Adsorptionskinetik im Adsorptionsgleichgewicht Q_{rel}^∞ werden alle Q_{rel} -Werte zunächst zur besseren Vergleichbarkeit normiert („Fractional Approach to Equilibrium“ s. Abb. 54 (A)) und anschließend unter den in Abbildung 54 angegebenen Parametern mit Hilfe der Solver Routine des Microsoft Excel Programms an das „Shrinking Core“ Modell angepasst. Aufgrund der relativ geringen Datendichte, die zur Anpassung mit dem „Shrinking Core“ Modell verwendet wurde, können die angepassten Diffusionskoeffizienten bei allen Untersuchungen nur als Richtwerte zur Diskussion von gravierenden Unterschieden im Transportverhalten der Proteine herangezogen werden.

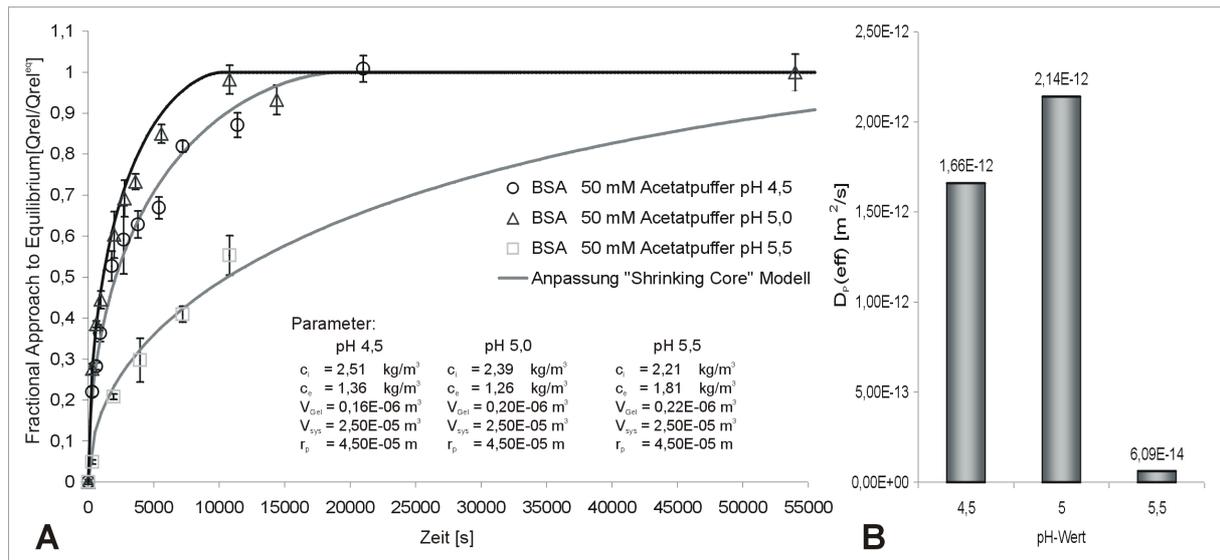


Abbildung 54: Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik von BSA in 50 mM Acetatpuffer in Abhängigkeit vom pH-Wert (4,5 – 5,5). (A) „Fractional Approach to Equilibrium“ (Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}) und die Parameter, die zur Anpassung der Daten mit dem „Shrinking Core“ Modell verwendet wurden. (B) Aus A ermittelte effektive Diffusionskoeffizienten $D_p(\text{eff})$

Abbildung 54 (A) zeigt, dass in allen Fällen durch Anpassung der experimentellen Daten (Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}) mit dem „Shrinking Core“ Modell die Verläufe der Adsorptionskinetiken bei verschiedenen pH-Werten relativ gut wiedergegeben sind.

Die aus der Anpassung ermittelten, effektiven Diffusionskoeffizienten $D_p(\text{eff})$ sind in Abbildung 54 (B) graphisch aufgetragen. Anhand der Daten führt die Erhöhung des pH-Wertes auf 5,0 zunächst zu einer leichten Erhöhung der effektiven Diffusivität des Proteinmoleküls innerhalb der Adsorbermatrix, bevor diese bei einem pH-Wert von pH 5,5 um das ca. 35-fache abfällt. In den normierten Adsorptionssättigungskurven der verschiedenen pH-Werte äußert sich diese geringere Mobilität des Proteinmoleküls in der Adsorbermatrix durch ein starkes Abflachen der gesamten Sättigungskurve im Vergleich zu den beiden anderen Kinetiken (s. Abb. 54 (A)). Auf den Anstieg der Mobilität des Proteins von pH 4,5 zu pH 5,0 wird in der Diskussion im Zusammenhang mit den Isothermen noch einmal ausführlich eingegangen (s. 5.3).

Zwischen pH 5,0 und 5,5 scheint ein Schwellenwert überwunden zu werden, ab dem die Adsorption von BSA stark verlangsamt ist. Der isoelektrische Punkt pI von BSA wurde im Rahmen früherer Untersuchungen zu ca. 4,8 bestimmt. Die Nettoladung des Proteins ändert folglich bereits durch eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5,0 das Vorzeichen von positiv zu negativ. Der pI -Wert ergibt sich aber nur aus der Nettoladung des Proteins, die sich bei diesem pH-Wert gegeneinander aufheben, und bedeutet keinesfalls, dass das Protein bei diesem pH-Wert ungeladen ist. Folglich existiert wahrscheinlich auch noch bei einem pH-Wert von 5,0 eine ausreichende Anzahl positiver Ladungen, die die Adsorption unter diesen

Bedingungen gegenüber der eigentlich, negativen Nettoladung von BSA begünstigt. Bei einer weiteren Zunahme des pH-Wertes auf pH 5,5 sind durch weitere Deprotonierung von Carboxylgruppen neue negative Ladungen an sterisch ungünstigen Stellen auf der Moleküloberfläche von BSA entstanden sein. Diese neue, ungünstige Ladungsverteilung wirkt sich negativ auf die Adsorption und den Transport des Proteins in dem porösen Netzwerk des Adsorberpartikel aus. Daraus resultiert wahrscheinlich die sehr geringe effektive Diffusivität $D_p(\text{eff})$ unter diesen Bedingungen (s. Abb. 54).

4.3.2.2 Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorptionskinetik von BSA

Eine Erhöhung der Pufferkapazität führt über eine Erhöhung der Ionenstärke in der Adsorptivlösung zu einer verstärkten Abschirmung von Ladungen auf der Oberfläche des Proteins. Elektrostatische Wechselwirkungen mit den Sulfopropylgruppen werden durch erhöhte Ionenkonzentration geschwächt.

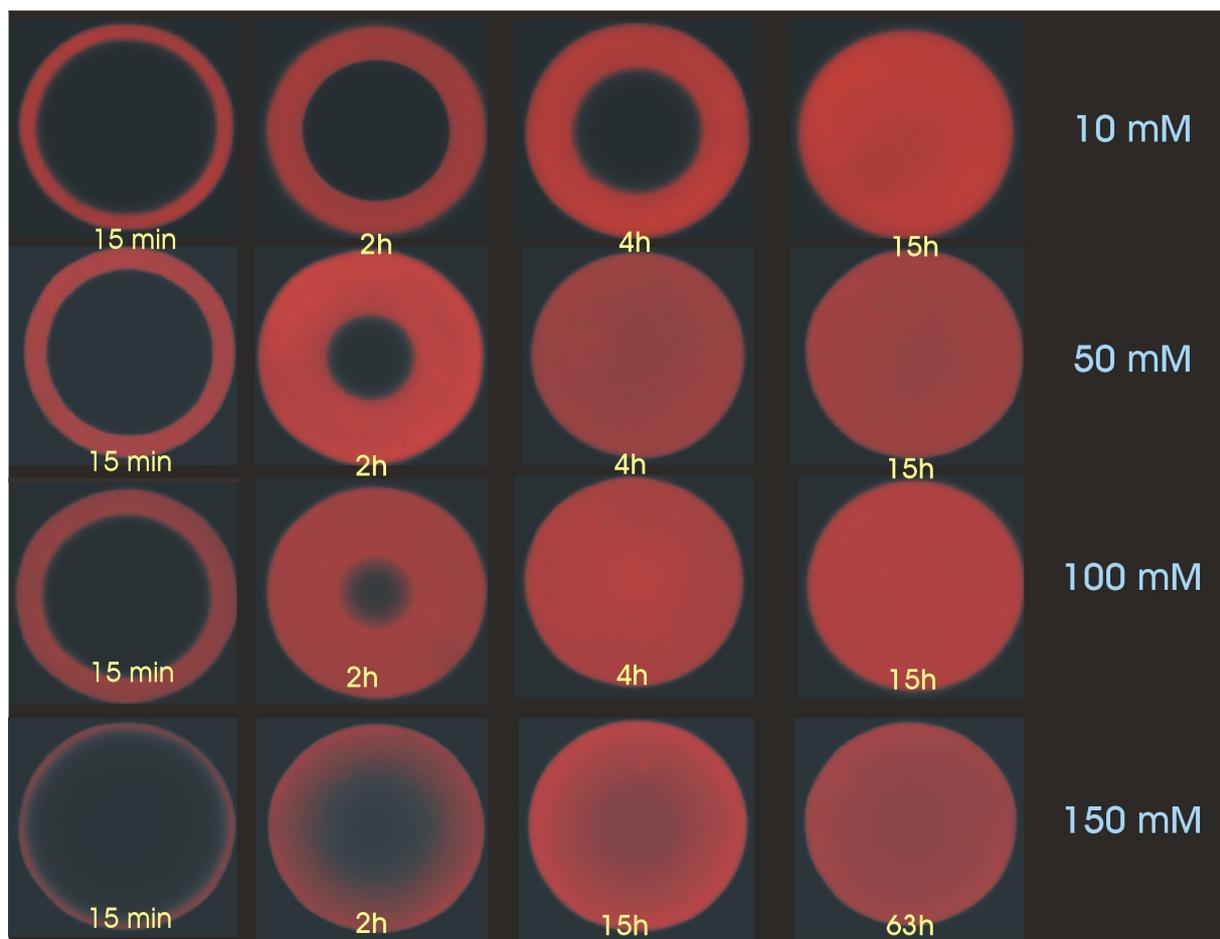


Abbildung 55: Konfokalbilder von SP-Sepharose FF Partikeln, die im Verlauf von Inkubationen mit BSA-Cy5 bei einem pH-Wert von 5,0 mit verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen aufgenommen wurden

Zusätzlich ändert sich bei der betrachteten Kationenaustauschchromatographie durch die steigende Anzahl an Natriumionen Na^+ in der Lösung das Verhältnis der ionischen Spezies, die um die Liganden der SP-Sepharose FF im Partikel konkurrieren. Der Einfluss der Ionenstärke auf die Kinetik der Adsorption von BSA wird anhand von Batchadsorptionskinetiken bei vier verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen im Folgenden beschrieben. In Abbildung 55 sind exemplarisch Konfokalbilder dargestellt, die zu verschiedenen Zeiten bei den unterschiedlichen Acetatpufferkonzentrationen mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie aufgenommen wurden. Der pH-Wert war bei allen Kinetiken dieser Studie gleich (pH 5,0). Ein Vergleich der Konfokalbilder in Abbildung 55 zeigt qualitativ, dass die Adsorptionskinetik von BSA durch die Ionenstärke, teilweise erheblich beeinflusst wird. Während in den Aufnahmen der Serien bei 10 – 100 mM Acetatpuffer noch ein schrumpfender Kern in der Partikelmitte zu sehen ist, der mit der Zeit kleiner wird, ist der farbliche Übergang zwischen gebundenem und nicht gebundenem Protein bei der Serie bei einer Konzentration von 150 mM nicht mehr so klar auszumachen.

In Abbildung 56 (A–D) sind zur näheren Untersuchung, analog der Darstellung bei unterschiedlichen pH-Werten, die Fluoreszenzintensitätsprofile über dem Partikelradius r_p von Konfokalbildern gezeigt, die wiederum zu verschiedenen Zeiten im Verlauf der Adsorptionskinetiken von BSA bei pH 5,0 in 10 mM, 50 mM, 100 mM und 150 mM Acetatpuffer erzeugt wurden (Abb. 56 A - D).

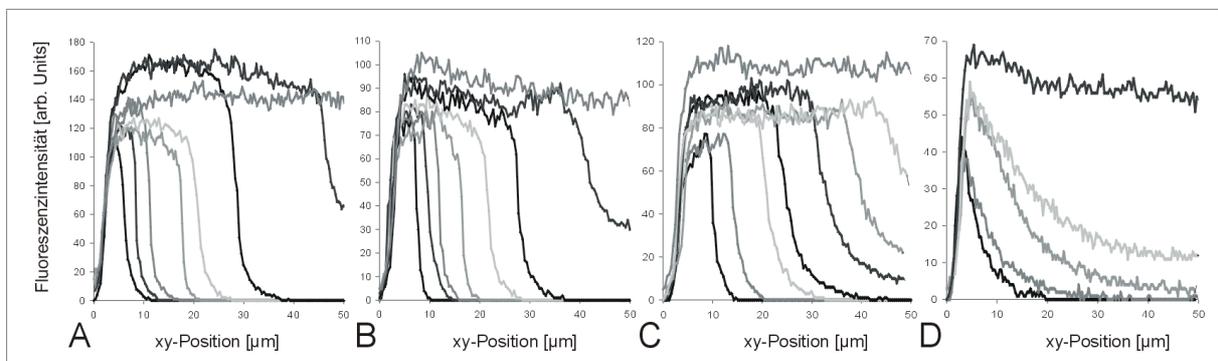


Abbildung 56: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln, die zu verschiedenen Zeiten aus den Konfokalbildern im Verlauf von BSA-Adsorptionskinetiken bei pH 5,0 mit unterschiedlichen Pufferkonzentrationen generiert wurden. (A) 10 mM [Zeiten: 5 Min, 30 Min, 90 Min, 2 h, 4 h, 6 h, 15 h, 22 h]; (B) 50 mM [Zeiten: 5 Min, 10 Min, 16 Min, 33 Min, 60 Min, 93 Min, 3 h, 10 h]; (C) 100 mM [Zeiten: 5 Min, 15 Min, 45 Min, 60 Min, 90 Min, 2 h, 3 h, 15 h]; (D) 150 mM [Zeiten: 5 Min, 15 Min, 75 Min, 2 h, 63 h]

Bei 10 mM Acetatpuffer, der geringsten Pufferkonzentration im untersuchten Bereich penetriert BSA wiederum als steile Adsorptionsfront den porösen Adsorber bis hin zum Sättigungs-, bzw. Gleichgewichtszustand (Abb. 56 (A)). Eine Erhöhung der Pufferkonzentration auf 50 mM führt nicht zu einer signifikanten Änderung des

Adsorptionsmusters in den Fluoreszenzintensitätsprofilen (Abb. 56 (B)). Analog der Erhöhung des pH-Wertes flacht die Adsorptionsfront aber in der Folge bei einer weiteren Zunahme der Ionenstärke im Adsorptionsmilieu immer weiter ab. Bei 150 mM liegt im Partikel eher ein Adsorptionsgradient als eine steile Adsorptionsfront vor. Hier sind die Modellvorstellungen des „Shrinking Core“ Modells genau wie bei einem pH-Wert von 5,5 im Grunde genommen nicht mehr erfüllt. Dennoch wurde auch unter diesen experimentellen Bedingungen zum Vergleich der Kinetiken bei verschiedenen Pufferkonzentrationen, bzw. Ionenstärken ein $D_P(\text{eff})$ durch eine „Shrinking Core“ Modellanpassung bestimmt.

Die korrespondierenden, normierten Adsorptionssättigungskurven mit den zugehörigen „Shrinking Core“ Modellanpassungen sind in Abbildung 57 (A) aufgetragen.

In Abbildung 57 (B) sind die ermittelten effektiven Diffusionskoeffizienten $D_P(\text{eff})$ für die BSA-Adsorption bei den verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen gegenübergestellt. Analog zum pH-Wert führt auch eine Erhöhung der Ionenstärke im untersuchten Bereich zunächst zu einer gesteigerten Diffusivität von BSA. Offensichtlich scheint eine Erhöhung der Ionenstärke die Adsorptionskinetik des BSA nur in einem gewissen Bereich negativ zu beeinflussen, bzw. eine gewisse Ionenstärke für eine optimale Adsorptionsgeschwindigkeit nötig zu sein.

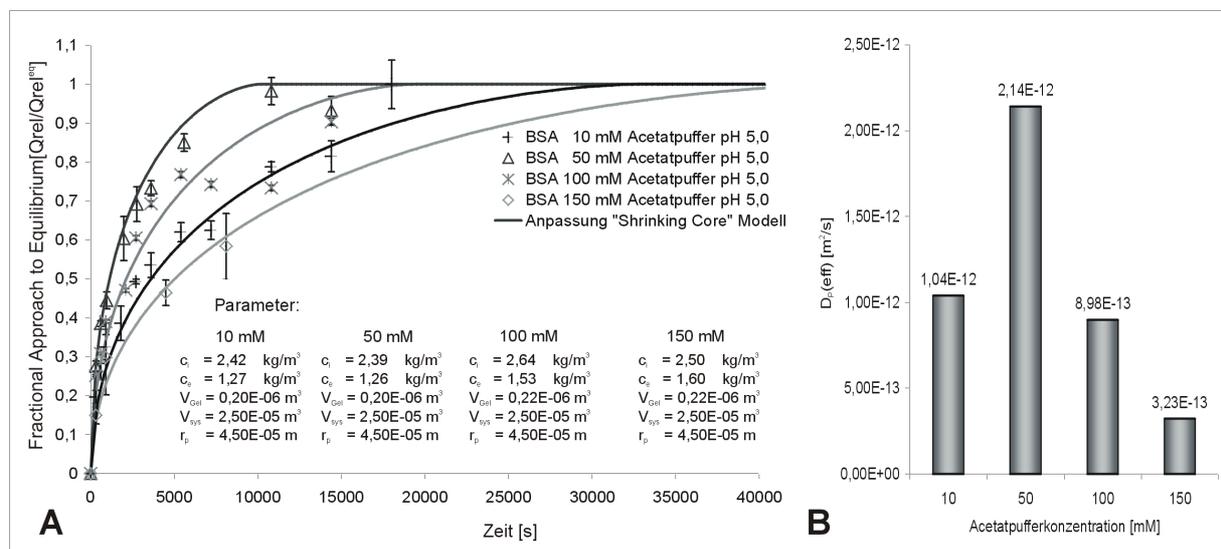


Abbildung 57: Einfluss der Acetatpufferkonzentration auf die Adsorptionskinetik von BSA. (A) „Fractional Approach to Equilibrium“ ($Q_{\text{rel}}/Q_{\text{rel}}^{\text{eq}}$) und die Parameter, die zur Anpassung der Daten mit dem „Shrinking Core“ Modell verwendet wurden. (B) Aus A ermittelte, effektive Diffusionskoeffizienten $D_P(\text{eff})$ in Abhängigkeit von der Acetatpufferkonzentration (10 mM; 50 mM; 100 mM; 150 mM)

Ab einer Pufferkonzentration von 50 mM führt die Zunahme der Ionenstärke, wahrscheinlich aufgrund der zunehmenden Abschirmung und Kompetition um die SP-Liganden zu einer deutlichen Erniedrigung der Diffusivität des Proteins im porösen Netzwerk des Adsorberpartikel. Insgesamt wirkt sich die Erhöhung der Ionenstärke auf die verminderte effektive Diffusivität von BSA im untersuchten Bereich nicht so gravierend aus, wie eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5,5.

4.3.2.3 Kalibrierung der Einkomponentenadsorptionen von BSA

Alle bisher gemachten quantitativen Aussagen wurden nur mit Hilfe der aus den Fluoreszenzintensitätsprofilen, bzw. aus der Festphase berechneten relativen Kapazitäten Q_{rel} und der Gleichgewichtskapazität Q_{max} , ermittelt, die durch Anpassung gewonnen wurden. Zwischen der gemessenen Fluoreszenzintensität in den Profilen, bzw. den daraus berechneten Q_{rel} -Werten und der absoluten Konzentration an BSA, das an die stationäre Phase gebunden ist, besteht zunächst kein direkter Zusammenhang. Der relative Kapazitätswert ist stark von den Geräteeinstellungen (Laserintensität, Detektorempfindlichkeit, Breite der konfokalen Lochblende), der Quantenausbeute des verwendeten Fluorophores und schließlich dem Markierungsgrad (D/P) des Proteins abhängig. Ein quantitativer Vergleich der Fluoreszenzintensitätsprofile aus verschiedenen Batchadsorptionskinetiken ist demnach nicht möglich.

Damit die Fluoreszenzintensitätsprofile für weiterführende Modellierungen der Adsorptionsprozesse in absolute Proteinkonzentrationsprofile übersetzt, bzw. umgerechnet werden können, ist eine Eichung der relativen Kapazitäten über die Flüssigphase nötig. Aufgrund der Massenbilanz im untersuchten Adsorptionsansatz sollte jedes Proteinmolekül, dass aus der Lösung verschwindet, gebunden an oder in der Festphase, detektierbar sein. Deshalb sollte sich in einer Auftragung der relativen Kapazitäten $Q_{rel}(t)$ gegen die korrespondierenden absoluten Kapazitäten $Q_{abs}(t)$, die aus der Flüssigphase über die Messung der kalibrierten Fluoreszenzintensität berechnet wurden, eine lineare Abhängigkeit ergeben. In Abbildung 58 sind die beiden Größen in sogenannten Paritätsplots für die gezeigten Experimente bei verschiedenen experimentellen Bedingungen aufgetragen.

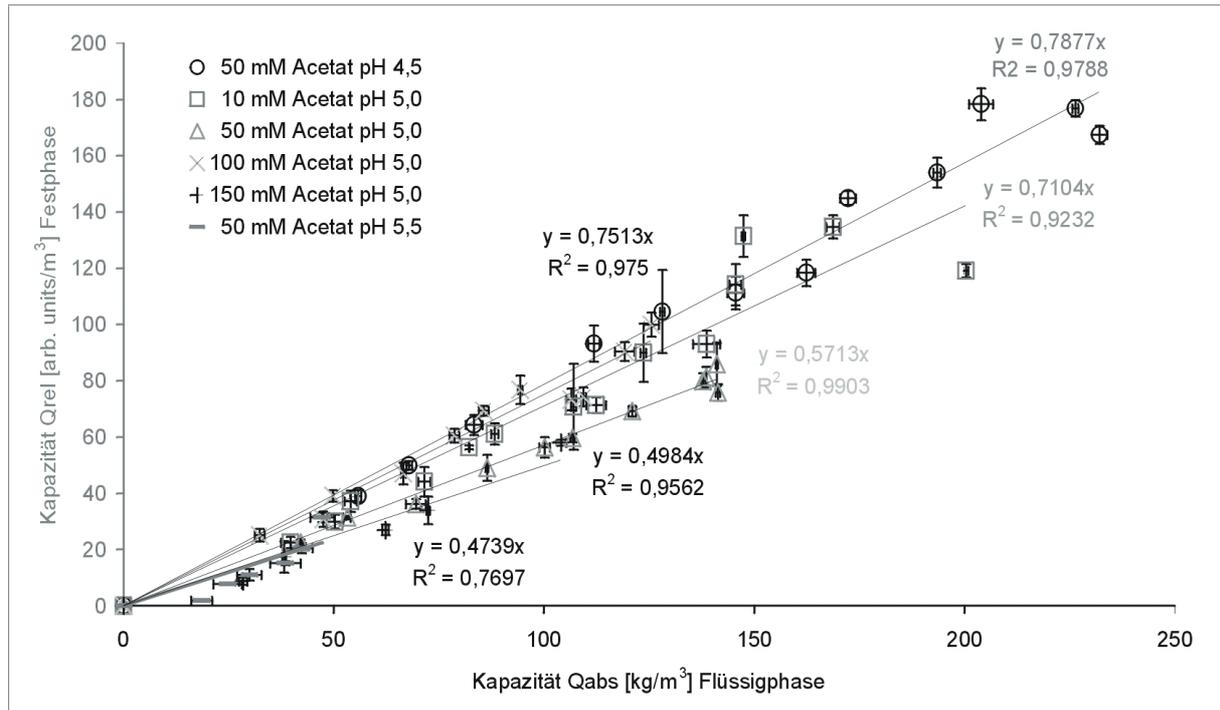


Abbildung 58: Auftragungen der relativen Kapazität Q_{rel} gegen die korrespondierenden absoluten Kapazitäten Q_{abs} der Adsorption von BSA an SP-Sepharose FF unter verschiedenen experimentelle Bedingungen. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichungen der bestimmten Größen von der Grundgesamtheit

Die Paritätsplots können als Eichgeraden betrachtet und zur Umrechnung der Intensitäten in den Fluoreszenzintensitätsprofilen in reale Proteinkonzentrationen genutzt werden. Alle in Abbildung 58 dargestellten Auftragungen zeigen eine, dem Rahmen der Fehlerbandbreite der Methode entsprechend, gute lineare Korrelation. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die gezeigten Profile bei den unterschiedlichen, experimentellen Bedingungen, den realen Verlauf im Adsorberpartikel während der Adsorptionskinetiken gut abbilden.

4.3.3 Adsorptionsgleichgewichte BSA (Isothermen)

4.3.3.1 Adsorptionsgleichgewichte von BSA an SP-Sepharose FF

Im folgenden Abschnitt wird zunächst die Änderung des Adsorptionsgleichgewichts der Adsorption von BSA an SP-Sepharose FF in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke näher untersucht, um sie später mit den erhaltenen Ergebnissen der kinetischen- und mechanistischen Untersuchungen diskutieren zu können (s. 4.3.2 u. 4.6.1). In Abbildung 59 sind die Isothermen für die BSA-Adsorption bei drei verschiedenen pH-Werten in 50 mM Acetatpuffer gezeigt.

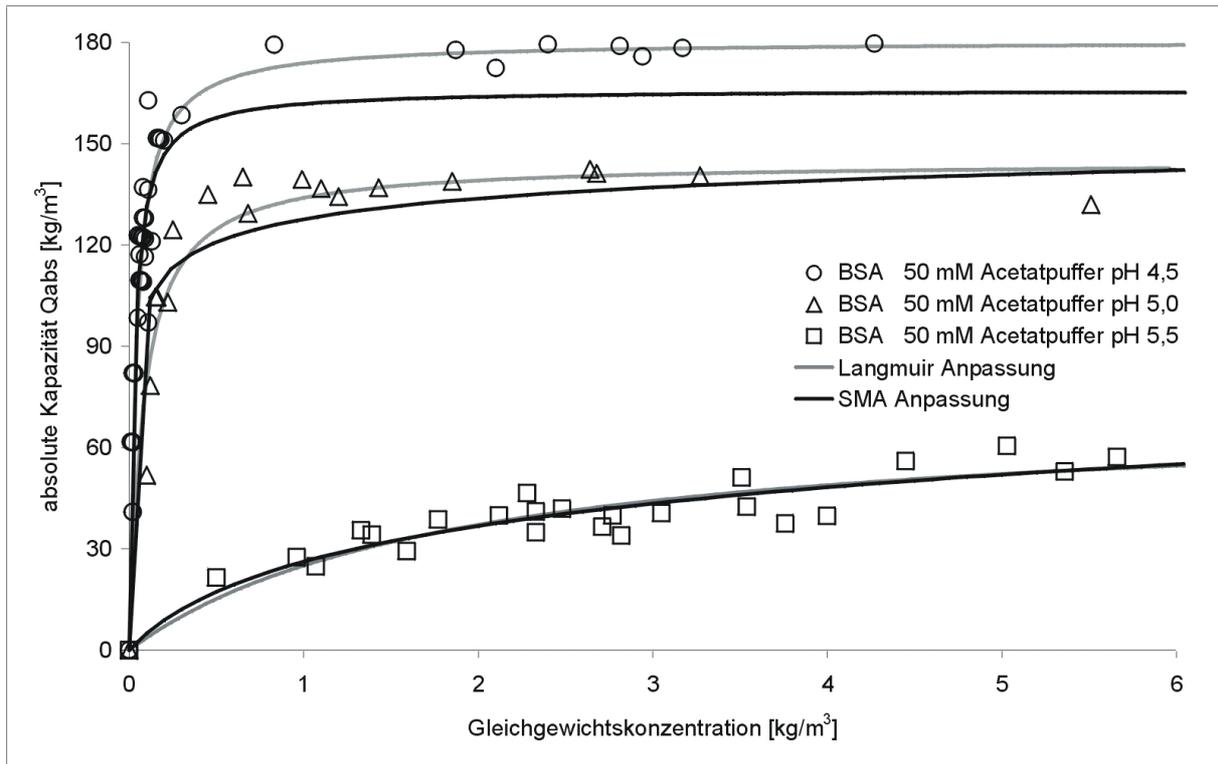


Abbildung 59: Isothermen der BSA-Adsorption an SP-Sepharose FF in 50 mM Acetatpuffer bei den drei verschiedenen pH-Werten 4,5 5,0 und 5,5. Die experimentellen Daten sind an das Langmuir-(grau) und an das SMA-Adsorptionsmodell (schwarz) angepasst

Zum Vergleich der beiden verwendeten Isothermenmodelle sind zusätzlich simulierte Isothermen, die mit den ermittelten Modellparametern berechnet wurden als durchgezogene Linien in der Graphik abgebildet. Es zeigt sich qualitativ, dass die Langmuirschen Adsorptionsisothermen (grau) die experimentellen Daten besser beschreiben als das SMA-Modell (schwarz). Dies ist nicht verwunderlich, da das SMA-Modell deutlich weniger anpassbare Parameter enthält als das Langmuir Modell, das für jede Salzkonzentration individuelle Parameter erfordert.

Bei pH 4,5 besitzt die Adsorptionsisotherme eine nahezu rechtwinklige Form. Die daraus resultierenden Langmuir und SMA-Parameter sind korrespondierenden Konstanten bei den beiden anderen pH-Werten 5,0 und 5,5 in Tabelle 13 gegenübergestellt.

Tabelle 13: Bestimmte Parameter der Isothermen von BSA in 50 mM Acetatpuffer bei den drei pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5. Zweiparameteranpassung nach Langmuir für eine Salzkonzentration und Dreiparameteranpassung nach Brooks und Cramer über drei Salzkonzentrationen (50 mM; 100 mM; 150 mM) zur Bestimmung der SMA-Parameter K_i , ρ_i und z_i (Brooks und Cramer 1992)

pH-Wert	Langmuir-Modell		SMA-Modell		
	K_a [m ³ /kg]	Q_{\max} [kg/m ³]	K_i	ρ_i	z_i
4,5	25,0	180,4	103,57	86,64	1,00
5,0	12,5	144,7	0,77	74,94	5,35
5,5	0,5	71,5	0,01	88,34	4,22

Die maximale Kapazität Q_{\max} der SP-Sepharose FF bei diesen Bedingungen beträgt 180 kg/m³ und die Langmuir Assoziationsgleichgewichtskonstante K_a wurde zu 25 m³/kg bestimmt. Mit zunehmendem pH-Wert geht die Isotherme über pH 5,0 bei pH 5,5 von der rechtwinkligen- in eine fast lineare Form über (s. Abb. 59). Dies äußert sich bei pH 5,5 in einer deutlich niedrigeren Kapazität Q_{\max} von 72 kg/m³ und einem kleineren K_a -Wert von 0,5 m³/kg. Im untersuchten pH-Bereich von pH 4,5 bis pH 5,5 ändert BSA seine Nettoladung von positiv zu negativ. Mit einem isoelektrischen Punkt von 4,8 trägt es bei pH 5,0 und pH 5,5 bereits negative Überschussladung. Dennoch besitzt BSA bei pH 5,0 noch ein relativ günstiges Bindungsgleichgewicht mit einer maximalen Kapazität von 145 kg/m³ bei einem K_a von 12,5 m³/kg. Ein Erklärungsansatz für die relativ hohe Kapazität unter diesen Bedingungen ist in einer günstigen Verteilung der positiven Ladungen im BSA-Molekül und der Existenz von Bereichen auf der Moleküloberfläche zu sehen, in denen positive Ladungen konzentriert sind (Kopaciewicz et al. 1983). Auf die Ladungsverteilung des BSA-Moleküls in Abhängigkeit vom pH-Wert wird im Zusammenhang mit den Titrationskurven (s. 4.7) in der Diskussion noch ausführlich eingegangen werden (s. 5.3).

Die ermittelten, dimensionslosen Gleichgewichtskonstanten K_i des SMA-Modells verhalten sich im Trend genau wie die Langmuir-Assoziationsgleichgewichtskonstanten K_a . Als zusätzliche Information erhält man noch die charakteristische Ladung z_i , welche beschreibt mit wieviel Ladungen das Protein an die Liganden der Matrix bindet. Bei pH 4,5 würde demnach das Protein nur mit einer einzigen Ladung an die Matrix binden. Bei höheren pH-Werten erhöht sich dieser Wert auf ca. 4 – 5 Kontaktladungen (s. Tab. 13). Die sterischen Faktoren ρ_i bewegen sich zwischen ca. 75 und 90 und weisen keinen eindeutigen Trend auf. Die Anzahl der Bindungsplätze, die durch Bindung des Proteins sterisch abgeschirmt werden, hängt aber im wesentlichen von der Molekülstruktur und -größe ab. Bei Vernachlässigung von pH-bedingten Konformationsänderungen und Expansionseffekten sollte sich der sterische Faktor ρ_i für ein Proteinmolekül unabhängig vom pH-Wert in der

gleichen Größenordnung bewegen, wenn das Protein immer in gleicher Orientierung an die Matrix bindet.

Der Isothermensatz bei verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen, der mit einer Ausnahme zur Bestimmung der SMA-Parameter bei pH 5,0 herangezogen wurde, ist in Abbildung 60 gezeigt, um den Einfluss der Ionenstärke auf das Adsorptionsgleichgewicht für BSA abzubilden.

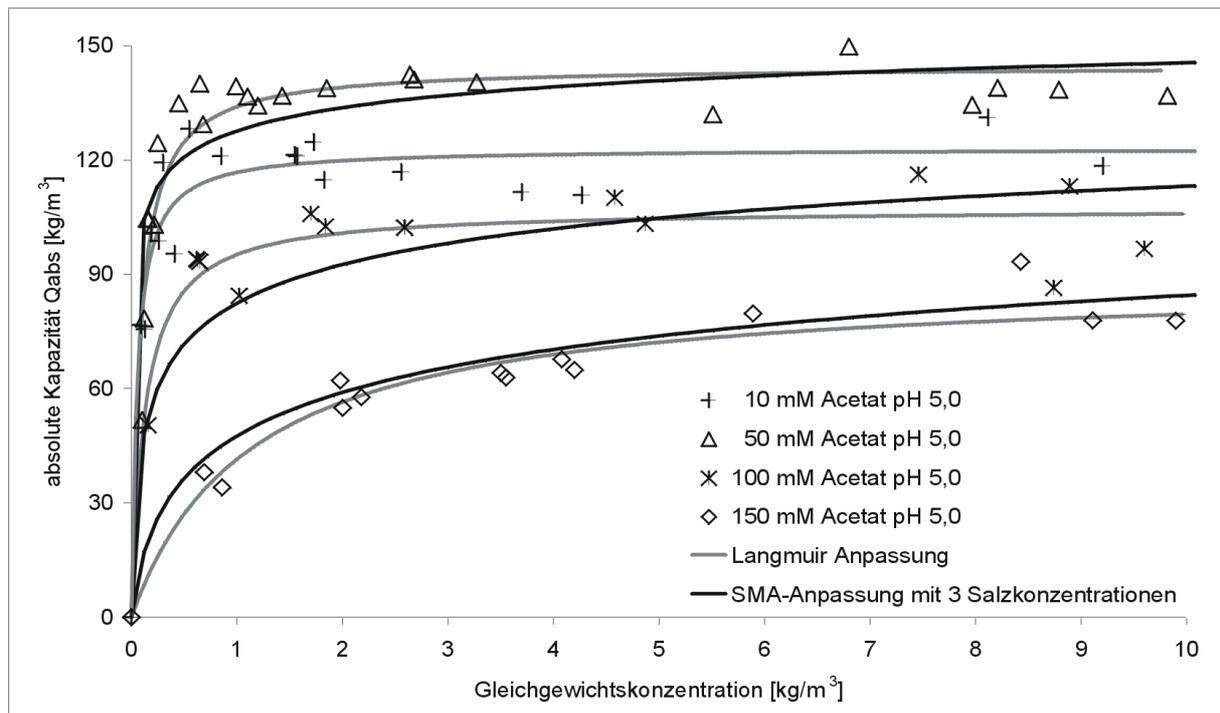


Abbildung 60: Isothermen der BSA-Adsorption an SP-Sepharose FF in 50 mM Acetatpuffer bei den vier verschiedenen Pufferkonzentrationen 10 mM, 50 mM, 100 mM und 150 mM Acetat pH 5,0. Die experimentellen Daten sind an das Langmuir- und mit Ausnahme der 10 mM Isotherme mit dem SMA-Adsorptionsmodell angepasst

Die abgebildete Isotherme in 10 mM Acetatpuffer pH 5,0 wurde nicht zur Bestimmung der SMA-Parameter für pH 5,0 verwendet, weil der Isothermenverlauf im Trend nicht zu den Modellvorstellungen des SMA-Modells passt. Beim „Steric Mass Action“ Modell wird von der Vorstellung ausgegangen, dass bei der betrachteten Ionenaustauschchromatographie in jedem Fall eine Erhöhung der Ionenstärke zu einer Erniedrigung der maximalen Kapazität aufgrund des Massenwirkungsgesetzes führt (Velayudhan und Horvath 1988). Im Gegensatz zu dieser Aussage weist ein Vergleich der beiden Isothermen bei 10 mM und 50 mM eine erhöhte Maximalkapazität bei 50 mM aus. Erst bei einer weiteren Steigerung der Acetatpufferkonzentration fällt Q_{max} und die Isotherme geht analog der pH-Werterhöhung von der nahezu rechtwinkligen Form in eine hyperbolische Form über.

Die K_a -Werte, die in Tabelle 14 für die einzelnen Acetatpufferkonzentrationen zusammengestellt sind, weisen einen konstanten Trend auf. Eine Erhöhung der Acetatpufferkonzentration ist über den gesamten Untersuchungsbereich mit einer kleineren Affinität von BSA, bzw. K_a -Wert verbunden.

Tabelle 14: Bestimmte Parameter der Isothermen von BSA bei pH 5,0 in 10 mM; 50 mM; 100 mM und 150 mM Acetatpuffer. Zweiparameteranpassung nach Langmuir für eine Salzkonzentration und Dreiparameteranpassung nach Brooks und Cramer über drei Salzkonzentrationen (50 mM; 100 mM; 150 mM) zur Bestimmung der SMA-Parameter K_i ; ρ_i und z_i (Brooks und Cramer 1992)

Konz.		Langmuir-Modell		SMA-Modell		
[mM]	K_a [m ³ /kg]	Q_{max} [kg/m ³]	K_i	ρ_i	z_i	
10	20	123,1	-	-	-	
50	12,5	144,7	0,77	74,94	5,35	
100	7,7	107,2				
150	0,9	88,5				

Ein vergleichbare Abhängigkeit des Adsorptionsgleichgewichtes von der Ionenstärke ist schon von Karau beobachtet worden (Karau 1998). Die Erhöhung der NaCl-Konzentration bei der Adsorption von BSA in 10 mM Acetatpuffer pH 4,0 an das Fließbettadsorptionsmaterial Streamline SP führte bei diesem Adsorber auch zunächst zu einer Erhöhung der maximalen Kapazität, bevor Q_{max} bei höheren NaCl-Konzentrationen wieder kleiner wurde (Karau 1998). Das Material unterscheidet sich von der in dieser Arbeit verwendeten SP-Sepharose FF nur durch einen Silikatkern, der dem Partikel für die Fließbettadsorption bessere fluiddynamische Eigenschaften auf Kosten der Maximalkapazität verleiht (Karau 1998).

Gebauer ermittelte bei der Adsorption von humanem Serumalbumin HSA an ppropfpolymerisierten Adsorbermembranen ein Kapazitätsmaximum bei 150 mM NaCl, konnte aber für die gleichen Membranen auch zeigen, dass die Kapazität von Lysozym aus Hühnereiweiß in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration kein Maximum durchläuft (Gebauer 1996). Auf eine Erklärung für dieses zunächst unerwartete Phänomen wird in der Diskussion noch einmal ausführlich eingegangen (s. 5.3).

Eine weitere Erhöhung der Acetatpufferkonzentration, bzw. der Ionenstärke in der Adsorptivlösung führt zu einer Reduzierung der Assoziationskonstante K_a und der maximalen Kapazität. In 100 mM Acetatpuffer beträgt die maximale BSA-Kapazität der SP-Sepharose FF 107 kg/m³ bei einem K_a -Wert von 7,7 m³/kg. Skidmore, Horstmann und Chase ermittelten für die Adsorption von BSA an den Kationenaustauscher S-Sepharose FF unter exakt den gleichen Bedingungen ein Q_{max} von 113 kg/m³ bei einem K_d -Wert von 0,133 kg/m³ (Skidmore

et al. 1990). Der Dissoziationskonstante K_d , bzw. die Gleichgewichtskonzentration in Flüssigphase, bei der das Adsorbiermaterial halbmaximal mit Protein gesättigt ist, entspricht dabei der reziproken Assoziationskonstanten K_a , die somit entsprechend $7,5 \text{ m}^3/\text{kg}$ beträgt. Ein Vergleich der beiden BSA-Isothermen in 100 mM Acetatpuffer pH 5,0 zeigt eine sehr gute Übereinstimmung für diese nahezu identischen Adsorbiermaterialien. Bei dem Kationenaustauscher SP-Sepharose FF, der im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, sind die Sulfitgruppen im Vergleich zum Material der Skidmore Studie lediglich über einen Propylspacer an die Agarosematrix gekoppelt. Der Literaturvergleich zeigt, dass mit der Mikrobathmethode, die im Abschnitt 3.7 beschrieben ist, trotz der kleinen Ansatzvolumina weitgehend reproduzierbare Daten generiert werden können.

In 150 mM Acetatpuffer pH 5,0 beträgt Q_{\max} $88,5 \text{ kg}/\text{m}^3$ bei einem K_a -Wert von 0,9. Eine Erhöhung der Acetatpufferkonzentration auf 150 mM wirkt sich demnach nicht so negativ auf die adsorptiven Eigenschaften des BSA-Moleküls aus wie eine Erhöhung des pH-Werts auf 5,5 in 50 mM Acetatpuffer (K_a -Wert $0,5 \text{ m}^3/\text{kg}$; Q_{\max} $71,5 \text{ kg}/\text{m}^3$).

4.3.4 Gegenüberstellung und Zusammenfassung der BSA-Daten

In diesem Abschnitt werden die bisher beschriebenen Daten noch einmal zusammengefasst und gegenüber gestellt. Die kinetischen Daten wurden an das „Shrinking Core“ Adsorptionsmodell angepasst. Die analytische Lösung, die dabei verwendet wurde gilt streng genommen nur für nicht reversible Adsorption, bzw. im nicht linearen Teil der Adsorptionsisotherme (s. Abb. 7). Der Gültigkeitsbereich ausreichender Irreversibilität des Adsorptionsgleichgewichts unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen lässt sich durch einen charakteristischen Gleichgewichtsparameter R^* ausdrücken. Dieser Wert kann nach Gleichung 6 aus der initialen Proteinkonzentration c_i der kinetischen Experimente (s. 4.3) und der korrespondierenden Langmuir Assoziationskonstanten K_a aus der entsprechenden Isotherme (s. 4.6) berechnet werden (s. 2.3.3.2 Gl. 6). Als Grenzbereich für eine sinnvolle Benutzung des „Shrinking Core“ Modells kann dabei ein Wert zwischen 0 und 0,3 angenommen werden (s. 2.3.3.2).

Alle Experimente, die einen Wert kleiner 0,3 besitzen, wurden folglich im für das Modell geeigneten, nicht linearen Teil der Isotherme, bzw. unter ausreichend, irreversiblen Bedingungen durchgeführt. In Tabelle 15 sind die R^* -Werte der BSA-Einkomponentenadsorptionen an SP-Sepharose FF zusammen mit den entsprechenden initialen Proteinkonzentrationen c_i und Assoziationskonstanten zusammengestellt.

Tabelle 15: Datengegenüberstellung Einkomponentenadsorptionsuntersuchung von BSA an SP-Sephrose FF: „Shrinking Core“ Porendiffusionskoeffizient $D_P(\text{eff})$, initiale Konzentration c_i , Langmuirparameter Q_{max} und K_a ; SMA-Konstanten K_i , ρ_i und z_i ; und Gleichgewichtsparameter R^* für die beschriebenen Adsorptionskinetiken und Isothermen.

Experimentelle Bedingungen	Adsorptionskinetik		Adsorptionsisothermen					
	Shrinking Core [$D_P(\text{eff})$]		Steric Mass Action			Langmuir		R^*
	$D_P(\text{eff})$ [m^2/s]	c_i [kg/m^3]	K_i	ρ_i	z_i	Q_{max} [kg/m^3]	K_a [m^3/kg]	
50 mM pH 4,5	1,66E-12	2,51	103,57	86,64	1,00	180,4	25,0	0,02
10 mM pH 5,0	1,04E-12	2,42	-	-	-	123,1	20,0	0,02
50 mM pH 5,0	2,14E-12	2,39	0,77	74,94	5,35	144,7	12,5	0,03
100 mM pH 5,0	8,98E-13	2,64				107,2	7,7	0,05
150 mM pH 5,0	3,23E-13	2,55				88,0	0,9	0,30
50 mM pH 5,5	6,09E-14	2,21	0,01	88,34	4,22	71,5	0,5	0,48

Zusätzlich sind auch die bestimmten effektiven Diffusionskoeffizienten $D_P(\text{eff})$, die SMA-Parameter und Q_{max} in der Tabelle aufgeführt.

Ein Vergleich der Koeffizienten ergibt, dass lediglich im Falle des Experiments bei pH 5,5 die Gleichgewichtslage den Bedingungen des „Shrinking Core“ Modells nicht mehr genügt. Zur Diskussion und Gegenüberstellung mit den entsprechenden effektiven Porendiffusionskoeffizienten $D_P(\text{eff})$ von BSA unter anderen, experimentellen Bedingungen wurde unzulässiger Weise jedoch auch für dieses Experiment ein $D_P(\text{eff})$ bestimmt.

Die ermittelten Transportkoeffizienten und die maximalen Kapazitäten korrelieren bei der Adsorption in der Weise, dass eine Erhöhung des pH-Wertes zu niedrigeren Kapazitäten Q_{max} und Affinitäten K_a^- , bzw. K_i -Werten führt, während der effektive Transportkoeffizient $D_P(\text{eff})$ bei pH 5,0 ein Optimum aufweist. Bei einer Erhöhung der Ionenstärke bei einem konstanten pH-Wert von 5,0 scheint es für $D_P(\text{eff})$ und Q_{max} ein Optimum bei 50 mM zu geben. Der K_a -Wert ist hingegen bei 10 mM Acetatpuffer am höchsten, was für die höchste Bindungsaffinität bei dieser Ionenstärke spricht. In der Diskussion werden die aufgeführten Werte nochmals gegenübergestellt und zusammen mit den mlgG-Daten ausführlich diskutiert (s. 5.3).

4.4 Adsorption des IgG2a Antikörpers (mIgG) an SP-Sepharose FF

4.4.1 Problematik

Die Adsorption des isolierten monoklonalen Antikörpers (mIgG) an SP-Sepharose FF unter verschiedenen, experimentellen Bedingungen wird im folgenden Abschnitt näher betrachtet. Wiederum waren die Einflüsse von pH-Wert und Acetatpufferkonzentration, bzw. Ionenstärke Schwerpunkt der Untersuchungen. Analog zur Studie der Adsorption von BSA werden die gleichen konfokalen Methoden zur Generierung experimenteller Daten zur Beschreibung der Adsorptionskinetik (4.4.2) und der Adsorptionsgleichgewichte (4.4.3) eingesetzt.

4.4.2 Adsorptionskinetik des monoklonalen Antikörpers (mIgG) im Rührreaktor

4.4.2.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik von mIgG

Das Adsorptionsverhalten des monoklonalen IgG2a-Antikörpers wurde auch bei den drei pH-Werten 4,5, 5,0 und 5,5 wie unter 3.6.3 beschrieben analysiert. Bei einem pH-Wert von 4,5 verhält sich der Adsorptionsprozess des mIgG-Moleküls an die stationäre Phase analog der entsprechende BSA Adsorption unter diesen Bedingungen (s. 4.3.2.1). Der monoklonale Antikörper penetriert den SP-Sepharose FF-Partikel als relativ steile Adsorptionsfront bis sich die beiden Fronten in der Mitte zur Sättigung treffen. Eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5,0 führt hingegen zu einer drastischen Veränderung der Adsorptionseigenschaften des monoklonalen Antikörpers während der Inkubation mit SP-Sepharose FF. In Abbildung 61 sind exemplarisch Konfokalbilder von einzelnen SP-Sepharose Partikeln gezeigt. Als markiertes Proteinkonjugat wurde bei diesem Experiment mIgG-Oregon Green in einer Verdünnung von 1:20 mit unmarkiertem Protein eingesetzt.

Das Fluoreszenzsignal dieser Spezies ist in Abbildung 61 durch einen blauen Farbcode darstellt (hellerer Farbton = stärkeres Fluoreszenzsignal). Nach 5 Minuten Inkubationszeit stimmt der Adsorptionsfortschritt im entsprechenden Konfokalbild qualitativ noch weitgehend mit den bisher gezeigten Aufnahmen überein. Zu längeren Inkubationszeiten hin entwickelt sich ein heller Ring in der betrachteten Partikelebene, der zur Partikelmitte wandert und dabei stetig an Intensität zuzunehmen scheint. Nach 4h ist dieses Signal in der Partikelmitte akkumuliert und nimmt in der Folge wiederum an Intensität ab bis schließlich nach 26 h eine homogen mit Protein gesättigte stationäre Phase vorliegt.

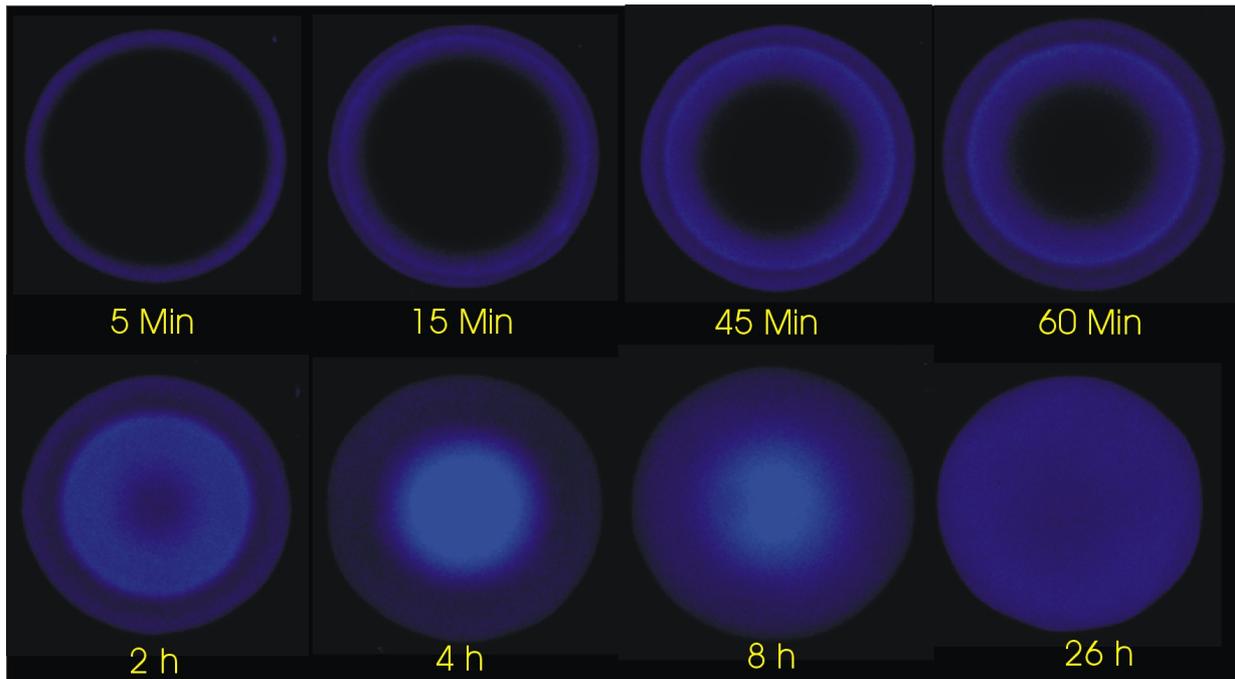


Abbildung 61: Exemplarische Konfokalbilder von SP-Sepharose FF-Partikeln zu verschiedenen Zeiten im Verlauf einer Inkubation mit mIgG (blau) in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0. Als Fluoreszenzfarbstoffkonjugat wurde bei dieser Serie mIgG-Oregon verwendet

Die korrespondierenden Fluoreszenzintensitätsprofile sind in Abbildung 62 dargestellt.

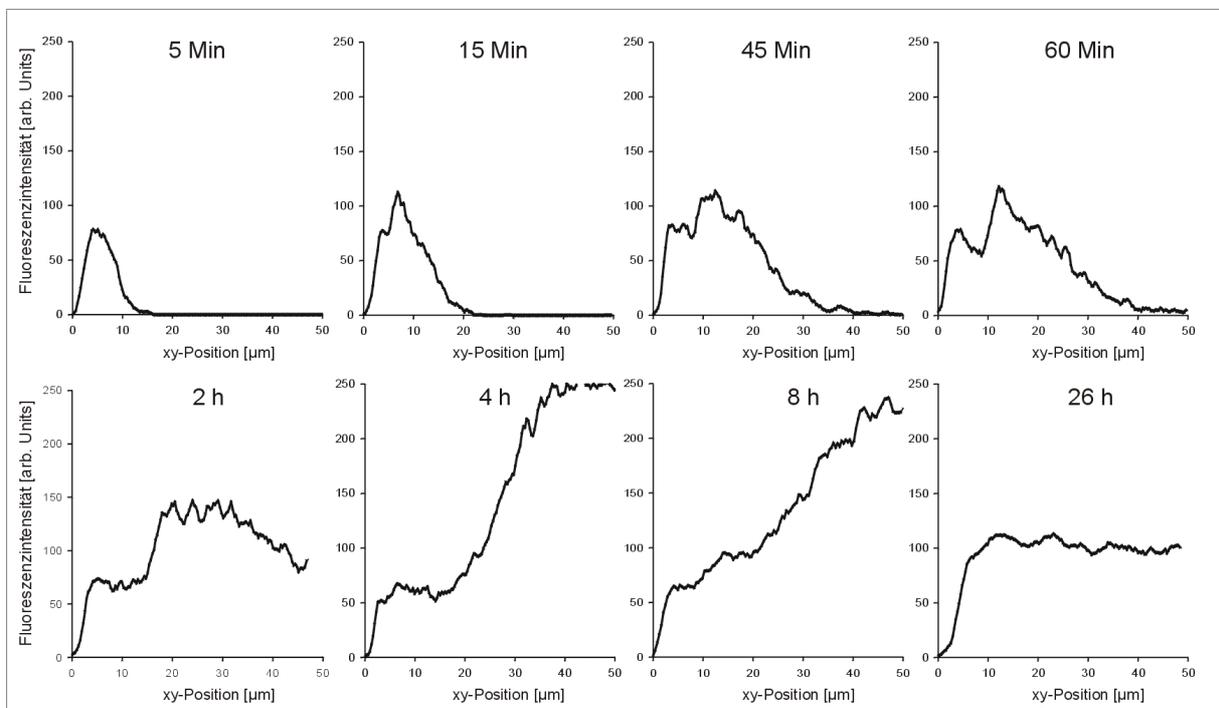


Abbildung 62: Korrespondierende Fluoreszenzintensitätsprofile der Inkubation von SP-Sepharose FF mit mIgG in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 der Konfokalbilder von Abbildung 61

Im Gegensatz zu den BSA-Intensitätsprofilen ist die Adsorptionsfront des monoklonalen Antikörpers bei pH 5,0 nicht so steil ausgeprägt. Zusätzlich bildet sich ein zweites lokales Maximum in den Profilen aus, das über die Inkubationsdauer an Intensität zunimmt und sich zum Zentrum des Partikels orientiert. Nach 4 h beginnt das in der Mitte des Partikels akkumulierte, gebundene mIgG wiederum in Richtung der äußeren Partikelregionen weiter zu wandern. In der Folge gleichen sich die intrapartikulären Konzentrationsunterschiede langsam aus. Nach 26 h ist die temporäre heterogene Konzentrationsverteilung aufgehoben und ein typisches Sättigungsspektrum wird nach dieser Zeit beobachtet (s. Abb. 62).

Da wiederum nur das gebundene Protein im Verlauf des Experiments zur konfokalen Bildgebung beiträgt, deutet der beschriebene Adsorptionsprozess daraufhin, dass der gebundene Proteinanteil im Verlauf des Experiments regional nicht wie erwartet konstant zunimmt, sondern sich bei diesen experimentellen Bedingungen temporär ändert.

Dieses Adsorptionsverhalten ist mit der bestehenden chromatographischen Theorie des Ionenaustauschs und der Adsorption nicht zu erklären und widerspricht den Transportannahmen von allen bestehenden Adsorptionsmodellen, wie z.B. dem „Shrinking Core“ Modell (s. 2.4.6.2).

Bevor auf die weitere Quantifizierung der Adsorptionsprozesse eingegangen wird, soll zunächst qualitativ anhand der Intensitätsprofile die Veränderung dieses Transportphänomens durch eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf pH 5,5 beschrieben werden.

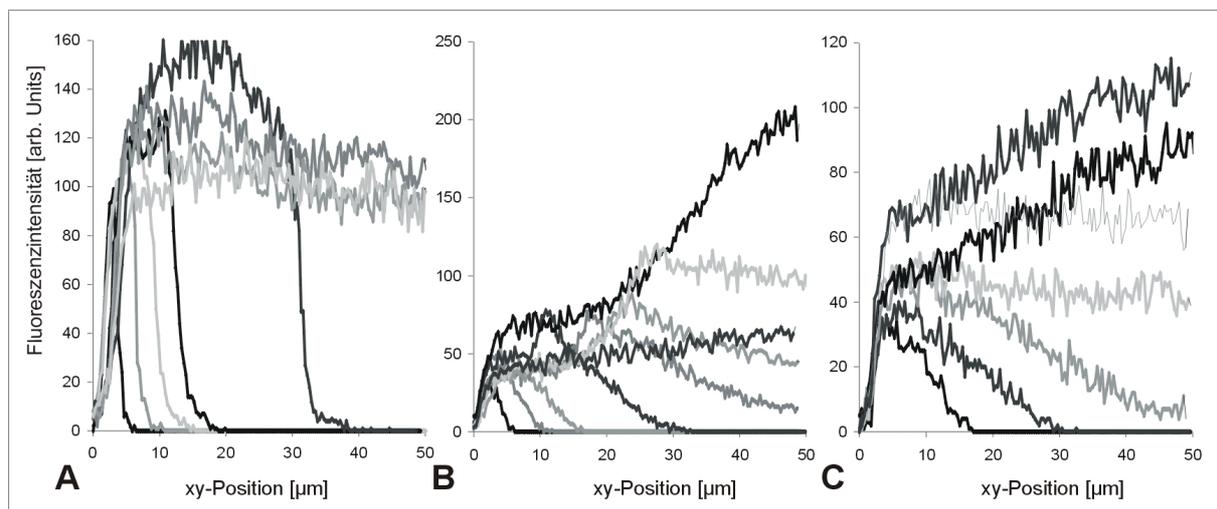


Abbildung 63: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln, die zu verschiedenen Zeiten aus den Konfokalbildern im Verlauf von mIgG-Adsorptionskinetiken in 50 mM Acetatpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten generiert wurden. (A) pH 4,5 [Zeiten: 5 Min, 31 Min, 60 Min, 2 h, 4 h, 13 h 30 Min, 22 h 30 Min, 26 h, 42 h]; (B) pH 5,0 [Zeiten: 5 Min, 15 Min, 45 Min, 2 h 10 Min, 4 h, 5 h 10 Min, 8 h, 16 h, 27 h]; (C) pH 5,5 [Zeiten: 2 Min, 8 Min, 15 Min, 30 Min, 60 Min, 2 h, 20 h]

In Abbildung 63 sind neben exemplarischen Fluoreszenzintensitätsprofilen der bereits beschriebenen Adsorption von mIgG an SP-Sepharose FF bei den pH-Werten 4,5 (A) und 5,0 (B) auch die Profile bei pH 5,5 (C) zusammengestellt.

Bei einer weiteren Erhöhung des pH Wertes auf pH 5,5 ändert sich hauptsächlich der zeitliche Rahmen des Akkumulationsphänomens. Unter diesen Bedingungen hat sich die temporäre Kapazitätsüberhöhung bereits nach zwei Stunden wieder aufgelöst.

Weiterhin ist das Ausmaß der Akkumulation in der Partikelmitte bei pH 5,5 lange nicht so stark ausgeprägt wie bei pH 5,0, wie sich durch Vergleich der gemessenen Fluoreszenzintensitäten am Rand und in der Mitte des Partikel bei den beiden entsprechenden Intensitätsprofilen zeigt.

Bei den drei beschriebenen Serien in Abbildung 63 wurde als Farbstoffkonjugat mIgG-Cy5 verwendet. Die temporäre Akkumulation des mIgG in der Mitte des SP-Sepharose FF Partikels ist bei pH 5,0 unabhängig vom verwendeten Farbstoffkonjugat.

Der Adsorptionsprozess bei den beiden pH-Werten 5,0 und 5,5 kann keinesfalls richtig durch das „Shrinking Core“ Modell wiedergegeben werden. Um die Adsorptionskinetiken dennoch untereinander vergleichen zu können, wurden die Einkomponentenkinetiken des mIgG-Moleküls mit dem „Homogeneous Diffusion“ Modell angepasst (s. 2.4.6.3).

Bei diesem Modell wird nicht zwischen an Partikel gebundenem Protein und Protein im Porenwasser unterschieden. Vielmehr wird alles „interne“ Protein in einer gesamten Kapazität Q_{tot} zusammengefasst. Die treibende Kraft des Adsorptionsprozesses bildet sich dann aus dem Gradienten dieser totalen Proteinkapazität, bzw. Konzentration über dem Partikelradius. Der mit Hilfe des „Homogeneous Diffusion“ Modells bestimmte effektive Diffusionskoeffizient $D_H(\text{eff})$ ist aufgrund des Konzentrierungseffektes, kleiner als der effektive Diffusionskoeffizient $D_P(\text{eff})$, der durch Anpassung der experimentellen Daten an z.B. an das „Shrinking Core“ Modell erhalten werden kann (z.B. (Chang und Lenhoff 1998; Lewus et al. 1998). Durch die Adsorption der Proteine an die stationäre Phase ist die Kapazität Q lokal immer größer als die entsprechende Proteinkonzentration c in der Flüssigphase, und folglich ist der Gradient $(\partial Q/\partial r)$ immer steiler als der entsprechende Konzentrationsgradient $(\partial c/\partial r)$ in der Porenflüssigkeit (Chang und Lenhoff 1998).

Zwar beschreibt auch das zur Anpassung verwendete „Homogeneous Diffusion“ Modell die beschriebenen Adsorptionsprozesse bei pH 5,0 und 5,5 nicht vollständig, jedoch kommen die Annahmen dieses Modells den beobachteten Transportprozessen im Vergleich zum „Shrinking Core“ Modell wesentlich näher.

In Abbildung 64 (A) sind Auftragungen der (Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}) -Werte gegen die Zeit für die drei untersuchten pH-Werte gezeigt. Weitere experimentelle Daten zu diesen Experimenten befinden sich im Anhang.

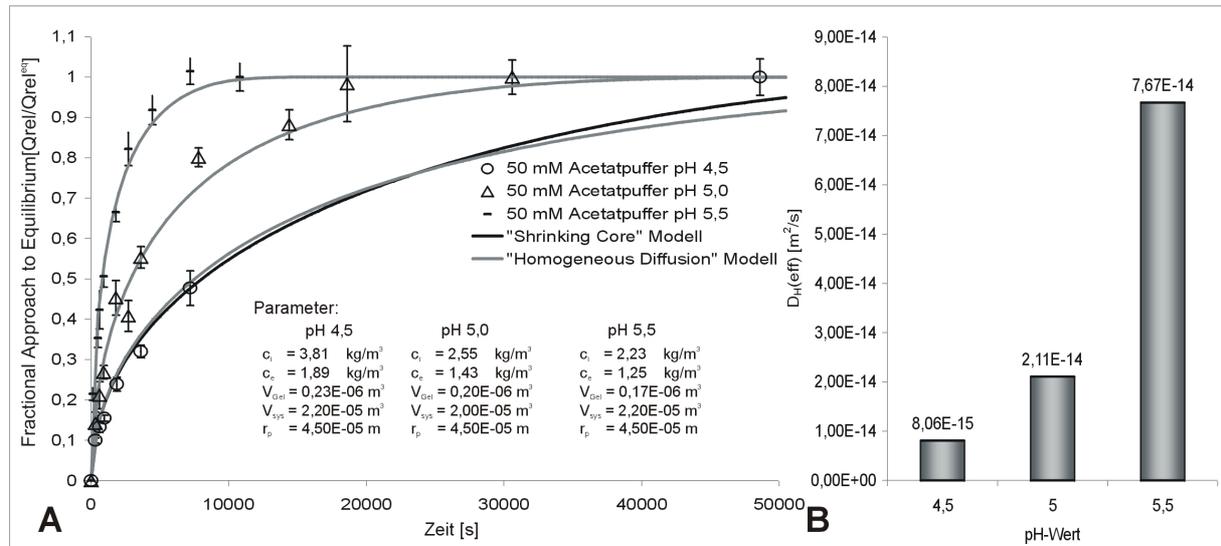


Abbildung 64: Einfluss des pH-Wertes auf die Adsorptionskinetik von mlgG. (A) „Fractional Approach to Equilibrium“ (Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}) und die Parameter, die zur Anpassung der Daten mit dem „Shrinking Core“- (schwarz) und dem „Homogeneous Diffusion“ Modell (grau) verwendet wurden. (B) Aus A ermittelte, effektive Diffusionskoeffizienten („Homogeneous Diffusion“ Modell $D_H(eff)$) in Abhängigkeit vom pH-Wert (pH 4,5; 5,0 und 5,5)

Aus der Auftragung des „Fractional Approach to Equilibrium“ (Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}) gegen die Zeit wurde durch Anpassung an das „Shrinking Core“ Modell nur für pH 4,5 ein effektiver Diffusionskoeffizient $D_P(eff)$ zu $2,47 \text{ E-}13 \text{ m}^2/\text{s}$ bestimmt. Ein Vergleich dieses Wertes mit der entsprechenden Mobilität von BSA-Moleküls ($D_P(eff) = 1,66 \text{ E-}12 \text{ m}^2/\text{s}$) unter diesen Bedingungen zeigt, dass das mlgG-Molekül im Partikel bei pH 4,5 im Vergleich zum BSA um den Faktor von ca. 10 langsamer transportiert wird. Da beide Transportprozesse ein vergleichbares Adsorptionsprofil vom „Shrinking Core“ Typ besitzen, ist diese Beobachtung aufgrund der Größenunterschiede der beiden Moleküle naheliegend (s. 5.3).

Abbildung 64 (B) stellt die mit dem „Homogeneous Diffusion Modell bestimmten effektiven Diffusionskoeffizienten $D_H(eff)$ für die drei pH-Werte gegenüber. Der ermittelte Koeffizient $D_H(eff)$ aus der Anpassung mit dem „Homogeneous Diffusion“ Modell ist wie erwartet um ca.

das 200-fache kleiner als der korrespondierende $D_p(\text{eff})$, der mit den Annahmen des „Shrinking Core“ Modells bestimmt wurde.

Aus der Auftragung der effektiven Diffusionskoeffizienten bei den untersuchten pH-Werten in Abbildung 64 (B) ist zu entnehmen, dass die Mobilität des mIgG-Moleküls mit steigendem pH-Wert beträchtlich zunimmt. Im Gegensatz zur BSA-Adsorption, erhöht sich die Geschwindigkeit der Adsorption des monoklonalen Antikörpers mit steigendem pH-Wert.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die gravierende Änderung des Transportverhaltens des mIgG im Ausmaß stark vom pH-Wert der Adsorptionslösung abhängt und mit einer Geschwindigkeitserhöhung des Adsorptionsprozesses einher geht.

Aussagen über den Transportmechanismus lassen sich anhand der bisher gezeigten Daten nur unzureichend treffen. Der Transportmechanismus des von mIgG bei verschiedenen pH-Werten wird unter 4.6 noch genauer betrachtet und spielt möglicherweise eine tragende Rolle bei der Erklärung des „Akkumulationsphänomens“ (s. 5.3). Zusätzlich sei noch erwähnt, dass dieses Akkumulationsphänomen nicht nur für diesen monoklonalen IgG2a Antikörper beobachtet wurde, sondern nachweislich auch noch bei zwei weiteren Proteinen auftritt. Lysozym und Ribonuklease A zeigen bei bestimmten experimentellen Bedingungen vergleichbare Akkumulationsphänomene bei der Adsorption an SP-Sepharose FF (Lenhoff und Dziennik 1999). Darauf wird im Zusammenhang mit anderen Daten in der Diskussion noch einmal ausführlich eingegangen (s. 5.3).

4.4.2.2 Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorptionskinetik von mIgG

Im folgenden Abschnitt wurde der Einfluss der Acetatpufferkonzentration genauer untersucht. Besonders interessant war dabei die Auswirkung auf das unter 4.4.2.1 beobachtete Akkumulationsphänomen. Dazu wurde die Acetatpufferkonzentration analog der Studie bei BSA von 50 mM auf 150 mM in zwei weiteren Experimenten erhöht. Der Versuch eine Batchadsorptionskinetik bei einer niedrigeren Acetatpufferkonzentration von 10 mM aufzunehmen scheiterte aufgrund der geringen Löslichkeit des monoklonalen Antikörpers unter diesen Bedingungen. Exemplarische Konfokalbilder bei den drei untersuchten Pufferkonzentrationen sind in Abbildung 65 zusammengestellt.

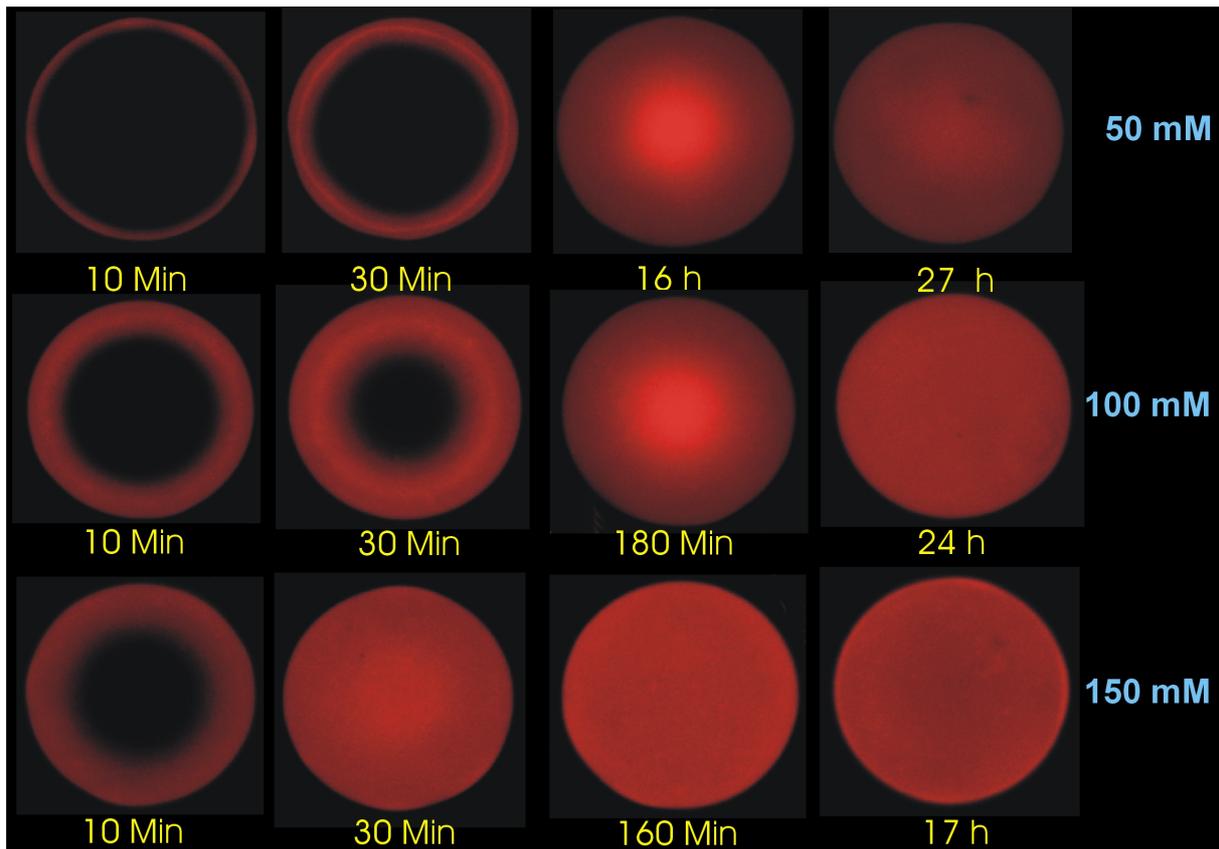


Abbildung 65: Konfokalbilder von SP-Sepharose FF Partikeln, die im Verlauf von Inkubationen mit mlgG bei einem pH-Wert von 5,0 mit drei verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen 50 mM; 100 mM und 150 mM aufgenommen wurden. Als markiertes Proteinkonjugat wurde jeweils mlgG-Cy5 verwendet

Die Konfokalbilder in Abbildung 65 zeigen, dass auch bei einer Erhöhung der Ionenstärke das „Akkumulationsphänomen“ in den SP-Sepharose FF Partikeln auftritt. Analog einer pH-Werterhöhung führt auch die Erhöhung der Acetatpufferkonzentration dazu, dass sich das Akkumulationsmaximum zu kürzeren Adsorptionszeiten hin verlagert. Bei 150 mM ist kein deutlicher Ring mehr in den Bildern auszumachen. Hier ist nur eine leichte Erhöhung der gebundenen mlgG-Konzentration nach 30 Minuten in der Partikelmitte zu beobachten.

In Abbildung 66 sind wiederum die entsprechenden Fluoreszenzintensitätsprofile aus den Inkubationen von mlgG bei den drei verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen 50 mM (A); 100 mM (B) und 150 mM (C) zusammengestellt. Die in Abbildung 65 gezeigten Konfokalbilder dienen hierbei dem besseren Verständnis der Intensitätsverläufe in Abbildung 66.

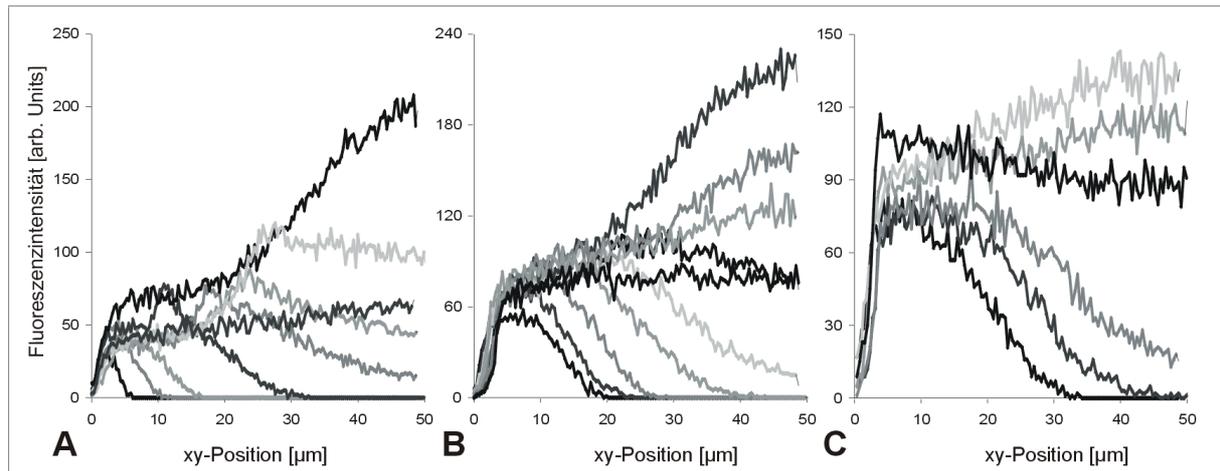


Abbildung 66: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln, die zu verschiedenen Zeiten aus den Konfokalbildern im Verlauf von mIgG-Adsorptionskinetiken bei pH 5,0 mit unterschiedlichen Acetatpufferkonzentrationen generiert wurden. (A) 50 mM [Zeiten: 5 Min, 15 Min, 45 Min, 2 h 10 Min, 4 h, 5 h 10 Min, 7 h 50 Min, 16 h, 27 h]; (B) 100 mM [Zeiten: 6 Min, 10 Min, 15 Min, 30 Min, 45 Min, 60 Min, 1 h 45 Min, 3 h, 4 h, 24 h]; (C) 150 mM [Zeiten: 5 Min, 10 Min, 15 Min, 30 Min, 60 Min, 17 h]

Ein Vergleich der drei Adsorptionsverläufe in Abbildung 66 deutet darauf hin, dass eine Erhöhung der Ionenstärke analog der pH-Werterhöhung neben der zeitlichen Verschiebung der Proteinakkumulation auch zu einer Änderung des Ausmaßes der Konzentrationsüberhöhung führt. Bei einer Acetatpufferkonzentration von 150 mM ist der monoklonale Antikörper nur noch in einem ganz geringen Maße in der Partikelmitte konzentriert und die Proteinverteilung im Partikel ist nach ca. 3 h bereits homogen.

Da durch eine Erhöhung der Acetatpufferkonzentration im Wesentlichen die elektrostatischen Wechselwirkungen geschwächt werden, spielen beim Auftreten des Akkumulationsphänomens vermutlich elektrostatische Wechselwirkungen eine große Rolle. Diese Beobachtung ist in Anbetracht der untersuchten Ionenaustauschchromatographie nicht so trivial, wie es auf den ersten Blick scheint, da auch hydrophobe Wechselwirkungen der Proteine mit der stationären Phase oder untereinander durchaus zu lokalen Akkumulationen im Partikel führen könnten.

Zum Vergleich der Adsorptionskinetiken für mIgG bei den drei verschiedenen Ionenstärken sind in Abbildung 67 (A) und (B) wiederum die normierten Zeitverläufe und die daraus bestimmten effektiven Diffusivitäten $D_H(\text{eff})$ gegenübergestellt. Nähere Informationen zu den einzelnen Experimenten, sowie die experimentellen Daten sind im Anhang im Anschluss an diese Arbeit aufgeführt (s. Anhang C).

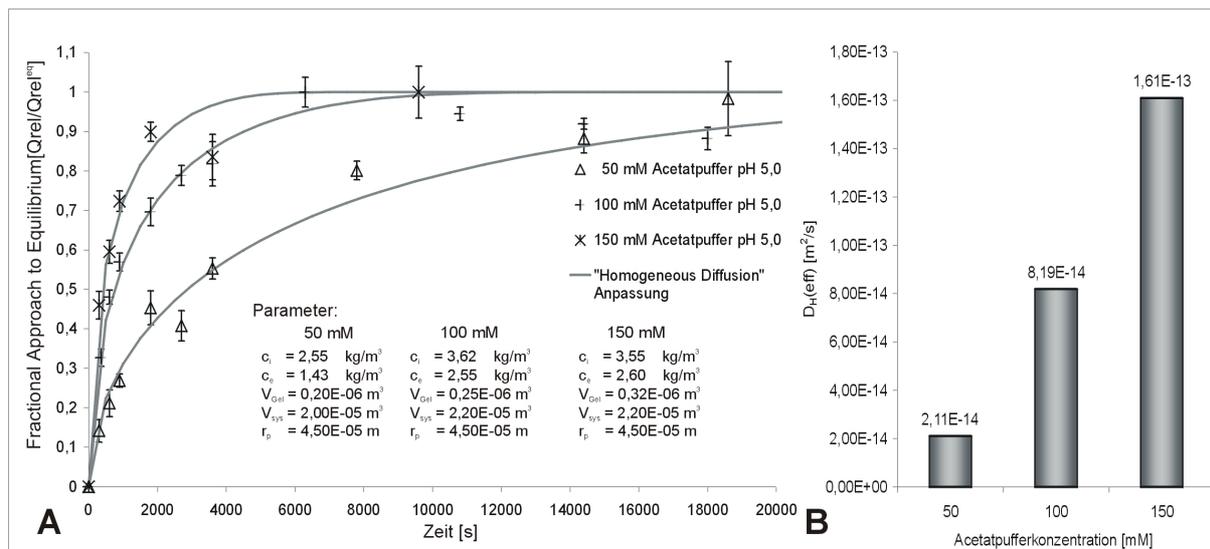


Abbildung 67: Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorptionskinetik von mlgG. (A) „Fractional Approach to Equilibrium“ ($Q_{\text{rel}}/Q_{\text{rel}}^{\text{eq}}$) und die Parameter, die zur Anpassung der Daten mit dem „Homogeneous Diffusion“ Modell (grau) verwendet wurden. (B) Aus A ermittelte, effektive Diffusionskoeffizienten („Homogeneous Diffusion“ Modell) $D_H(\text{eff})$ in Abhängigkeit vom pH-Wert (pH 4,5; 5,0 und 5,5)

Genau wie eine Erhöhung des pH-Wertes führt eine Erhöhung der Ionenstärke in der Adsorptivlösung zu einer deutlichen Geschwindigkeitszunahme der Adsorption des monoklonalen Antikörper an den SP-Sepharose FF-Träger. Die Abhängigkeit der Adsorptionsgeschwindigkeit steigt dabei nahezu linear mit Erhöhung der Acetatpufferkonzentration an. Eine Erhöhung der Acetatpufferkonzentration auf 150 mM führt dabei im untersuchten Parameterfenster zur größten Mobilität des mlgG-Moleküls im SP-Sepharose FF-Partikel.

4.4.2.3 Kalibrierung der Einkomponentenadsorptionen von mlgG

Analog zur Darstellung der Experimente bei der Einkomponentenadsorption von BSA kann auch für die mlgG-Batchadsorptionskinetiken eine Auftragung der ermittelten relativen und absoluten Kapazitäten Q_{rel} und Q_{abs} zur Eichung und Übersetzung der gezeigten Fluoreszenzintensitätsprofile für weiterführende, mathematische Modellierungen herangezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist zunächst nur die lineare Korrelation zwischen den beiden Größen wichtig, da sie als Qualitätskriterium für die experimentelle Aussagekraft der konfokalmikroskopischen Analysen von Adsorberpartikeln dient. In Abbildung 68 sind dazu die Paritätsauftragungen der beschriebenen Batchadsorptionskinetiken für die Adsorption von mlgG an SP-Sepharose FF bei den untersuchten Bedingungen aufgeführt.

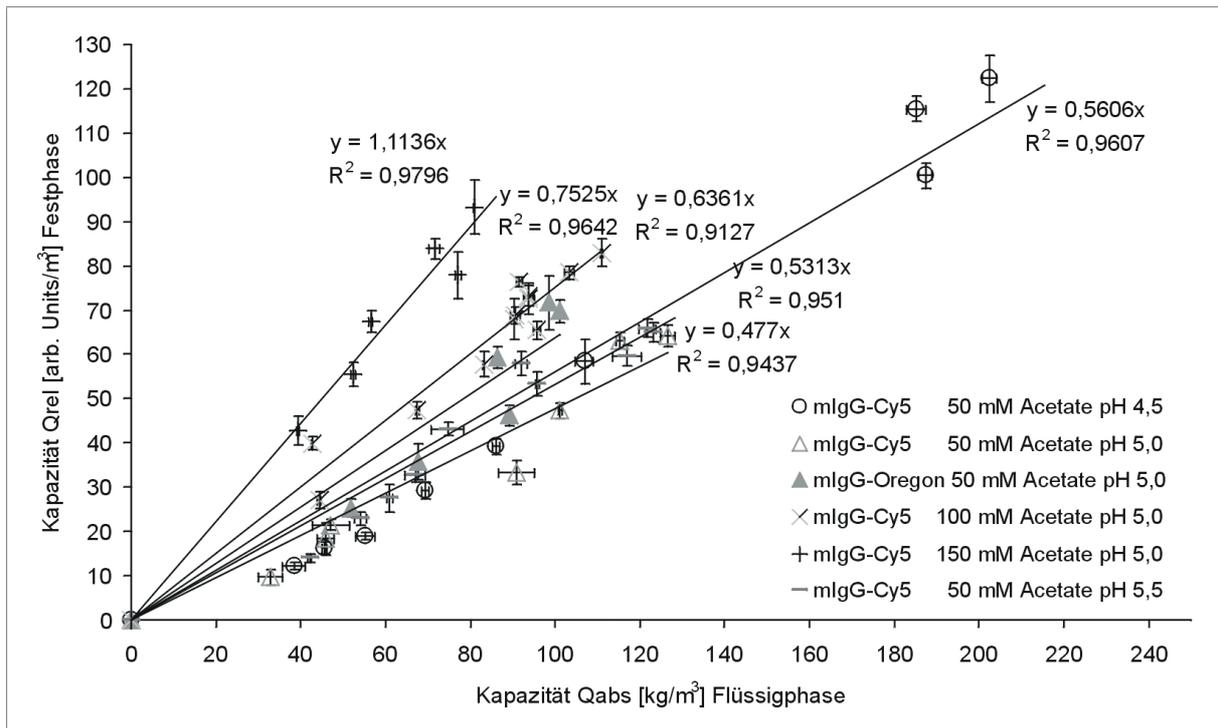


Abbildung 68: Auftragungen der relativen Kapazität Q_{rel} gegen die korrespondierenden absoluten Kapazitäten Q_{abs} der Adsorption von mIgG an SP-Sepharose FF unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ($n = 6$). Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichungen der bestimmten Größen von der Grundgesamtheit

Wiederum besteht für alle dargestellten Auftragungen eine, dem Rahmen der Fehlerbandbreite der Methode entsprechend, gute lineare Korrelation der beiden Kapazitätswerte Q_{rel} und Q_{abs} . Die mit Ausnahme des Experiments bei pH 4,5 beobachtete Akkumulation des Antikörpers in der Partikelmitte hat dabei keinen signifikanten Einfluss auf die lineare Korrelation der beiden Größen. Da die Einzelauftragungen der Kapazitäten gegen die Inkubationszeit einen weitgehend hyperbolischen Verlauf besitzen, ist dieses Akkumulationsphänomen also makroskopisch über Messung des Proteinkonzentrationsabfalls in der Flüssigphase nicht detektierbar und konnte nur durch konfokalmikroskopische Analyse aufgelöst werden. Flüssigphasedaten können deshalb zur Klärung des „Akkumulationsphänomens“ nicht herangezogen werden, da es sich dabei offensichtlich um komplexe, mikroskopische Transportvorgänge handelt.

4.4.3 Adsorptionsgleichgewichte von mIgG an SP-Sepharose FF

Die Abhängigkeit des Adsorptionsgleichgewichts des monoklonalen IgG2a-Antikörpers vom pH-Wert der Adsorptivlösung ist durch die entsprechenden Isothermen in Abbildung 69 gezeigt. Wiederum sind in der Abbildung die mathematischen Anpassungen der experimentellen Daten durch simulierte Isothermen der beiden Adsorptionsmodelle dargestellt.

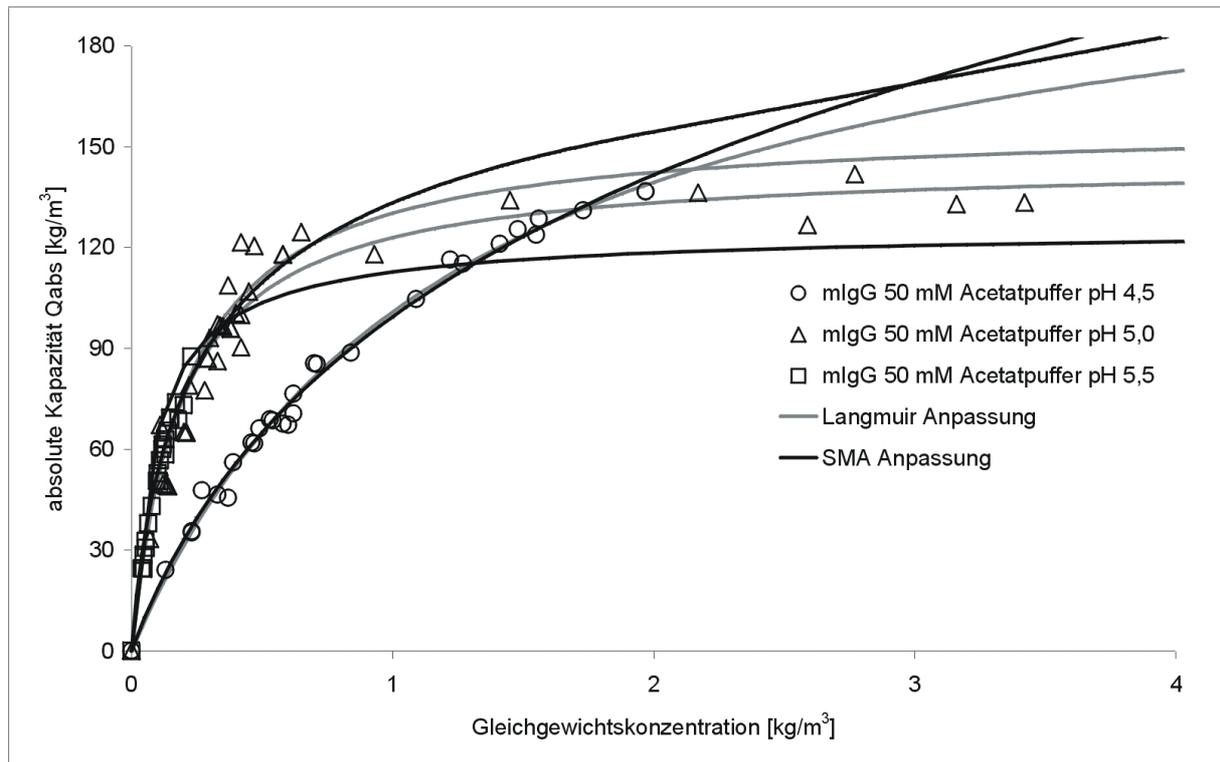


Abbildung 69: Isothermen der mIgG-Adsorption an SP-Sepharose FF in 50 mM Acetatpuffer bei den drei verschiedenen pH-Werten 4,5, 5,0 und 5,5. Die experimentellen Daten sind an das Langmuir- (grau) und an SMA-Modell (schwarz) angepasst

In 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 erhält man für die Adsorption des monoklonalen Antikörpers mit 226 kg/m^3 die größte Maximalkapazität Q_{max} im untersuchten pH-Bereich. Die Isotherme ist im Vergleich zur BSA-Isotherme bei pH 4,5 eher hyperbolisch geformt. Eine Erhöhung des pH-Wertes führt für die Adsorption des mIgG zu einer eher rechtwinkligen Isotherme und die Gesamtkapazitäten sind bei pH 5,0 und 5,5 im Vergleich zu pH 4,5 erniedrigt (s. Tab. 16). Die ermittelten Modellparameter bei den drei untersuchten pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5 sind in Tabelle 16 gegenübergestellt.

Tabelle 16: Bestimmte Parameter der Isothermen von mIgG in 50 mM Acetatpuffer bei den drei pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5. Zweiparameteranpassung nach Langmuir für eine Salzkonzentration und Dreiparameteranpassung nach Brooks und Cramer über drei Salzkonzentrationen (50 mM; 100 mM; 150 mM) zur Bestimmung der SMA-Parameter K_i ; ρ_i und z_i (Brooks und Cramer 1992)

pH-Wert	Langmuir-Modell		SMA-Modell		
	K_a [m^3/kg]	Q_{max} [kg/m^3]	K_i	ρ_i	z_i
4,5	0,8	225,8	2,60 E-07	219,54	1,00
5,0	5,5	145,6	174,12	253,42	1,16
5,5	4,9	157,0	5,61	128,15	2,49

Die ermittelten Assoziationskonstanten für die pH-Werte 5,0 und 5,5 liegen in der gleichen Größenordnung, während der K_a -Wert bei pH 4,5 aufgrund der hyperbolischen Isothermenform um rund das 5-fache erniedrigt ist (s. Tab. 16).

Die bestimmten K_i -Werte zeigen einen analogen Trend. An dieser Stelle sei erwähnt, dass für die Adsorption des monoklonalen Antikörpers bei pH 4,5 aufgrund begrenzter Verfügbarkeit an mIgG Gleichgewichtsdaten nur für eine Acetatpufferkonzentration generiert werden konnten. Die SMA-Anpassung erfolgte bei pH 4,5 deshalb nur an Daten einer Pufferkonzentration.

Eine Erklärung für diese unerwartete pH-Wertabhängigkeit der Adsorption des monoklonalen Antikörpers ist nicht trivial. Das Adsorptionsverhalten von BSA bei verschiedenen pH-Werten hat bereits gezeigt, dass der isoelektrische Punkt pI eines Proteins gegebenenfalls nur als Richtgröße zur Abschätzung des Adsorptionsverhaltens dienen kann. Aber der Isothermenverlauf der BSA-Adsorption bei verschiedenen pH-Werten scheint im Vergleich zur pH-Wertabhängigkeit von mIgG noch proportional zur Nettoladung des Proteinmoleküls zu sein. Velayudhan und Horvath haben sich bei der Modellierung von Adsorptionsprozessen mit dem Massenwirkungsgesetz, das auch die mathematische Grundlage des SMA-Modells darstellt, mit der Frage der pH-Wertabhängigkeit ausführlich auseinandergesetzt. Sie konnten formal zeigen, dass die Massenwirkungskonstante für die Adsorption eines geladenen Proteins theoretisch exponentiell vom pH-Wert der Lösung abhängen müsste (Velayudhan und Horvath 1988). Die gleichen Autoren führten aber auch an, dass dabei viele andere Faktoren, wie z.B. Konformationsänderungen des Proteins oder der Matrix und komplexe Donnan-Gleichgewichte vernachlässigt werden müssten, um eine Beschreibung der komplexen pH-Wertabhängigkeit zu gewährleisten (Velayudhan und Horvath 1988).

Neben hier beobachteten, unerwarteten Adsorptionsverhalten von mIgG bei verschiedenen pH-Werten, sind in der Literatur mehrere Adsorptionsgleichgewichte von Proteinen

beschrieben, bei denen der pH-Wert die Adsorption der Proteine nicht konstant moduliert. Zum Beispiel kommt es bei der Adsorption von BSA an die Anionenaustauscher Chitosan und DEAE-Dextran bei pH 6,9 in einem pH-Bereich von pH 5 bis pH 9 zu einer gesteigerten, maximalen Kapazität bei erniedrigtem K_a (z.B. (Yoshida und Kataoka 1989; Yoshida und Fujita 1999)).

Die Acetatpufferkonzentration wurde für das mlgG-Molekül aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Proteins in 10 mM Acetatpuffer nur in einem Bereich von 50 mM bis 150 mM variiert (vgl. 4.3.3.2). Die Abhängigkeit der Adsorption des monoklonalen Antikörpers von der Ionenstärke bei pH 5,0 ist in Abbildung 70 gezeigt.

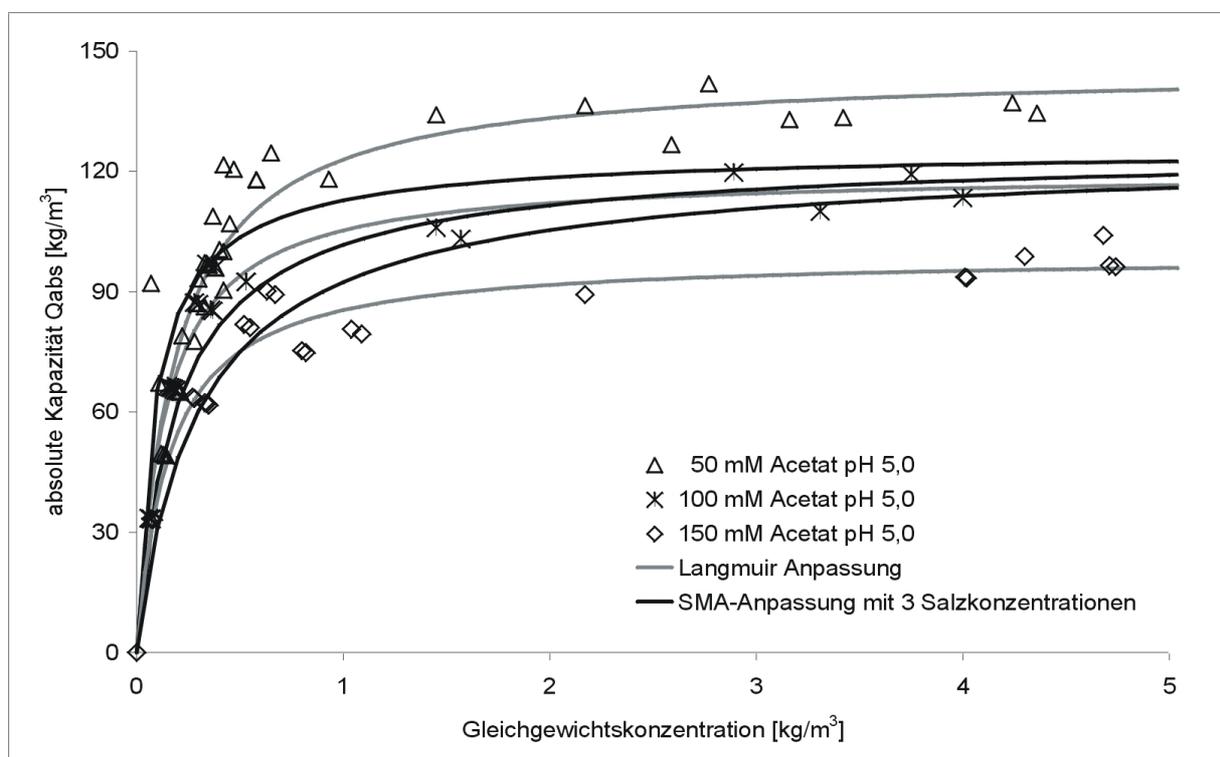


Abbildung 70: Isothermen der mlgG-Adsorption an SP-Sepharose FF in 50 mM Acetatpuffer bei den vier verschiedenen Pufferkonzentrationen 50 mM, 100 mM und 150 mM Acetat pH 5,0. Die experimentellen Daten sind an das Langmuir- und dem SMA-Adsorptionsmodell angepasst

Aus Abbildung 70 kann man entnehmen, dass die experimentellen Daten wiederum genauer durch das Langmuir-Adsorptionsmodell beschrieben sind. Abweichungen bei der Anpassung an das SMA-Modell ergeben sich vor allem im nicht linearen Sättigungsbereich der Isotherme bei hohen Gleichgewichtskonzentrationen c_{eq} .

In Tabelle 17 sind die ermittelten Langmuir- und SMA-Parameter gegenübergestellt.

Tabelle 17: Bestimmte Parameter der Isothermen von mlgG bei pH 5,0 in 50 mM; 100 mM und 150 mM Acetatpuffer. Zweiparameteranpassung nach Langmuir für eine Salzkonzentration und Dreiparameteranpassung nach Brooks und Cramer über drei Salzkonzentrationen (50 mM; 100 mM; 150 mM) zur Bestimmung der SMA-Parameter K_i ; ρ_i und z_i

Konz.	Langmuir-Modell		SMA-Modell		
[mM]	K_a [m ³ /kg]	Q_{\max} [kg/m ³]	K_i	ρ_i	z_i
50	5,5	145,6	174,12	253,42	1,16
100	7,7	119,8			
150	6,7	99,0			

Die Langmuir-Parameter in Tabelle 17 zeigen, dass die Form der Isotherme bei der mlgG-Adsorption nicht so stark von der Ionenstärke im untersuchten Bereich beeinflusst wird, wie die Adsorption von BSA bei den entsprechenden, experimentellen Bedingungen. Die maximale Kapazität fällt von 145 kg/m³ bei 50 mM auf ca. 100 kg/m³ bei einer Acetatpufferkonzentration von 150 mM, während die K_a -Werte im Rahmen der Fehlerbandbreite nahezu unverändert sind.

4.4.4 Gegenüberstellung und Zusammenfassung der mlgG-Daten

Analog der BSA-Daten sollen in diesem Abschnitt die kinetischen- und Gleichgewichtsdaten noch mal zusammengefasst werden, um eine gute Basis für die spätere Diskussion zu schaffen. Die zusammengefassten Daten sind in Tabelle 18 gegenübergestellt.

Der verwendeten analytischen Lösung des „Homogeneous Diffusion“ Adsorptionsmodells ist auch eine weitgehend irreversible Isotherme zugrundegelegt (s. 2.4.6.3). Zur Überprüfung der Gleichgewichtslage für die durchgeführten Batchadsorptionskinetiken wurde wiederum der R^* -Parameter mit einem Gültigkeitsbereich von 0 bis 0,3 ermittelt. Wie die berechneten Werte in Tabelle 18 verdeutlichen, erfolgten alle Batchadsorptionskinetiken des monoklonalen Antikörpers unter den unterschiedlichen, experimentellen Bedingungen bei ausreichend, irreversibler Gleichgewichtslage, bzw. im nahezu nicht-linearen Bereich der Isotherme.

Tabelle 18: Datengegenüberstellung Einkomponentenadsorptionsuntersuchung von mIgG an SP-Sepharose FF: „Homogeneous Diffusion“ und „Shrinking Core“ Transportkoeffizient $D_H(\text{eff})$ und $D_P(\text{eff})$, initiale Konzentration c_i , Langmuirparameter Q_{max} und K_a ; SMA-Konstanten K_i , ρ_i und z_i ; und Gleichgewichtsparameter R^* für die beschriebenen Adsorptionskinetiken und Isothermen

Experimentelle Bedingungen	Adsorptionskinetik		Adsorptionsisothermen					
	Homogeneous Diff. $D_H(\text{eff})$ u. Shrinking Core [$D_P(\text{eff})$]		Steric Mass Action			Langmuir*		R^*
mIgG2a	$D_H(\text{eff})$ [m^2/s]	c_i [kg/m^3]	K_i	ρ_i	z_i	Q_{max} [kg/m^3]	K_a [m^3/kg]	
50 mM pH 4,5	8,06E-15 [$D_P(\text{eff})$] 2,47E-13	3,81	2,60E-07	219,54	1,00	225,8	0,8	0,25
50 mM pH 5,0	2,11E-14	2,55	174,12	253,42	1,16	145,6	5,5	0,07
100 mM pH 5,0	8,19E-14	3,62				119,8	7,7	0,03
150 mM pH 5,0	1,61E-13	3,55				99,0	6,7	0,04
50 mM pH 5,5	7,67E-14	2,23	5,61	128,15	2,49	157,0	4,9	0,08

Die Daten in Tabelle 18 zeigen, dass eine Erhöhung des pH-Wertes und der Ionenstärke im Gegensatz zur BSA-Adsorption zu einer Zunahme der effektiven Diffusivität $D_H(\text{eff})$ führt.

Die Gleichgewichtsdaten weisen dagegen keine eindeutigen Trends auf und besitzen lokale Maxima. Die bestimmten Isothermenparameter der Isotherme bei pH 5,5 sind dabei nur bedingt aussagekräftig, da der Konzentrationsbereich der Gleichgewichtsdaten nur den linearen Teil der Isotherme beschreibt und aufgrund der geringen Löslichkeit des Antikörpermoleküls keine experimentellen Daten im nicht linearen Teil erzeugt werden konnten.

Insgesamt konnten bei der Einkomponentenadsorption der beiden Protein teilweise gravierende Veränderungen der Gleichgewichtslage beobachtet werden, die im nächsten Kapitel zusammen mit den kinetischen Daten nochmals ausführlich diskutiert werden (s. 5.3). Zusätzlich sei noch erwähnt, dass die ermittelte charakteristische Ladung z_i für BSA nahezu immer größer als die Anzahl der Kontaktpunkte von mIgG ist. Dieses Ergebnis deutet auf eine festere Bindung des BSA-Moleküls im Vergleich zur Adsorption des monoklonalen Antikörpers hin, die dem monoklonalen Antikörper auf der anderen Seite eine erhöhte Mobilität im Porennetzwerk des Adsorbentmaterials ermöglichen könnte. Auf das Zusammenspiel dieser Daten wird ausführlich in der Diskussion eingegangen (s. 5.3).

4.5 Zweikomponentenadsorption im Rührreaktor

4.5.1 Problematik

Ein weiteres Ziel des Projektes war die Ausweitung der konfokalmikroskopischen Analysen auf Mehrkomponentensysteme. Durch die Modifizierung von BSA und dem monoklonalen Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher spektraler Bandbreite sind die beiden Proteine getrennt voneinander im Konfokalmikroskop detektierbar.

Bei der Zweikomponentenadsorption kann neben dem pH-Wert und der Ionenstärke zusätzlich das initiale Konzentrationsverhältnis der beiden Proteine die Kinetik beeinflussen. Deshalb erfolgte bei der Untersuchung neben der Variation des pH-Wertes und der Acetatpufferkonzentration zusätzlich eine Änderung des molaren Konzentrationsverhältnis der beiden Proteine in der Flüssigphase. Zur Änderung der initialen Konzentrationen der Komponenten wurden Mischungen der beiden Proteine mit einem molaren Verhältnis von BSA zu mIgG von 1+4; 1+1 und 4+1 im thermostatisierten Glasreaktor mit SP-Sepharose FF inkubiert.

Für drei verschiedene pH-Werte wurden Adsorptionsisothermen mit Hilfe des SMA-Modells generiert.

Zusätzlich wurden Experimente in einer zellfreien Hybridoma-Kultur durchgeführt, um eine reale Prozesssituation zu simulieren.

4.5.2 Zweikomponentenadsorption im Acetatpuffersystem

4.5.2.1 Einfluss des pH-Wertes auf die parallele Adsorption von BSA und mIgG

Ausgehend von einem equimolarem Konzentrationsverhältnis der beiden Proteine bei pH 4,5 erfolgte die Zugabe eines definierten Volumens SP-Sepharose FF in die gerührte Lösung im thermostatisierten Glasreaktor (s. Tab. 19). In Abbildung 71 sind exemplarisch Konfokalbilder von SP-Sepharose FF Partikeln dargestellt, die zu verschiedenen Zeiten, während der Inkubation des Trägers mit den beiden Proteinen unter diesen Bedingungen, erzeugt wurden.

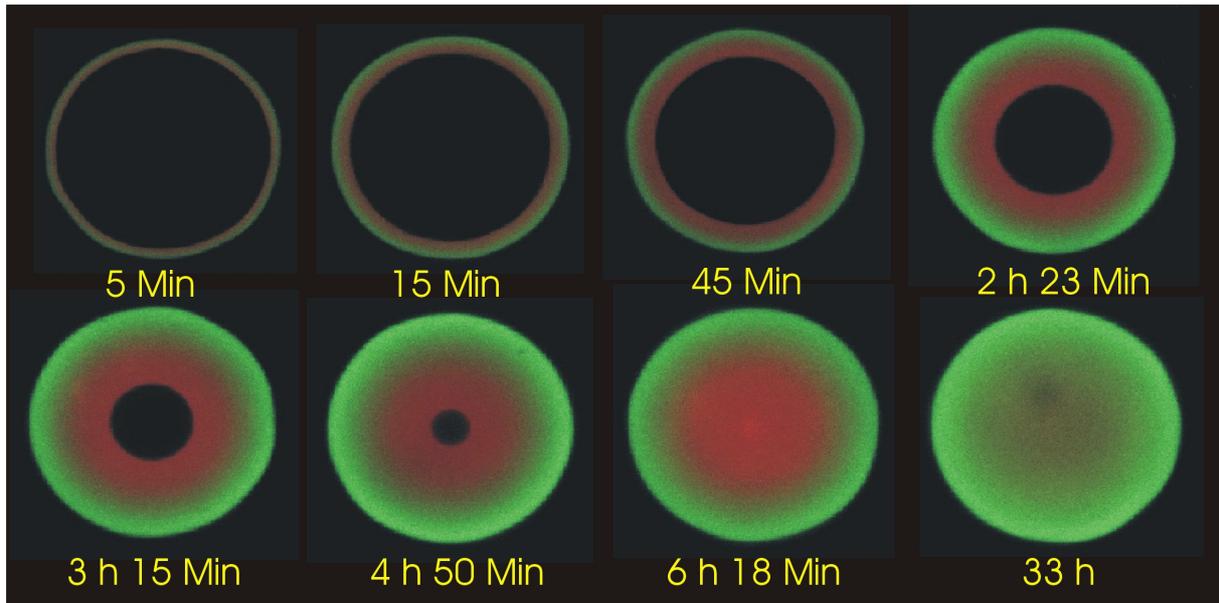


Abbildung 71: Konfokalbilder von SP-Sepharose FF Partikeln im Verlauf einer Inkubation mit einer equimolaren Mischung von mIgG (rot) und BSA (grün) in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5

Analog zu den Einkomponentenadsorptionen waren auch bei allen durchgeführten Zweikomponentenadsorptionen die Messparameter im Konfokalmikroskop so gewählt, dass nur das gebundene, aufkonzentrierte Protein detektierbar war. Das Fluoreszenzsignal aus der Proteinlösung erzeugte kein Hintergrundsignal in den Konfokalbildern. Die Konfokalbilder verdeutlichen, wie die beiden Proteine wiederum von der Außenseite her das SP-Sepharose FF Partikel mit der Zeit absättigen (vgl. Abb. 51). Ein Unterschied im Adsorptionsverhalten des monoklonalen Antikörpers (rot) und BSA (grün) ergibt sich aus den Bildern im Verlauf der Adsorption in der Weise, dass mit zunehmender Adsorptionszeit mIgG mehr in den inneren Regionen des Partikels zu finden ist, während BSA vorwiegend an den äußeren Regionen der SP-Sepharose FF bindet. Dieses unerwartete Adsorptionsverhalten war auch schon mit dem in früheren Experimenten verwendeten polyklonalen Immunglobulin G (hIgG) beobachtet worden und ist mit der gängigen Transporttheorie von Molekülen in porösen Strukturen nicht zu erklären. Das schwerere und vermeintlich größere mIgG-Molekül (M_w ca. 147.000 Da) wird im Adsorbentmaterial schneller transportiert, als das kleinere BSA-Molekül (M_w ca. 67.000 Da) (vgl. Abb. 44). Die Konfokalbilder in Abbildung 71 deuten zusätzlich daraufhin, dass diese Proteinverteilung offensichtlich durch eine unterschiedliche Kinetik der beiden Proteine unter diesen Bedingungen zu Stande kommt. Das mIgG-Molekül scheint im Porengerüst der Agarose in 50 mM Acetatpuffer bei pH 4,5 mobiler zu sein als BSA.

Weiterhin fällt bei der Betrachtung der beiden letzten Konfokalbilder der Serie auf, dass die Intensität von BSA (grün) nach einer Inkubationszeit von 33 h, im Vergleich zu der Aufnahme nach 6 h und 18 Minuten, weiter zugenommen hat, während das Signal des Cy5 Farbstoffes bedingt durch die Bindung des mIgG-Antikörpers wieder zu sinken scheint. Einen genaueren

Aufschluss darüber ergeben die korrespondierenden Fluoreszenzprofile, die in Abbildung 72 über dem halben Partikeldurchmesser aufgetragen sind.

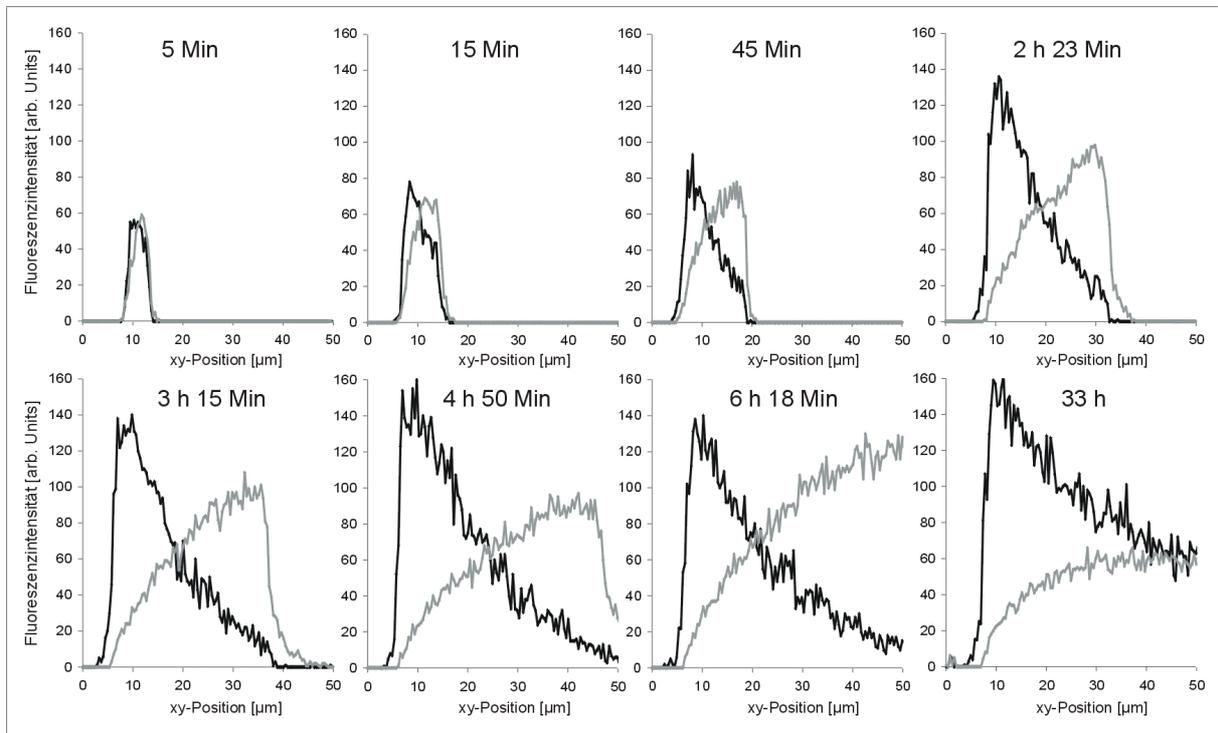


Abbildung 72: Fluoreszenzintensitätsprofile der Zweikomponentenadsorption von mIgG (grau) und BSA (schwarz) über dem halben Partikeldurchmesser im equimolaren Konzentrationsverhältnis in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5. Die Profile resultieren aus den Konfokalbildern in Abbildung 71

Die Auftragungen verdeutlichen die Entwicklung des Adsorptionsprofils für die beiden Proteine mit der Zeit. Die Menge an gebundenem BSA (schwarz) erhöht sich im Partikel bis zu einer Inkubationszeit von 2 h und 23 Minuten vorwiegend an den äußeren Randregionen des Partikels. Nur ein ganz geringer Teil dringt in tiefere Regionen des Porennetzwerks der SP-Sepharose vor (s. Abb. 72). Im Falle des monoklonalen Antikörpers (grau) ist das Adsorptionsverhalten genau umgekehrt. Die mIgG-Moleküle binden über die SP-Liganden verstärkt an den inneren Agarosefasern im Partikel. Die Konzentrationsverläufe in den Profilen verdeutlichen sehr gut die Konkurrenz um die SP-Liganden, in den einzelnen Regionen im Agarosenetzwerk des Partikels.

Die Intensitätsprofile der beiden letzten Konfokalbilder im Versuchszeitraum bestätigen die vorher gemachte Annahme, dass das Antikörpermolekül offensichtlich unter diesen Bedingungen mit zunehmender Dauer der Inkubation vom BSA verdrängt wird. Nach einer Inkubationszeit von 6 h und 18 Minuten hat die Adsorptionsfront des monoklonalen Antikörpers die Partikelmitte erreicht und das Partikel scheint mit Protein gesättigt zu sein. Nach 33 h ist aber das Signal im Vergleich dazu gerade in der Partikelmitte wieder erniedrigt,

während die Fluoreszenzintensität des BSA-Konjugates sich in der Mitte des Partikels weiter erhöht.

Die Fluoreszenzintensitätsprofile, wie z.B. die in Abbildung 72 gezeigten Intensitätsverläufe werden in der Folge bei der weiteren Auswertung zur Berechnung der relativen Kapazitäten Q_{rel} herangezogen. Die ermittelten Q_{rel} -Werte dieser Adsorptionskinetik sind in Abbildung 73 gegen die Zeit aufgetragen.

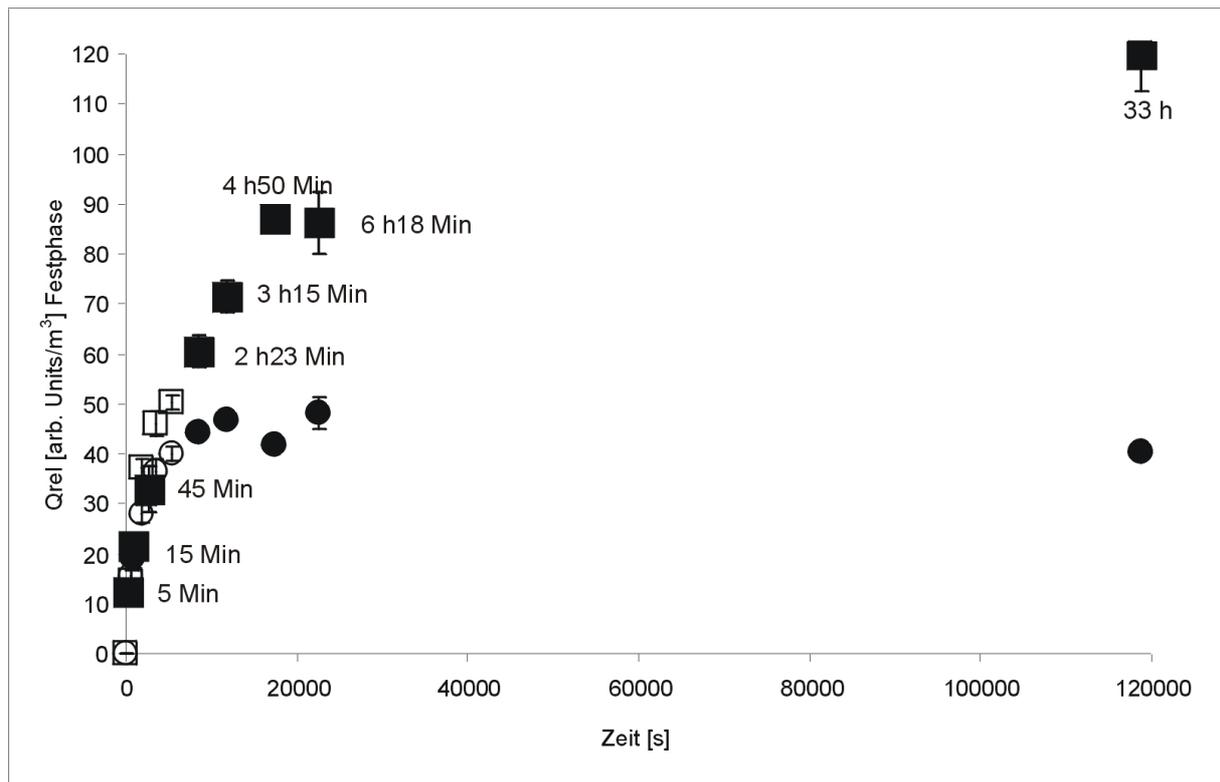


Abbildung 73: Zeitverlauf der relativen Kapazitäten Q_{rel} von BSA (Quadrate) und mIgG (Kreise) bei Adsorption in 50 mM Acetatpuffer an SP-Sepharose FF. Die Kapazitätswerte zu den Abb. 71 und Abb. 72 gezeigten Daten sind ausgefüllt dargestellt

Der abgebildete Verlauf der relativen Kapazitäten Q_{rel} über die Zeit unterstreicht noch einmal die aus den Konfokalbildern und Profilen gemachten Annahmen und nicht zuletzt den Verdrängungseffekt von mIgG durch BSA-Moleküle unter diesen Bedingungen. Nach einem Maximalwert nach 6 h und 18 Minuten sinkt die relative Kapazität von mIgG wieder, während Q_{rel} von BSA weiter ansteigt. Der Effekt ist außerhalb der Fehlerbandbreite der bestimmten Q_{rel} -Werte und ist deshalb signifikant. Zusätzlich konnte auch aus den korrespondierenden Proben der Flüssigphase ein vergleichbarer Kurvenlauf bestimmt werden (s. dazu Anhang E). Analog zur Einkomponentenadsorption sollte sich auch bei der konfokalmikroskopischen Analyse von zwei Proteinen aufgrund der Massenbilanz im experimentellen System ein linearer Zusammenhang zwischen den aus Fest- und Flüssigphase berechneten relativen und absoluten Kapazitätswerten $Q_{rel}(t)$ und $Q_{abs}(t)$ ergeben. In Abbildung 74 ist exemplarisch

für das beschriebene Zweikomponentenexperiment in 50 mM Acetatpuffer bei pH 4,5 diese lineare Abhängigkeit der beiden Größen gezeigt.

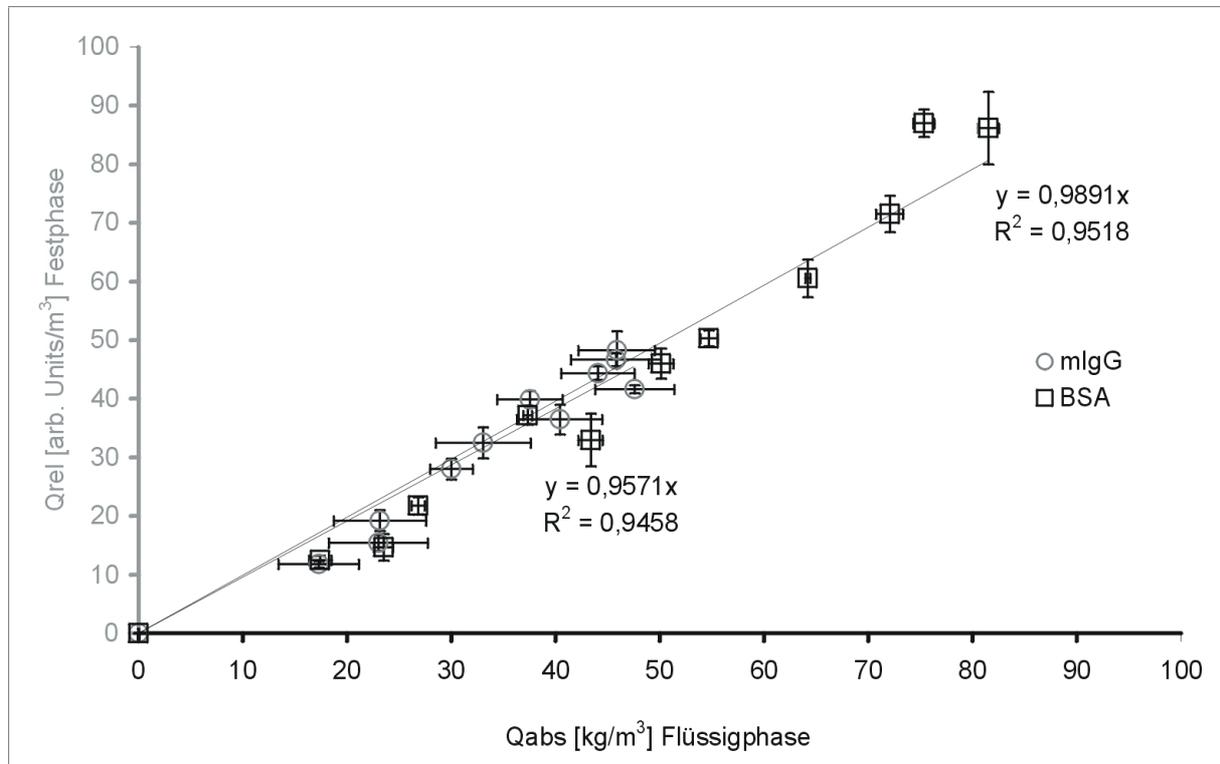


Abbildung 74: Paritätsplot der Zweikomponentenadsorption von BSA und mIgG an SP-Sepharose FF in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5. Die Fehlerbalken bezeichnen die absoluten Standardabweichungen der relativen (Q_{rel} : $n = 6$) und absoluten (Q_{abs} : $n = 2$) Kapazitäten

Im Rahmen der Fehlerbandbreite der beiden experimentell bestimmten Größen ist eine gute Korrelation der Werte zu verzeichnen. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die konfokalmikroskopische Analyse auch die Visualisierung und Quantifizierung der parallelen Adsorption von zwei unterschiedlichen Proteinen ermöglicht und die gezeigten Fluoreszenzintensitätsprofile die reale Konzentrationsverteilung im Adsorberpartikel während der Bindung von zwei Komponenten abbilden.

Die soeben ausführlich beschriebene Zweikomponentenkinetik zeigt eindeutig, dass bei der parallelen Adsorption von zwei Proteinen, neben der Gesamtsättigung des Adsorberpartikels auch Verdrängungseffekte auftreten, die bei der weiteren mathematischen Beschreibung berücksichtigt werden müssten. Die Inkubationszeiten der Kinetik zeigen, dass die Verdrängung des monoklonalen Antikörpers mit der Zeit ein sehr langsamer Prozess ist. Nahezu alle mathematischen Adsorptionsmodelle sind durch einen Gleichgewichtszustand, normalerweise über die Adsorptionsisotherme definiert. Ein eindeutiger Gleichgewichtszustand zwischen Flüssig- und Festphase ist bei einem so langsamen Verdrängungsprozess, wie dem gezeigten nicht eindeutig bestimmbar, so dass lediglich ein

„Pseudogleichgewicht“ im betrachteten Untersuchungszeitraum definiert werden kann. Eine Ausweitung des Versuchszeitraumes unter den experimentellen Bedingungen würde wahrscheinlich keine Informationen liefern, die dem tatsächlichen Gleichgewichtszustand näher kommt, da die Proteinmoleküle bei den betrachteten pH-Werten von 4,5 bis 5,5 jeweils nur eine begrenzte Stabilität besitzen.

Die heterogene Verteilung der beiden Proteine wurde für die beiden molekularen Spezies bei allen experimentellen Bedingungen beobachtet, und ist so mit keinem in der Literatur beschriebenen Adsorptionsmodell vorhersagbar. Die experimentellen Daten sind folglich nicht mit einfachen Modellen komplett beschreibbar. Deshalb wurde zum Vergleich der Adsorptionsgeschwindigkeiten der beiden Proteine unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen als charakteristische Größe eine charakteristische molare Adsorptionsrate $AUR_{300}(D)$ in mol/s wie unter 3.6.5.3 beschrieben berechnet. Dieser Wert ermittelt sich aus der geeichten absoluten Kapazität im Zusammenhang mit der spezifischen Eindringtiefe D aus dem Fluoreszenzintensitätsprofil nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten (300 s) und wurde jeweils für beide Proteine bestimmt.

In Abbildung 75 sind die bestimmten molaren Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ und Kapazitäten Q_{abs}^{eq} des beschriebenen Experimentes bei pH 4,5 zum Vergleich, den ermittelten Werten bei den pH-Werten 5,0 und 5,5 gegenübergestellt.

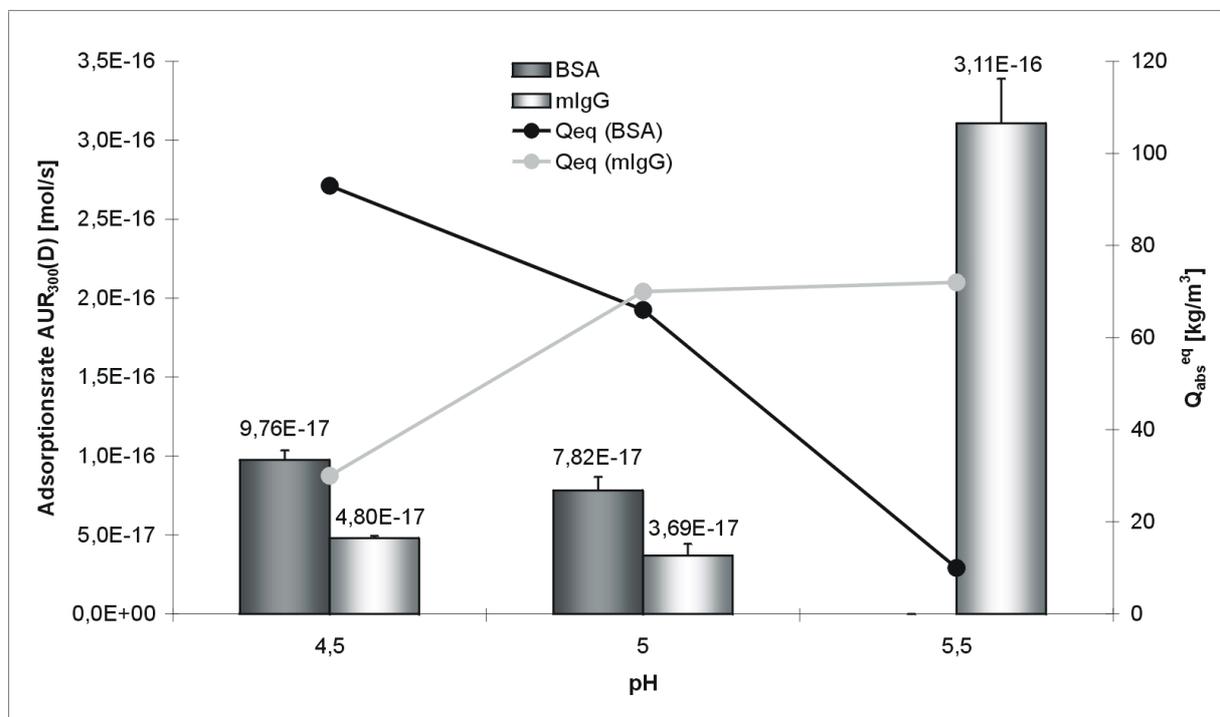


Abbildung 75: Molare Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ des BSA und mlgG in 50 mM Acetatpuffer bei den pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5

Die beiden Proteine lagen bei den Batchadsorptionskinetiken, die analog der Inkubation bei pH 4,5 zur Untersuchung des Einflusses vom pH-Wert bei pH 5,0 und 5,5 durchgeführt

wurden auch in einem nahezu equimolaren Konzentrationsverhältnis zu Beginn der Inkubation vor. Die experimentellen Daten sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Übersicht über die experimentellen Daten der Zweikomponentenexperimente im 50 mM Acetatpuffer bei pH 4,5 bis 5,5. Neben den Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ und den Kapazitäten Q_{abs}^{eq} sind die Leitfähigkeiten und initialen Konzentrationen c_i zum Vergleich angegeben

Exp. Bed. 50 mM Acetat- puffer	Leitfähig- keit	(BSA) c_i	(mIgG) c_i	BSA $AUR_{300}(D)$	mIgG $AUR_{300}(D)$	BSA Q_{abs}^{eq}	mIgG Q_{abs}^{eq}
	[mS/cm]	[kg/m ³] [10 ⁻⁸ M]	[kg/m ³] [10 ⁻⁸ M]	[mol/s]	[mol/s]	[kg/m ³]	[kg/m ³]
pH 4,5	1,67	1,23 1,81	2,66 1,81	9,76E-17	4,80E-17	93	30
pH 5,0	2,57	1,15 1,69	2,48 1,69	7,82E-17	3,69E-17	66	70
pH 5,5	3,22	1,05 1,54	2,29 1,55	-	3,11E-16	10	72

Weitere Angaben zu den beschriebenen Experimenten befinden sich im Anhang E.

Abbildung 75 verdeutlicht, dass mit einer Zunahme des pH-Werts auf 5,0 die $AUR_{300}(D)$ -Werte von BSA und des monoklonalen Antikörpers leicht abfallen. Im Falle von mIgG ist der Abfall aber nicht signifikant und bewegt sich im Rahmen der Fehlerbandbreite.

Bei einem pH von 5,5 wurden keine Messeinstellungen am Mikroskop gefunden, die eine Detektion von BSA im Partikel während des gesamten Untersuchungszeitraumes ermöglichen. Folglich konnte unter diesen Bedingungen auch keine $AUR_{300}(D)$ für BSA bestimmt werden. Auffallend ist jedoch, dass die Adsorptionsrate des monoklonalen Antikörpers bei pH 5,5 im Vergleich zu den anderen pH-Werten beträchtlich erhöht ist (s. Abb. 75).

Ein Blick auf die absoluten Proteinkapazitäten Q_{abs}^{eq} , die unter den jeweiligen Bedingungen im Untersuchungszeitraum von 18 h bis 33 h erzielt wurden zeigt, dass die mIgG-Kapazität durch eine Erhöhung des pH-Wertes von 4,5 auf 5,5 von 30 kg/m³ auf 72 kg/m³ steigt, während die korrespondierende, absolute BSA-Kapazität von rund 90 kg/m³ auf 10 kg/m³ sinkt (s. Tab. 19). In der Flüssigphase konnte im Gegensatz zur Detektion mit dem Konfokalmikroskop auch bei pH 5,5 eine absolute Kapazität für das BSA bestimmt werden. Dieser Kapazitätswert zeigt folglich die Detektionsgrenzen der konfokalmikroskopischen Analyse unter den gewählten Bedingungen auf, wenn mit einer Verdünnung von 1:10 mit unmarkiertem Protein gearbeitet wird.

Ein Vergleich der Ergebnisse der beiden Proteine zeigt, dass analog zu den korrespondierenden Einkomponentenexperimenten, eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5,5 die Kinetik des monoklonalen Antikörpers zu beschleunigen scheint, während die Mobilität von BSA im Adsorberpartikel mit zunehmendem pH-Wert sinkt (s. 4.3.2.1 u. 4.3.3.1). Bei pH 5,5 ist die mIgG-Adsorption gegenüber der Bindung des BSA-Moleküls an die SP-Liganden der Matrix so stark begünstigt, so dass nahezu keine Bindungsplätze für BSA unter diesen Bedingungen mehr vorhanden sind, bzw. die Bindungsaffinität des Proteins sehr ungünstig ist.

4.5.2.2 Einfluss der Ionenstärke auf die parallele Adsorption von BSA und mIgG

Der Einfluss der Ionenstärke wurde analog zu den Einkomponentenadsorptionen durch Erhöhung der Acetatpufferkonzentration von 50 mM bis 150 mM untersucht. Als weitere qualitative Information zu den Experimenten ist zu erwähnen, dass bei allen drei untersuchten Acetatpufferkonzentrationen der monoklonale Antikörper genau wie bei der Adsorption bei pH 4,5 in den inneren Regionen des Partikels detektiert wurde, während BSA vorwiegend außen gebunden hatte (vgl. Abb. 71). Lediglich die Stärke des Ringes nahm mit zunehmender Konzentration ab, bis schließlich bei 150 mM BSA nur noch ein schmaler Ring rund um den Partikel detektiert wurde, der ansonsten mit mIgG gefüllt war (nicht gezeigt). Nähere experimentelle Daten und die Ergebnisse zu den im Folgenden beschriebenen Experimenten sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Die Auftragungen der relativen und absoluten Kapazitäten Q_{rel} und Q_{abs} sind wiederum im Anhang E aufgeführt.

Tabelle 20: Übersicht über die experimentellen Daten der Zweikomponentenexperimente in Acetatpuffer bei pH 5,0 (50 mM; 100 mM u. 150 mM). Neben den Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ und den Kapazitäten Q_{abs}^{eq} sind die Leitfähigkeiten und initialen Konzentrationen c_i zum Vergleich angegeben

Exp. Bed.	Leitfähigkeit	(BSA) c_i	(mIgG) c_i	BSA $AUR_{300}(D)$	mIgG $AUR_{300}(D)$	BSA Q_{abs}^{eq}	mIgG Q_{abs}^{eq}
Acetatpuffer pH 5,0	[mS/cm]	[kg/m ³] [10 ⁻⁸ M]	[kg/m ³] [10 ⁻⁸ M]	[mol/s]	[mol/s]	[kg/m ³]	[kg/m ³]
50 mM	2,57	1,15 1,69	2,48 1,69	7,82E-17	3,69E-17	66	70
100 mM	4,93	1,19 1,76	2,58 1,76	4,85E-17	7,81E-17	34	56
150 mM	7,23	1,01 1,48	2,18 1,48	5,56E-18	2,32E-16	25	70

Abbildung 76 stellt die ermittelten $AUR_{300}(D)$ -Werte und Kapazitäten Q_{abs}^{eq} für beide Proteine bei den drei verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen, bzw. Ionenstärken gegenüber.

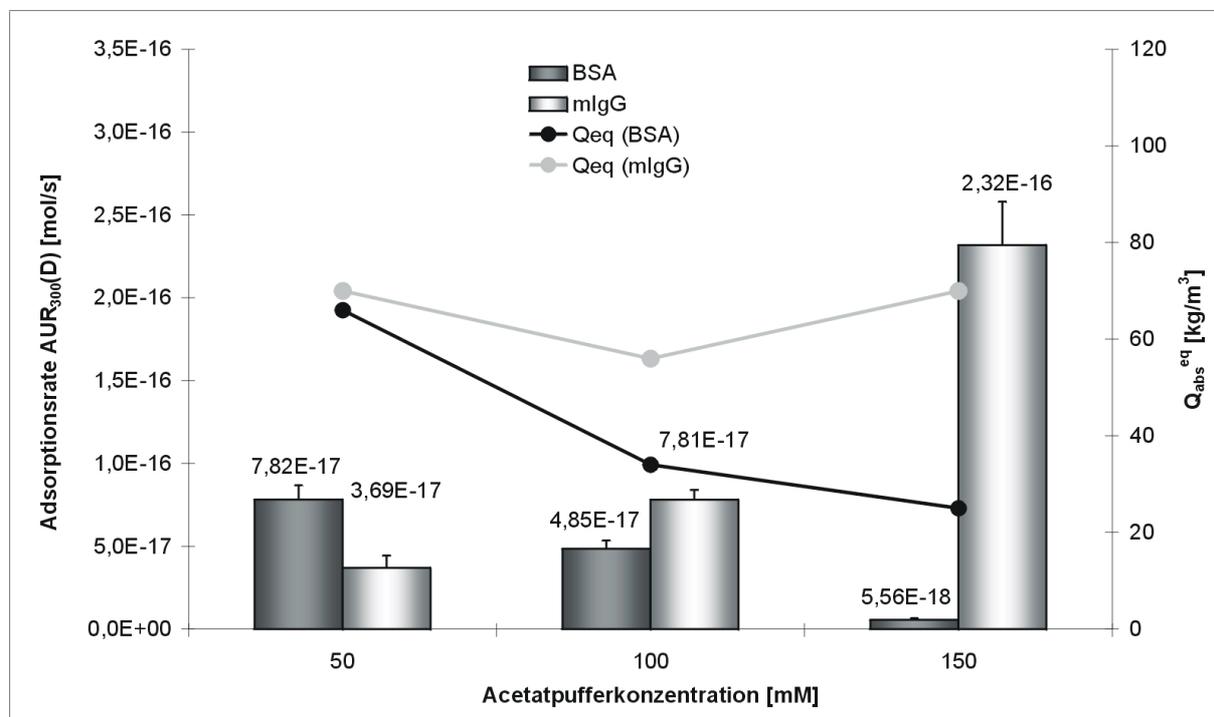


Abbildung 76: Molare Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ des BSA und mlgG bei den drei verschiedenen Acetatpufferkonzentrationen 50 mM; 100 mM und 150 mM

Eine Erhöhung der Ionenstärke im umgebenden Milieu hat bei einem konstanten pH-Wert von 5,0 offensichtlich einen gegensätzlichen Effekt auf die molaren Adsorptionsraten der beiden Proteine. Während die $AUR_{300}(D)$ -Werte für BSA mit zunehmender Acetatpufferkonzentration konstant abnehmen, steigen die korrespondierenden Werte des monoklonalen Antikörpers stark an.

Eine Erhöhung der Acetatpufferkonzentration hat nahezu keine Auswirkungen auf die absolute Kapazität Q_{abs}^{eq} des monoklonalen Antikörpers im Untersuchungszeitraum, die sich mit 56-70 kg/m³ im Rahmen der Fehlerbandbreite relativ konstant verhält. Die BSA-Kapazität Q_{abs}^{eq} fällt mit zunehmender Konzentration des Acetatpuffers von ca. 70 kg/m³ auf 25 kg/m³ bei 150 mM ab. Der reduzierte Fluss geht folglich bei BSA auch mit einer Kapazitätsminderung einher, während die mlgG-Kapazität von der Ratenänderung unbeeinflusst zu sein scheint. An dieser Stelle sei aber auch nochmals angeführt, dass die absoluten Kapazitäten der Zweikomponentenexperimente nicht so ohne weiteres vergleichbar sind, da eine Verdrängung des Antikörpers durch das BSA Molekül unter diesen Bedingungen mehr oder weniger stark ausgeprägt ist und man nicht so einfach beurteilen kann, wie „weit“ man unter den experimentellen Bedingungen noch vom realen

Adsorptionsgleichgewicht entfernt ist. Wiederum bestätigen sich die bei der Einkomponentenadsorption erhaltenen gegensätzlichen Trends der beiden Proteine. Die Adsorptionsrate des BSA-Moleküls bei pH 5,0 scheint im untersuchten Konzentrationsbereich, bei einer Erhöhung der Ionenstärke zu sinken, während die Mobilität des mlgG eher positiv beeinflusst wird.

4.5.2.3 Einfluss des Konzentrationsverhältnisses auf die parallele Adsorption von BSA und mlgG

Bei der Untersuchung eines möglichen Einflusses des Konzentrationsverhältnisses wurden die initialen Konzentrationen der beiden Proteine in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 bei drei verschiedenen Ansätzen geändert. Jedes Protein lag in verschiedenen Ansätzen neben einem equimolaren Ansatz jeweils noch im vierfachen, molaren Überschuss vor (s. Tab. 21). Auf die interne Proteinverteilung im Adsorberpartikel im Verlauf der Adsorption an die SP-Sepharose FF Partikel hatte das Ausgangskonzentrationsverhältnis nur einen bedingten Einfluss. Wiederum war BSA in den äußeren Regionen des Partikels gebunden, während das mlgG-Molekül vornehmlich innen detektiert wurde. Die näheren experimentellen Konditionen und erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 21 zusammengestellt.

Tabelle 21: Übersicht über die experimentellen Daten der Zweikomponentenexperimente in Acetatpuffer bei pH 5,0 (Konzentrationsverhältnisse BSA/mlgG 4+1; 1+1; 1+4). Neben den Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ und den Kapazitäten Q_{abs}^{eq} sind die Leitfähigkeiten und initialen Konzentrationen c_i zum Vergleich angegeben

Exp. Bed.	Leitfähigkeit	(BSA) c_i	(mlgG) c_i	BSA $AUR_{300}(D)$	mlgG $AUR_{300}(D)$	BSA Q_{abs}^{eq}	mlgG Q_{abs}^{eq}
Acetatpuffer 50 mM; pH 5,0 (BSA/mlgG)	[mS/cm]	[kg/m ³] [10 ⁻⁸ M]	[kg/m ³] [10 ⁻⁸ M]	[mol/s]	[mol/s]	[kg/m ³]	[kg/m ³]
4+1	2,57	2,57 3,78	1,39 0,95	2,07E-16	3,83E-17	120	13
1+1	2,57	1,15 1,69	2,48 1,69	7,82E-17	3,69E-17	66	70
1+4	2,57	0,42 0,61	3,60 2,46	6,51E-18	4,20E-17	23	90

Die ermittelten relativen und absoluten Kapazitäten Q_{rel} und Q_{abs} zu diesen Experimenten sind im Anhang E der Arbeit aufgeführt.

In Abbildung 77 sind die ermittelten Adsorptionsraten und Kapazitäten $Q_{\text{abs}}^{\text{eq}}$ bei den drei verschiedenen, initialen Konzentrationsverhältnissen graphisch gegenübergestellt.

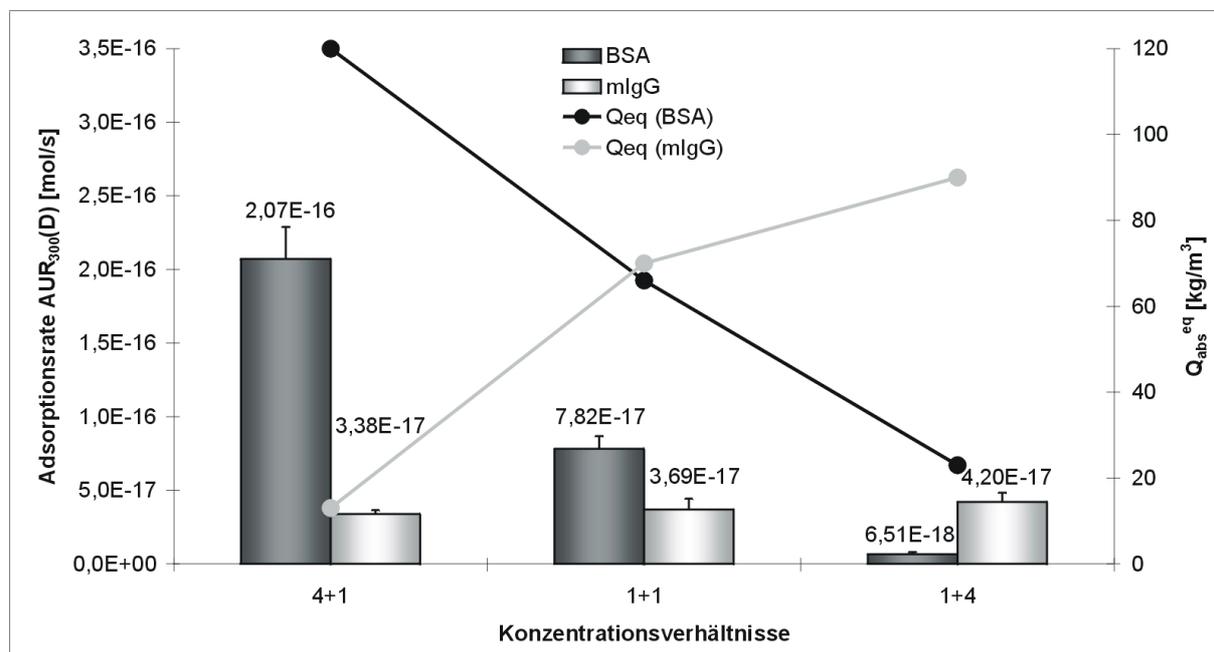


Abbildung 77: molare Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ des BSA und mlgG bei den drei verschiedenen molaren Konzentrationsverhältnissen von 4+1; 1+1 und 1+4

Die Graphik verdeutlicht, dass die $AUR_{300}(D)$ -Adsorptionsrate des BSA-Moleküls in Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis mit zunehmender Konzentration des monoklonalen Antikörpers stark abfällt. Im Gegensatz dazu erhöht sich die Adsorptionsrate des monoklonalen Antikörpers aber nur unwesentlich, bzw. im Rahmen der Fehlerbandbreite der Bestimmung kann man eher von Stagnation sprechen.

Für eine Konkurrenz der beiden Proteine um die SP-Liganden des Trägers bedeutet dies, dass die mlgG-Adsorption von der Anwesenheit von BSA im untersuchten Konzentrationsbereich weitgehend unbeeinflusst ist, während die BSA-Adsorption bereits durch die Anwesenheit kleiner Konzentrationen der mlgG-Moleküle empfindlich gestört ist. Eine andere Möglichkeit der Erklärung der gefundenen Konzentrationsabhängigkeiten bei Anwesenheit des anderen Proteins könnte sich durch einen Unterschied im Transportmechanismus innerhalb des Porennetzwerkes des porösen Trägers ergeben, da nur die Adsorptionsgeschwindigkeit von BSA sichtlich von der initialen Konzentration der Spezies abzuhängen scheint. Diesem Ansatz wird zur Klärung jedoch in den unter 4.6 beschriebenen Multicoloranalysen ausführlich nachgegangen (s. 4.6).

Die absoluten Kapazitäten $Q_{\text{abs}}^{\text{eq}}$ für BSA sinken mit zunehmender Konzentration des Antikörpers von 120 kg/m^3 auf schließlich 23 kg/m^3 bei vierfachem, molarem Überschuss des Antikörpers. Die korrespondierende Kapazität des monoklonalen Antikörpers steigt hingegen

von 13 kg/m^3 bei vierfachem Überschuss des BSA-Moleküls auf 90 kg/m^3 an (s. dazu auch Tab. 21).

4.5.3 Experimente im Hybridomaüberstand

In einer weiterführenden Studie wurden im Rahmen dieser Arbeit auch versucht eine reale Prozesssituation mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie zu visualisieren und quantifizieren. Die Abtrennung von BSA bei der Aufarbeitung monoklonaler Antikörper aus Hybridomazellkulturüberständen mittels Kationenaustauschchromatographie ist ein häufig vorliegendes Problem. Durch die Visualisierung der Adsorption dieser beiden Proteine in „realem“ Hybridomaüberstand können neue Erkenntnisse über das Adsorptionsverhalten gewonnen werden, die bei der Optimierung von Aufarbeitungsprozessen eventuell helfen können.

Als molekulare Marker kamen in den Experimenten bei den drei verschiedenen pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5 Cy5 für den monoklonalen Antikörper und AlexaTM488 für BSA in Form der entsprechenden Proteinkonjugate zum Einsatz. Der Hybridomaüberstand, der in den Experimenten zur Reduzierung der Leitfähigkeit 1:2 mit Acetatpuffer verdünnt wurde, enthält neben den beiden zugesetzten fluoreszenzmarkierten Spezies noch andere Proteine. Diese Proben können also streng genommen nicht mehr als reine Zweikomponentenadsorptionssysteme gesehen werden. Die anderen Proteine können mit dem fluoreszenzmarkierten BSA und mIgG um die Bindungsplätze an der Matrix konkurrieren und Kapazität in den SP-Sepharose FF Partikeln beanspruchen. Deshalb war es umso interessanter, das Adsorptionsverhalten der beiden Spezies mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie unter diesen Bedingungen zu untersuchen.

In Abbildung 78 sind exemplarisch Konfokalbilder dargestellt, die zu verschiedenen Zeiten im Verlauf der Inkubationen bei den drei pH-Werten, von Proben der SP-Sepharose FF Partikel aufgenommen wurden.

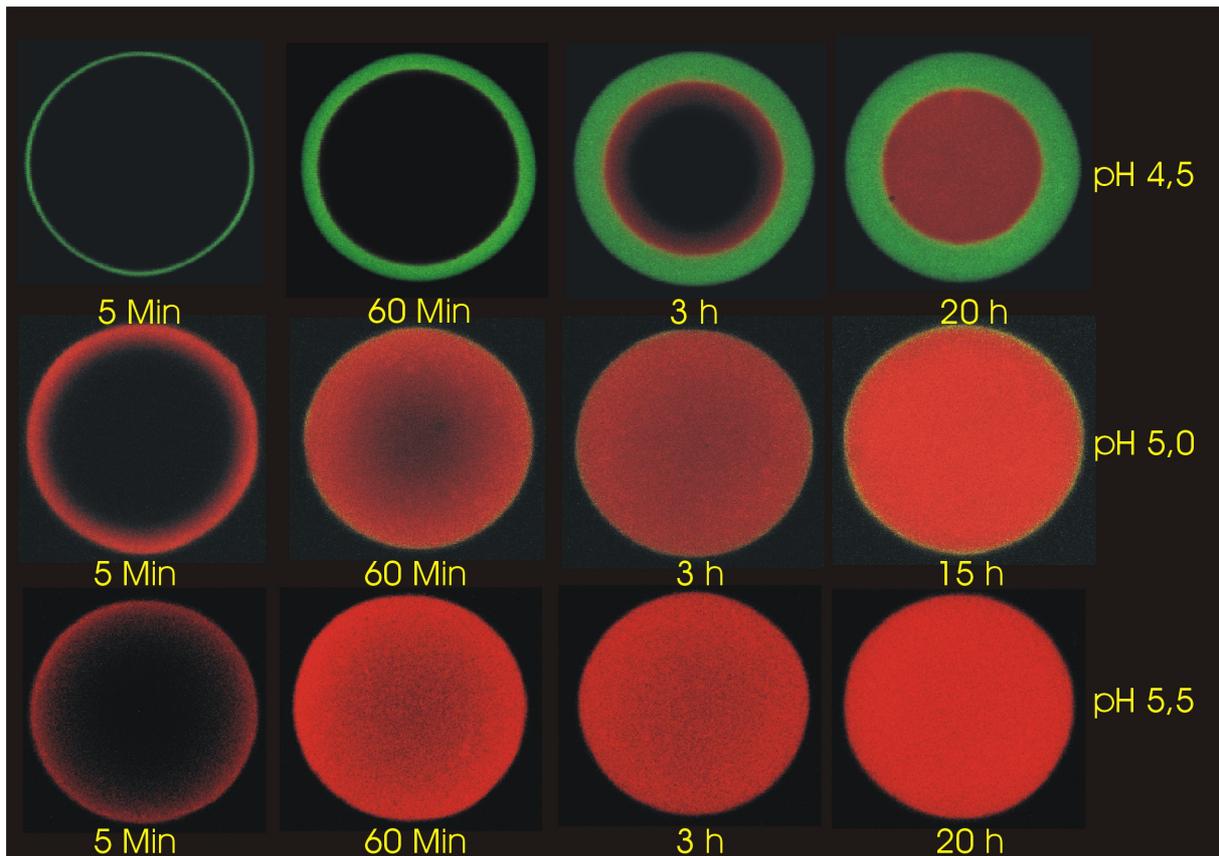


Abbildung 78: Exemplarische Konfokalbilder der Inkubationen von SP-Sepharose FF Partikeln mit Hybridomäüberständen bei drei verschiedenen pH Werten (4,5; 5,0 und 5,5). BSA-Alexa ist bei allen drei Serien grün und mIgG-Cy5 rot dargestellt

Ein Blick auf die Konfokalbilder in Abbildung 78 zeigt, dass die typische Proteinverteilung des normalen Zweikomponentenadsorptionssystems in Acetatpuffer sich auch bei pH 4,5 und pH 5,0 in den Hybridomaproben ausbildet. Bei pH 4,5 ist das gebundene BSA als scharfer Ring in den äußeren Regionen des Partikel gebunden, während das Antikörpermolekül wiederum im Partikelinneren detektiert wurde. Eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5,0 lässt diesen Ring deutlich schrumpfen und BSA wird nur noch an der Partikeloberfläche in einer sehr schmalen Zone gebunden. Bei pH 5,5 wurden analog zum Experiment in Acetatpuffer keine Einstellungen am Mikroskop gefunden, die eine Detektion des Proteins ermöglichten. Zusätzlich zu dem größeren Volumen, dass mIgG mit zunehmendem pH-Wert beansprucht, scheint auch die Sättigung des SP-Sepharose FF Partikels mit Protein deutlich schneller zu gehen. Bei einem pH-Wert von 5,5 sind die Partikel bereits nach 60 Minuten mit Protein gesättigt, wo hingegen die Sättigung bei pH 5,0 erst nach 3 Stunden beobachtet wurde. Bei pH 4,5 dauerte es ca. 20 Stunden, bis Proteine über die gesamte Trägerfläche detektiert wurden. Zum quantitativen Vergleich der Experimente bei den drei verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 79 die berechneten $AUR_{300}(D)$ -Werte und Kapazitäten Q_{abs}^{eq} , soweit ermittelbar, gegenübergestellt.

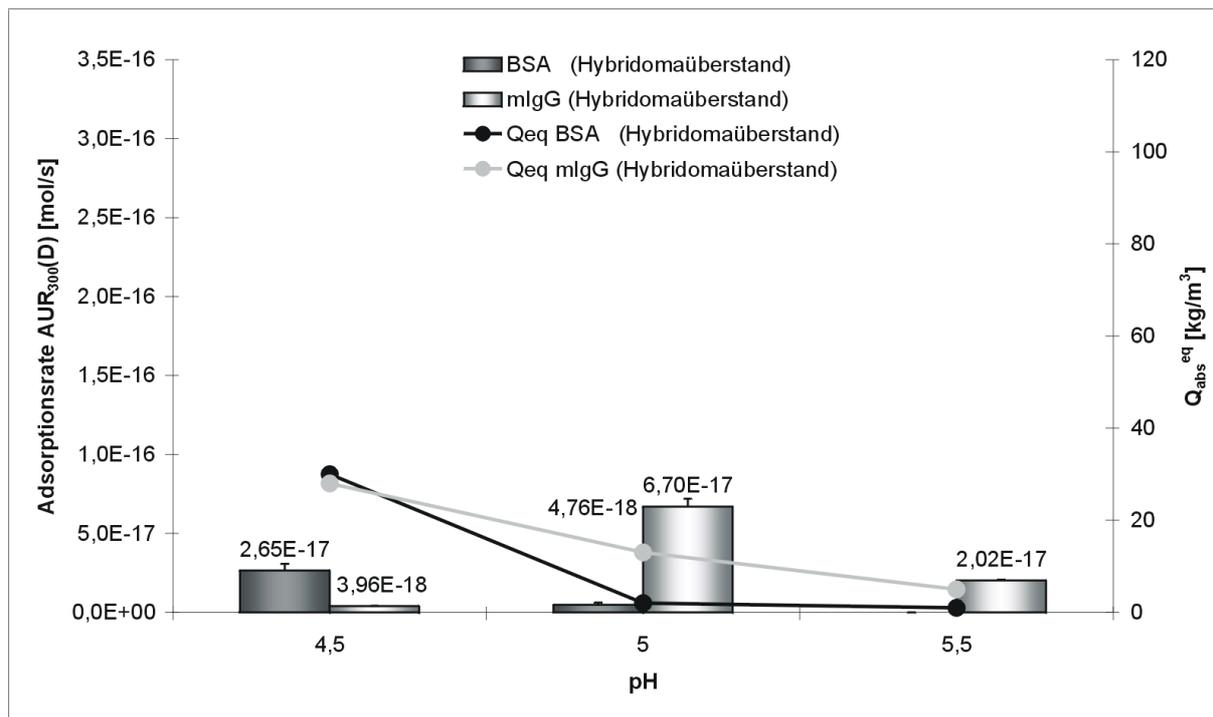


Abbildung 79 Molare Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ des BSA und mlgG in 1:2 verdünntem Hybridomaüberstand bei drei verschiedenen pH-Werten 4,5; 5,0 und 5,5

Ingesamt liegen die bestimmten Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ bei diesen Experimenten deutlich niedriger als bei den entsprechenden Experimenten, die in Acetatpuffern durchgeführt wurden. Die Leitfähigkeit ist trotz Verdünnung des Hybridomaüberstandes mit rund 8 mS in diesen Proben höher als im Experiment in 150 mM Acetatpuffer (s. Tab. 22 und vgl. Tab. 20). Die beiden markierten Proteine wurden den Ansätzen in einer sehr niedrigen, aber realistischen Konzentration von nur $0,15 \text{ kg/m}^3$ zugesetzt. Dieser äußerst niedrige Konzentrationswert lässt die Kinetiken im linearen Bereich der Isothermen ablaufen. Zusätzlich befindet sich im Hybridomaüberstand noch anderes Fremdprotein, das mit den beiden markierten Spezies um die Bindungsplätze konkurriert.

Im untersuchten pH-Bereich ist wiederum zu beobachten, dass die BSA-Adsorptionsrate auf null absinkt, während die $AUR_{300}(D)$ des mlgG zunächst auf pH 5,0 ansteigt, bei einer weiteren Erhöhung des pH-Wertes jedoch wieder absinkt (s. Abb. 79).

Ein Vergleich der absoluten Kapazitäten Q_{abs}^{eq} im Versuchszeitraum von 15 bis 20 Stunden zeigt, dass für beide Proteine die Kapazitäten im untersuchten pH-Bereich mit zunehmendem pH-Wert sinken. Bei einem pH-Wert von 4,5 wurden für beide Proteine mit ca. 30 kg/m^3 noch nahezu gleiche Kapazitätswerte ermittelt. In der Folge sinkt die BSA-Kapazität bei einer Erhöhung des pH-Wertes auf 5,0 bereits auf nur 2 kg/m^3 ab, während sich der korrespondierende mlgG-Wert nur halbiert. Bei pH 5,5 wurden bei einer gleichzeitigen BSA-Beladung von rund 1 kg/m^3 schließlich nur noch 5 kg/m^3 mlgG an SP-

Sepharose FF gebunden. Die äußerst niedrigen Kapazitäten bei pH 5,5 sind auf die ungünstigen Adsorptionsgleichgewichte der beiden Proteine bei diesem hohen pH-Wert und vor allen Dingen der hohen Ionenstärke und der Anwesenheit anderer Proteine in den Ansätzen zurückzuführen. Die Ergebnisse und Daten der beschriebenen Experimente bei den verschiedenen pH-Werten sind noch einmal in Tabelle 22 zusammengefasst. Zusätzlich sind die Leitfähigkeiten der experimentellen Ansätze aufgeführt (s. Tab. 22; vgl. mit Tab. 19; 20; 21).

Tabelle 22: Übersicht über die experimentellen Daten der Zweikomponentenexperimente im Hybridomaüberstand bei pH 4,5 bis 5,5. Neben den Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ und den Kapazitäten Q_{abs}^{eq} sind die Leitfähigkeiten und initialen Konzentrationen c_i zum Vergleich angegeben

Exp. Bed. Hybridoma (pH-Wert)	Leitfähig- keit [mS/cm]	(BSA) c_i [kg/m ³]	(mIgG) c_i [kg/m ³]	BSA $AUR_{300}(D)$ [mol/s]	mIgG $AUR_{300}(D)$ [mol/s]	BSA Q_{abs}^{eq} [kg/m ³]	mIgG Q_{abs}^{eq} [kg/m ³]
pH 4,5	8,23	0,15	0,15	2,65E-17	3,96E-18	30	28
pH 5,0	8,17	0,15	0,15	4,76E-18	6,70E-17	2	13
pH 5,5	8,18	0,15	0,15	-	2,02E-17	1	5

Weitere Angaben zu den beschriebenen Experimenten befinden sich im Anhang E.

4.5.4 Zweikomponentenadsorptionsgleichgewichte (Isothermen)

Wie bereits bei der kinetischen Betrachtung der Zweikomponentenadsorption (s. 4.4.2) erwähnt, ist die Generierung von „echten“ Gleichgewichtsdaten der parallelen Adsorption der beiden Proteine aufgrund extrem langsamer Verdrängungseffekte weitgehend unmöglich. Bei der Erzeugung der experimentellen Gleichgewichtsdaten für die einzelnen pH-Werte und Ionenstärken wurde deshalb der Zeitbereich zugrundegelegt, in dem die Adsorption kinetisch verfolgt wurde.

Die experimentellen Zweikomponentendaten wurden nur mit dem SMA-Modell über 6 Parameter beschrieben, da der Modellansatz über das Massenwirkungsgesetz die thermodynamisch sinnvollere Beschreibung von kompetitiven Adsorptionsgleichgewichten darstellt (Velayudhan und Horvath 1988; Bellot und Condoret 1991). Der SMA-Formalismus erlaubt die einfache Ausweitung des Modells auf Mehrkomponentengleichgewichte, ohne zusätzliche Parameter einzuführen (Brooks und Cramer 1992). Für jedes der beiden Proteine wird dabei ein K_i , ρ_i , und z_i ermittelt, die das Zweikomponentenadsorptionssystem näher charakterisieren. Die Parameter erhalten dabei mit die Indizes ₁₂ und ₁₃ für die mIgG, bzw. BSA-Werte. Die ermittelten Parameter sind in Tabelle 23 zusammengestellt. In Anhang

F sind die mit dem Modell berechneten Kapazitäten gegen die experimentell ermittelten Werte in Paritätsplots aufgetragen.

Tabelle 23: Ermittelte SMA-Parameter K_i , ρ_i und z_i aus der Zweikomponentenanpassung von experimentellen Einzel- und Zweikomponentengleichgewichtsdaten an das SMA-Modell von Brooks und Cramer

	mlgG			BSA		
pH	K_{12}	σ_{12}	z_{12}	K_{13}	σ_{13}	z_{13}
4,5	82,98	83,17	1,00	297,18	49,83	2,63
5,0	53,17	113,62	2,71	21,31	50,95	5,03
5,5	24,98	82,85	2,59	0,16	84,62	4,48

Bei pH 4,5 wurde eine signifikant höhere Gleichgewichtskonstante K_i für BSA ($K_{13} = 297,18$) im Vergleich zum monoklonalen Antikörper ($K_{12} = 82,98$) bestimmt. Im Gegensatz dazu ist die mlgG-Konstante bei pH 5,0 und pH 5,5 höher. Der K_{13} -Wert sinkt mit zunehmendem pH-Wert auf 0,16 bei pH 5,5, während der mlgG-Wert mit 24,98 ca. 100-fach höher liegt. Die sterischen Faktoren ρ_i weisen analog zur Einkomponentenadsorptionen keinen eindeutigen Trend auf und repräsentieren eher die Fehlerbandbreite der 6 Parameteranpassung. Ein Vergleich der ermittelten SMA-Parameter mit den zugehörigen Einkomponentendaten zeigt, dass sich durch Miteinbeziehung von Zweikomponentendaten teilweise große Verschiebungen der einzelnen Parameter durch die Anpassung ergeben haben (vgl. Tab. 15 u. Tab. 18).

Das Ergebnis verdeutlicht, dass eine einfache Beschreibung von Mehrkomponentengleichgewichten anhand der Einkomponentenisothermen für das in dieser Arbeit betrachtete Adsorptionssystem nicht realistisch ist. Offenbar liegen der parallelen Adsorption der beiden Proteine komplexere Gleichgewichte zugrunde, die in dem SMA-Formalismus aufgrund der Modellannahmen vernachlässigt sind (s. 2.3.3.3). Im Gegensatz zu diesen Daten konnten Lewus und Carta für die Adsorption von Lysozym und Cytochrom C an einem S-HyperD-M Kationenaustauscher eine gute Übereinstimmung der experimentellen Daten mit der SMA-Zweikomponentenisotherme finden, die anhand von Einkomponentenparametern abgeleitet wurde (Lewus und Carta 1999).

Bei dem betrachteten Adsorptionssystem BSA und mlgG an SP-Sepharose FF sind in jedem Fall durch die Miteinbeziehung von experimentellen Zweikomponentendaten bei der Anpassung die realen Adsorptionsgleichgewichte besser abgebildet.

Zur graphischen Darstellung der Isothermen wurden mit Hilfe der ermittelten Parameter Adsorptionsisothermen für die drei untersuchten pH-Werte bei einer konstanten Acetatpufferkonzentration von 50 mM mit dem SMA-Modell berechnet. Die Isothermen sind 3 dimensional in Abbildung 80 aufgetragen.

Die dem Betrachter zugewandten Seiten des Koordinatenwürfels beschreiben dabei die mit dem Modell berechneten Einkomponentenisothermen in 50 mM Acetatpuffer bei dem jeweiligen pH-Wert. Die Isothermenverläufe bei pH 4,5 zeigen, dass analog zur Erhöhung der Ionenstärke bereits geringe Konzentrationen der jeweils anderen Proteinspezies zu einer deutlichen Veränderung der Isothermenform führen. Mit zunehmender Konzentration des korrespondierenden Proteins werden die Isothermenverläufe flacher und gehen in eine hyperbolischen Form über. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes auf 5,0 kann man bereits erkennen, dass der Isothermenverlauf von BSA deutlich stärker von der Anwesenheit des Antikörpers beeinflusst wird, als umgekehrt. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf 5,5 macht diesen Effekt noch deutlicher. Hier ist der Verlauf der mIgG-Isotherme nahezu unbeeinflusst von der BSA-Proteinkonzentration.

Ein Literaturvergleich der experimentellen Daten dieser Arbeit ist schwierig, da bisher nicht viel über die Mehrkomponentenadsorption von Proteinen publiziert wurde. Die bereits zitierte Arbeit von Lewus und Carta war in der Literatur die einzige experimentelle Studie über die parallele Adsorption von Proteinen an Ionenaustauschermatrizes (Lewus und Carta 1999). Fargues et al. untersuchten die parallele Adsorption von BSA und Hämoglobin an einen Hydroxyapatitträger durch Durchbruchkurvenanalyse (Fargues et al. 1998). Die Modellproteine repräsentieren in beiden Studien keine realen Trennprobleme, sondern sind vermutlich als reine Modellsysteme aufgrund der nahezu unabhängigen Quantifizierungsmöglichkeit der Spezies ausgewählt worden. Sowohl Hämoglobin als auch Cytochrom C besitzen immobilisierte Eisenionen in Hämgruppen, die eine selektive Absorptionsmessung bei ca. 400 nm ermöglichen (Fargues et al. 1998; Lewus und Carta 1999).

Schließlich ist noch eine Arbeit von Bellot und Condoret zu erwähnen, die sich theoretisch mit der Zweikomponentenadsorption von Proteinen in Ionenaustauschern beschäftigt und Zweikomponentenadsorptionsprozesse durch Simulation mit verschiedenen Modellen untersucht (Bellot und Condoret 1993).

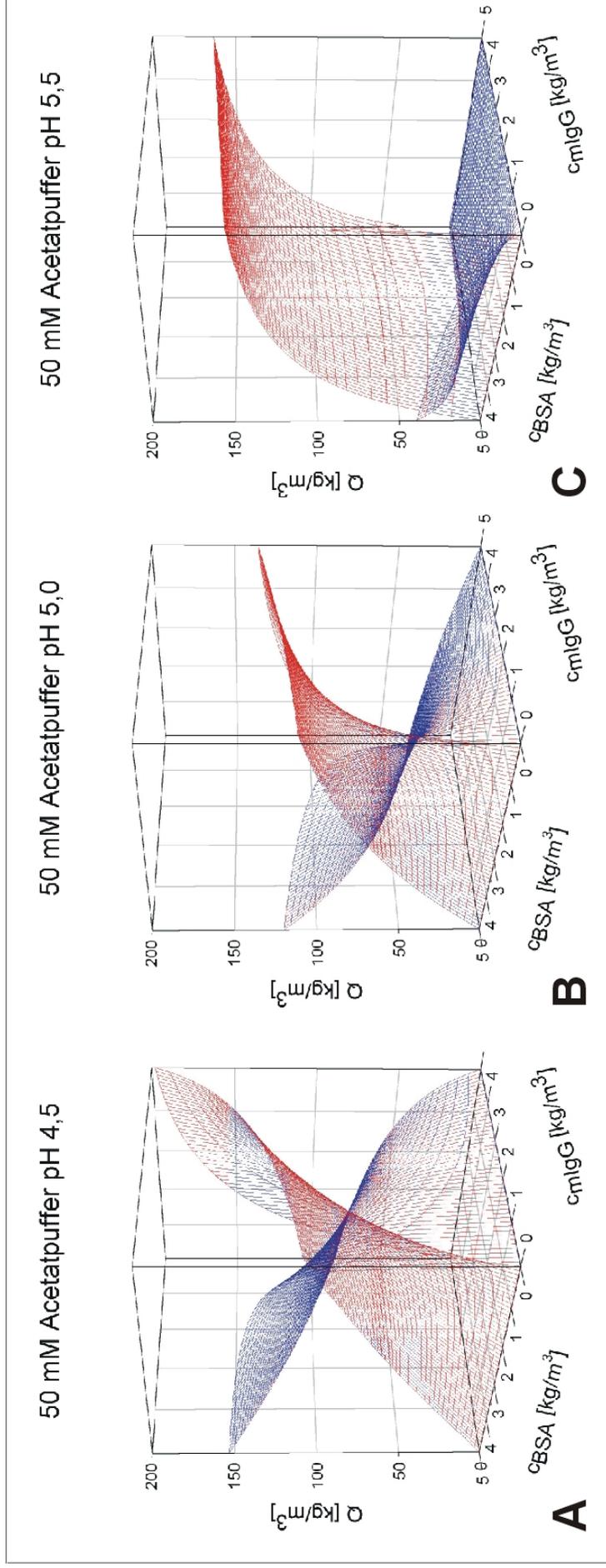


Abbildung 80: Simulierte SMA-Isothermen für (A) 50 mM Acetatpuffer pH 4,5; (B) 50 mM Acetatpuffer pH 5,0; (C) 50 mM Acetatpuffer pH 5,5. mlgG -Isothermen (rot); BSA-Isothermen (blau). Zur Simulation wurden die Parameter aus Tabelle 23 verwendet.

4.6 Multicoloranalyse der Proteinadsorption

4.6.1 Adsorption von BSA

Die Multicoloranalysen der Proteinadsorption wurden im Rahmen des Projektes entwickelt, um Informationen über den Transportmechanismus des Proteins zu erhalten. Die Durchführung dieser Transportuntersuchungen erfolgte durch eine konsekutive Inkubation mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffkonjugaten nach dem Schema in Abbildung 38.

Abbildung 81 zeigt exemplarisch Serien von Konfokalbildern einer Adsorption von BSA in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0, die während und nach einer solchen Inkubation von SP-Sepharose FF Partikelproben aufgenommen wurden.

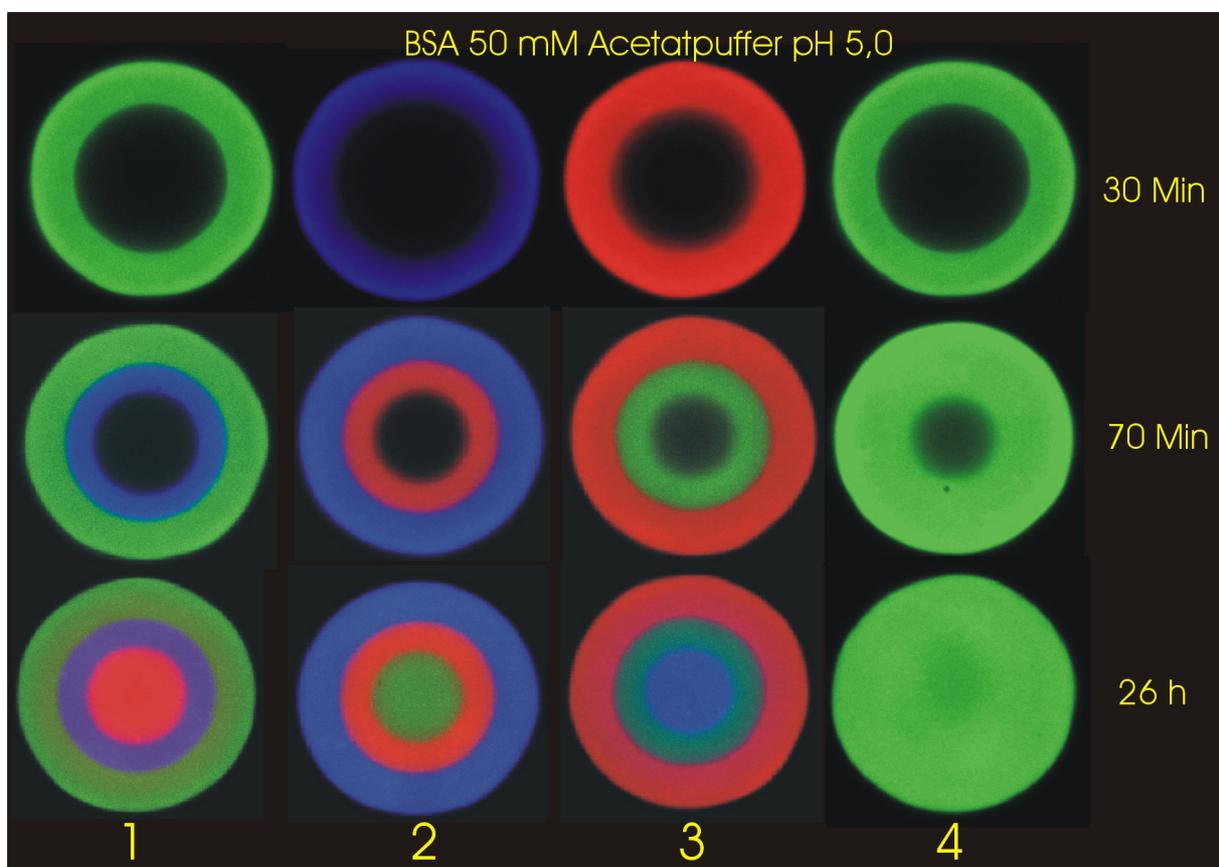


Abbildung 81: Konfokalbilder einer konsekutiven Inkubation von SP-Sepharose FF Partikeln mit verschiedenen BSA Protein/Fluoreszenzfarbstoffkonjugaten (Spalten 1-3) und einem Einzelkonjugatkontrollexperiment in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 (BSA-Alexa, grün; BSA-Cy3, blau; BSA-Cy5, rot)

Die linken drei Spalten zeigen dabei Aufnahmen von SP-Sepharose FF-Partikeln, die konsekutiv mit drei verschiedenen BSA/Fluoreszenzfarbstoffkonjugaten wie unter 3.6.4.2 beschrieben inkubiert wurden, während die rechte Spalte Partikel eines Kontrollexperimentes zeigt, die nur mit einem Proteinkonjugat (BSA-Alexa) im Laufe der Inkubation in Kontakt

kamen. So wie hier abgebildet, wurden alle im Folgenden gezeigten Experimente durchgeführt. Die vollständigen Bildsequenzen sind in Anhang G zusammen mit der Quantifizierung angeführt. In dem in Abbildung 56 dargestellten Beispiel zeigen alle Konfokalbilder nach 30 Minuten Inkubation einen scharfen farbigen Ring in den äußeren Regionen des SP-Sepharose FF Partikels (vgl. Abb. 51). Weder nach 70 Minuten Inkubationszeit noch im Gleichgewicht nach 26 h ändert dieser initiale Inkubationsring seine Position oder seine Fluoreszenzintensität (Spalten 1-3 in Abb. 81). Aus einer zweiten Inkubation mit einem anderen Konjugat für weitere 40 Minuten resultiert ein weiterer Ring, der unmittelbar daneben, weiter innerhalb im Partikel lokalisiert ist. Die dritte, finale Inkubation mit dem dritten BSA/Farbstoffkonjugat vervollständigt die Adsorption ins Gleichgewicht und führt zu dem in Abbildung 81 gezeigten Ringmuster.

Die verschiedenen Sequenzen von Farbstoffinkubationen haben offensichtlich keinen Einfluss auf das erhaltene Ringmuster. Die in den Spalten 1-3 abgebildeten Bilderserien zeigen in Abhängigkeit von der Farbstoffsequenz das gleiche Ringmuster. Weiterhin ist der Gesamtfortschritt der Adsorption mit BSA in allen 4 Serien (Spalten 1-4 in Abb. 81) nahezu gleich, wie der Vergleich der Ringdicken der konsekutiv inkubierten Ansätze mit dem Kontrollexperiment zeigt. Auch diese Übereinstimmung wurde bei allen im Folgenden diskutierten Experimenten beobachtet (s. dazu Anhang G). Ein Austausch der Inkubationsüberstände bei der Multicoloranalyse beeinflusst demnach die Gesamtproteinadsorptionskinetik nicht und die entwickelte Methode liefert Ergebnisse, die dem realen Verlauf der jeweiligen Einkomponentenadsorption entsprechen und zusätzlich noch Informationen über den Transportmechanismus des Proteins enthalten.

Die Fluoreszenzintensitätsinformation, die in den Konfokalbildern enthalten ist kann nun wiederum zur Generierung von Fluoreszenzintensitätsprofilen genutzt werden, um das erhaltene BSA Adsorptionsmuster noch genauer diskutieren zu können. Abbildung 82 enthält die resultierenden Fluoreszenzintensitätsprofile einer konsekutiven Inkubation mit verschiedenen BSA/Farbstoffkonjugaten (vgl. Spalte 2 in Abbildung 81). Bei dieser Serie wurden die Partikel zuerst 30 Minuten mit einer BSA-Proteinlösung inkubiert, die BSA-CY3 als Fluoreszenzfarbstoffkonjugat enthielt. Darauf folgten eine Inkubation mit BSA-Cy5 (30 – 70 Minuten) und schließlich eine Inkubation mit dem BSA-Alexa Konjugat.

Wie bereits qualitativ aus dem Ringmuster der Konfokalbilder geschlossen werden konnte, zeigen die Fluoreszenzintensitätsprofile scharf regional abgegrenzte Fluoreszenzintensitätsbanden für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffinkubationen. Weiterhin ändert sich die Form und Intensität des Fluoreszenzintensitätsprofils im weiteren Verlaufe des Experimentes bis hin zum Gleichgewicht nicht mehr.

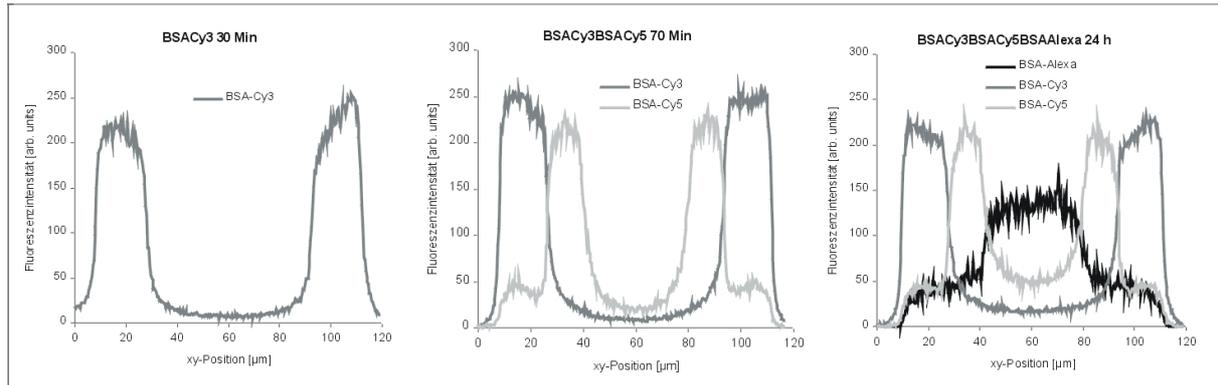


Abbildung 82: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener BSA/Farbstoffkonjugate in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 (BSA-Alexa, schwarz; BSA-Cy3, grau; BSA-Cy5, hellgrau)

Auch bei dieser Methode entspricht das Fluoreszenzintensitätsprofil, bzw. die lokal aufgelöste Fluoreszenzinformation dem Anteil an gebundenem Protein der jeweiligen Inkubationsphase. Aus diesem Ergebnis kann demnach geschlossen werden, dass unter diesen experimentellen Bedingungen BSA nach initialer Bindung an die Kationenaustauschligenanden der SP-Sepharose nicht weiter ins Partikelinnere transportiert wird. Wie bereits erwähnt, eignet sich das „Shrinking Core“ Adsorptionsmodell von Yagi und Kunii zur mathematischen Beschreibung des Proteintransportes unter diesen Bedingungen sehr gut (Yagi und Kunii 1955). Neben den bereits beschriebenen Grundannahmen einer praktisch irreversiblen Adsorption, bzw. sehr günstigem Bindungsgleichgewicht, liegt dem mathematischen Modell vor allen Dingen ein nahezu reiner Porentransportmechanismus zugrunde. Nach den gezeigten experimentellen Daten ist diese Annahme durch das Experiment nun eindeutig bestätigt worden (vgl. 2.4.6.2 und Abb. 82).

Eine Durchführung des gleichen Experimentes bei einem niedrigeren pH-Wert von pH 4,5 führt qualitativ zum gleichen Resultat (s. Abb. 58). Wiederum ist eine scharfe Abgrenzung der verschiedenen Fluoreszenzsignale aus den einzelnen Inkubationen zu beobachten. Die absoluten Intensitäten sind natürlich nicht vergleichbar mit dem Experiment bei pH 5,0, da für diese Bedingungen eine neue Kalibrierung der Fluoreszenzintensitätskanäle wie unter 3.6.4.2 beschrieben nötig war.

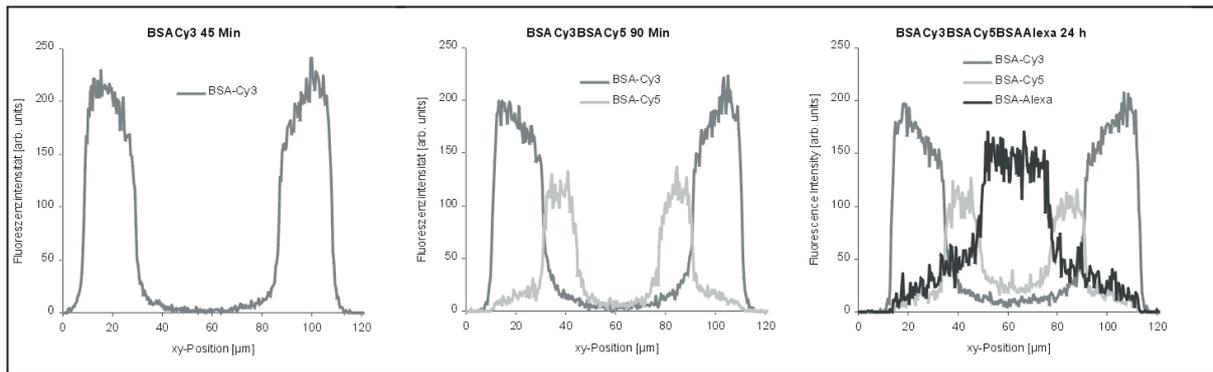


Abbildung 83: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener BSA/Farbstoffkonjugate in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 (BSA-Alexa, schwarz; BSA-Cy3, grau; BSA-Cy5, hellgrau)

Aber auch bei einem pH-Wert von 4,5 ändert initial gebundenes BSA Protein seine Position im Adsorberpartikel im Verlauf der Adsorption bis hin zum Gleichgewicht nicht und der Proteintransport ist durch einen reinen Porentransport kontrolliert.

Eine Erhöhung des pH-Wertes auf pH 5,5 führt zu einem anderen Adsorptionsmuster. Hier ist keine steile Adsorptionsfront mehr zu beobachten, wie sie zum Beispiel beim „Shrinking Core“ Modell angenommen wird (s. 2.4.6.2 und Abb. 84). Die Adsorptionskinetik für BSA ist unter diesen sehr ungünstigen Adsorptionsbedingungen sehr langsam, so dass ein Adsorptionsgleichgewicht erst nach ca. 40 h erreicht wurde. Die einzelnen Inkubationszeiten wurden entsprechend der langsamen Kinetik verlängert, um für jede Inkubation ein geeignetes Signal im Konfokalmikroskop aufzulösen.

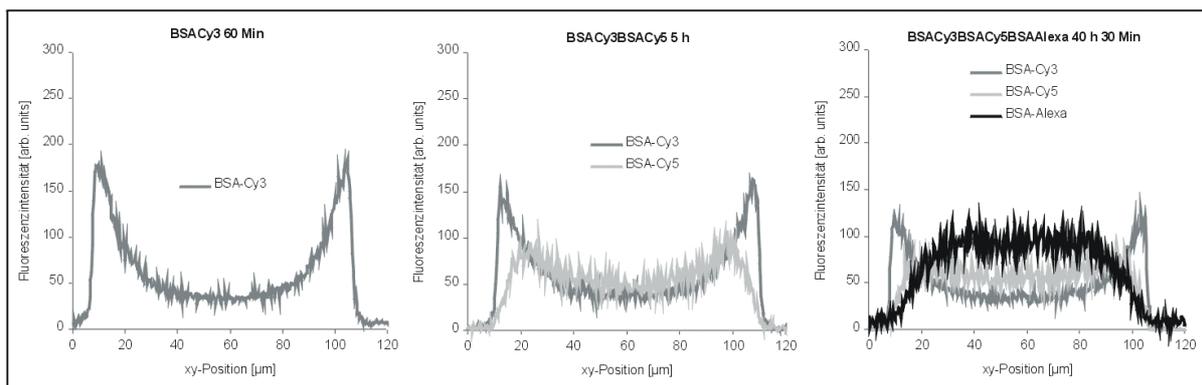


Abbildung 84: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener BSA/Farbstoffkonjugate in 50 mM Acetatpuffer pH 5,5 (BSA-Alexa, schwarz; BSA-Cy3, grau; BSA-Cy5, hellgrau)

Auch bei diesem hohen pH-Wert kommt es zu keinem signifikanten Weitertransport von Proteinkonjugaten nach initialer Bindung an die Matrix, bzw. Kationenaustauschliganden der Matrix (s. Abb. 84). Lediglich die Randintensitäten nehmen mit zunehmender Reaktionszeit für die ersten beiden Inkubationen leicht ab.

Der pH-Wert scheint für BSA, bzw. dessen Transport, in einem porösen Adsorberpartikel im untersuchten pH-Bereich keine tragende Rolle zu spielen, obwohl das Protein in diesem Bereich seine Nettoladung von positiv zu negativ ändert (s. 4.7 Proteintitration).

Ein etwas anderes Adsorptionsmuster wurde durch eine Erhöhung der Acetatpufferkonzentration auf 150 mM bei einem pH-Wert von 5,0 erhalten. Abbildung 60 zeigt exemplarisch den Verlauf einer Multicoloranalyse unter diesen experimentellen Bedingungen. Wiederum wurden die verschiedenen Inkubationszeiten t_1 bis t_3 an die relativ langsame Adsorptionskinetik unter diesen Bedingungen angepasst.

Bei der in Abbildung 85 dargestellten Serie wurden die SP-Sepharose FF Partikel zunächst für 60 Minuten mit einer Proteinlösung inkubiert, die BSA-Cy5 als Markerkonjugat enthielt.

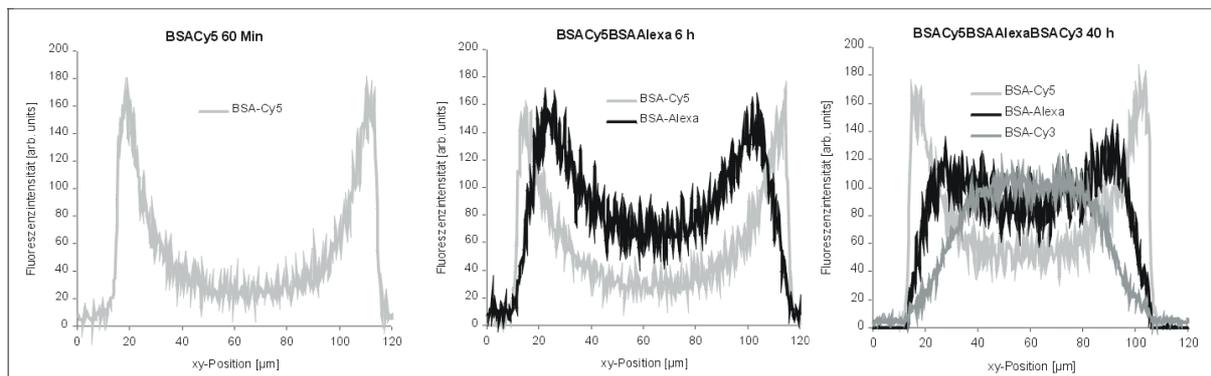


Abbildung 85: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener BSA/Farbstoffkonjugate in 150 mM Acetatpuffer pH 5,0 (BSA-Alexa, schwarz; BSA-Cy3, grau; BSA-Cy5, hellgrau)

Mit einer höheren Ionenstärke in der Flüssigphase unter diesen Bedingungen ist die Adsorptionsfront im Fluoreszenzintensitätsprofil unter diesen Bedingungen nach 60 minütiger Inkubation wiederum nicht sehr steil und die Form scheint sich im Verlaufe des Experimentes zu ändern. Nach 30 Minuten ist in der Partikelmittle nur ein niedriges Fluoreszenzsignal messbar, was auf eine sehr geringe Proteinkapazität in diesem Bereich des Partikels schließen lässt. Im Verlaufe des Experiments nimmt diese Fluoreszenzsignalstärke nach 6 h und Inkubation nach 40 h im Gleichgewicht deutlich zu, so dass hier wahrscheinlich Protein nach initialer Bindung weiter in das Partikel hineintransportiert und erneut gebunden wird.

Diese Vermutung wird durch Verfolgen des Fluoreszenzsignals der zweiten Inkubation mit BSA-Alexa ins Gleichgewicht noch gestützt. Nach der finalen Inkubation mit BSA-Cy3 ist auch hier der Anteil an gebundenem Protein in der Mitte des Partikels höher (s. Abb. 85).

Wiederum sind alle drei Proteinkonjugate weiter über den Partikeldurchmesser verteilt als bei niedrigerer Pufferkonzentration. Dieses Adsorptionsmuster, bzw. der abgeleitete Transport ist deshalb mit den Voraussetzungen des „Shrinking Core“ Modells nicht beschreibbar. Die Ionenstärke könnte aufgrund einer stärkeren Abschirmung der Ladungen auf der Proteinoberfläche die Mobilität initial gebundener BSA-Proteinmoleküle verändern und einen anderen Transport teilweise ermöglichen.

4.6.2 Adsorption von IgG

In einer zweiten Serie von Multicoloranalysen wurde die Adsorption des monoklonalen IgG2a Antikörpers (mIgG) in 50 mM Acetatpuffer an SP-Sepharose FF bei den beiden pH-Werten 4,5 und 5,0 untersucht. In Abbildung 86 sind die Fluoreszenzintensitätsprofile einer konsekutiven Inkubation nach bei pH 4,5 für den monoklonalen Antikörper dargestellt.

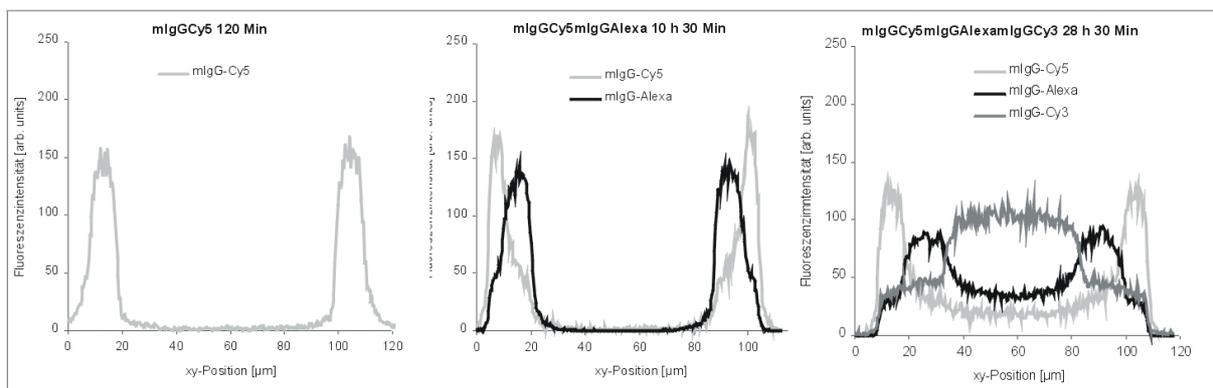


Abbildung 86: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener mIgG/Farbstoffkonjugate in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 (mIgG-Alexa, schwarz; mIgG-Cy3, grau; mIgG-Cy5, hellgrau)

Betrachtet man die Fluoreszenzintensitätsprofile unter diesen Bedingungen, so stellt man kleine Unterschiede zum BSA-Transport unter diesen Bedingungen fest (s. Abb. 83). Nach der ersten Inkubation mit mIgG-Cy5-Konjugat ist der Antikörper ca. 20 µm tief in das Partikel eingedrungen. In der Mitte des Partikels ist nach 120 Minuten kein Protein detektierbar.

Nach einer weiteren Inkubation der SP-Sepharose FF-Partikel mit mlgG-Alexa für 8 h und 30 Minuten scheint ein sehr geringer Teil des mlgG-Cy5 Proteins der ersten Inkubation weiter in den Partikel hineintransportiert worden zu sein. An den inneren Flanken des Intensitätsprofils ist ein zunehmendes „Tailing“ zu beobachten. Im Gleichgewicht nach der finalen Inkubation mlgG-Cy3 ist nach 18 h mlgG Protein in der Mitte des Partikels detektierbar, die Menge ist jedoch sehr gering. Der Verlauf des zweiten Inkubationssignals ins Gleichgewicht bestätigt wiederum diese abweichende Beobachtung (mlgG-Cy5 nach 120 Min. und nach 10 h 30 Min). Der Gesamttransport erfolgt hingegen hauptsächlich durch die Pore bis zur Bindung an die Liganden des Kationenaustauscherpartikels. Die steile Adsorptionsfront unter diesen Bedingungen lässt möglicherweise eine Beschreibung der Adsorption mit dem bereits erwähnten „Shrinking Core“ Modell zu.

Das Transportverhalten des mlgG Proteins ändert sich drastisch, wenn man den pH-Wert im umgebenden Reaktionsmilieu auf pH 5,0 erhöht (s. Abb. 87).

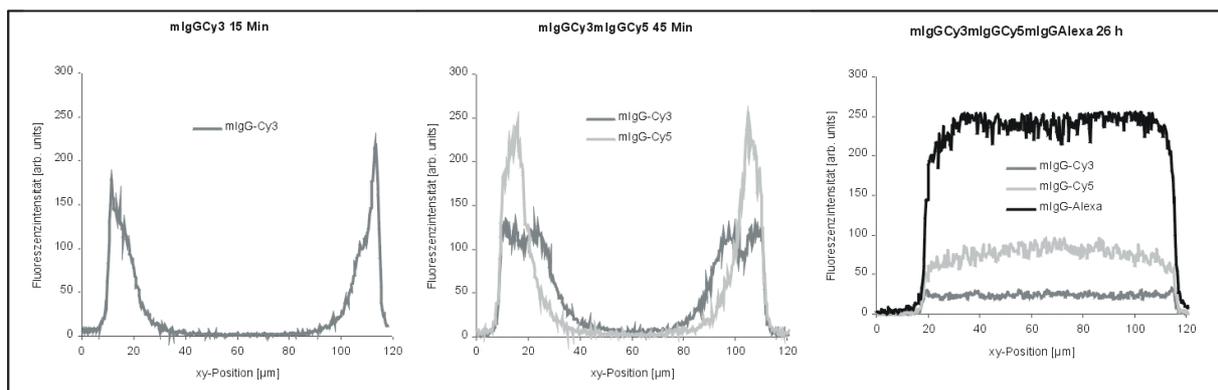


Abbildung 87: Fluoreszenzintensitätsprofile von SP-Sepharose FF Partikeln einer konsekutiven Inkubation verschiedener mlgG/Farbstoffkonjugate in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 (mlgG-Alexa, schwarz; mlgG-Cy3, grau; mlgG-Cy5, hellgrau)

Bei diesem pH-Wert ist der Proteintransport in die SP-Sepharose FF Partikel sehr viel schneller als bei pH 4,5, da eine erste Inkubation der Partikel mit mlgG-Cy3 Protein für nur 15 Minuten bereits zu einer Eindringtiefe von 30 µm führt (s. Abb. 87). Während der zweiten Inkubation mit dem mlgG-Cy5-Konjugat für weitere 30 Minuten bindet dieses Protein vorwiegend an die äußeren Regionen des Partikels und initial, gebundenes Protein der ersten Inkubation wird weiter ins Partikelinnere transportiert. Die finale Inkubation mit mlgG-Alexa ins Gleichgewicht führt zu einem Adsorptionsmuster, in dem die Fluoreszenzsignale aller drei Proteinkonjugate nahezu homogen im Partikel verteilt sind (s. Abb. 87).

Die Erhöhung des pH-Wertes von 4,5 auf 5,0 führt bei der Adsorption des monoklonalen Antikörpermoleküls von einer Situation, in welcher das gezeigte Adsorptionsmuster noch weitgehend die Voraussetzungen des „Shrinking Core“ Modells erfüllt, zu einer deutlichen Dominanz des sekundären Proteintransports in das Partikelinnere nach initialer Bindung. Es scheint weiterhin, dass dieser zusätzliche Transport hauptsächlich für die Erhöhung der Gesamtadsorptionsgeschwindigkeit verantwortlich ist.

Im Rahmen des Projektes wurden auch Multicoloranalysen mit polyklonalem Immunglobulin G (hIgG) durchgeführt. Das Gesamtadsorptionsmuster dieser Proteinspezies verhält sich bei pH 5.0 nahezu genauso wie der untersuchte monoklonale Antikörper, es ergibt sich eine homogene Intensitätsverteilung aller Fluoreszenzsignale im Gleichgewicht (Daten nicht gezeigt). Zusammen mit den gezeigten mIgG-Daten könnte hieraus geschlossen werden, dass diese Transportart Immunglobulin G-typisch und im Rahmen der Bandbreite von IgG unabhängig vom isoelektrischen Punkt des Antikörpers ist. Wie bereits erwähnt ist jedoch eine genaue Diskussion dieser Daten erschwert, da hIgG-Proben nicht als Einkomponentenadsorptionssysteme angesehen werden können.

4.6.3 Vergleich der Adsorptionsmuster und Quantifizierung

Ein Vergleich des Adsorptionsverhaltens der beiden Proteine bei pH 5,0 zeigt, dass BSA bei pH 5,0 ein deutliches „Shrinking Core Pattern“ zeigt, während der monoklonale Antikörper verstärkt nach initialer Bindung weitertransportiert wird. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Diskrepanz liegt in dem Größenunterschied der beiden Proteinspezies. Im Adsorptionsmuster, das den Annahmen des „Shrinking Core“ Adsorptionsmodells folgt, füllt sich das Adsorberpartikel von den äußeren Regionen hin zum Partikelmittelpunkt mit adsorbiertem Protein. Dies bedeutet, dass ohne Weitertransport später in das Partikel eintretende Proteinmoleküle an Porenabschnitten mit bereits gebundenen Molekülen vorbei transportiert werden müssen. Das Molekulargewicht des mIgG (ca. 147.000 g/mol) ist mehr als doppelt so groß, wie das von BSA (ca., 67.000 g/mol). Dieser Effekt würde sich bei der schwereren und folglich auch größeren Spezies (mIgG) bei einem Transport nach dem „Shrinking Core“ Modell noch gravierender auswirken. Diese Annahme ist durch einen Vergleich der Geschwindigkeit der Adsorption von BSA und mIgG bei pH 4,5 manifestiert, da hier in beiden Fällen der Porentransport deutlich dominiert.

Durch die Änderung des mlgG-Transportes bei pH 5,0 kann später adsorbiertes Protein wiederum initial an die frei gewordenen, äußeren Regionen des Adsorberpartikels binden und die sterische Hinderung aufgrund der sich stetig ändernden, bzw. verengenden Porengeometrie tritt unter diesen Bedingungen nicht so gravierend auf. Die Gesamtadsorptionsgeschwindigkeit ist folglich erhöht.

Um sicher zu stellen, dass die in den Experimenten erhaltenen Adsorptionsmuster keine Folge unterschiedlicher Proteinmarkierung oder optische Artefakte sind, wurden die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Fluoreszenzintensitätsprofile zu einem Summenspektrum addiert. Die einzelnen Detektorkanäle des Konfokalmikroskopes wurden im Vorfeld des jeweiligen Experimentes wie unter 3.6.4.2 beschrieben kalibriert. Dieses Summenspektrum sollte demnach die gleiche Form besitzen, wie das Spektrum des zugehörigen Kontrollexperimentes, in dem die SP-Sepharose FF Partikel nur mit einem Proteinkonjugat inkubiert wurden. Abbildung 88 zeigt diesen Vergleich der entsprechenden Fluoreszenzintensitätsprofile.

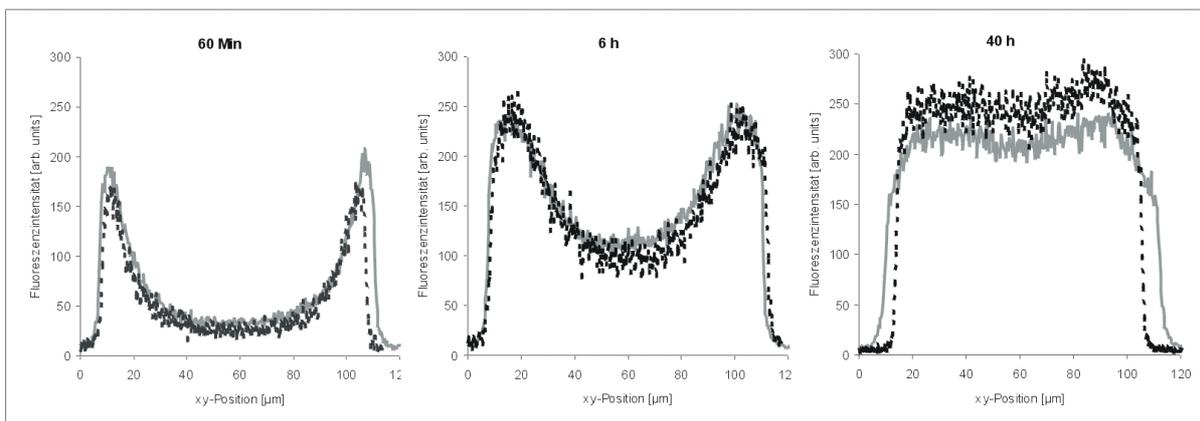


Abbildung 88: Exemplarischer Vergleich der Summenspektren (schwarz gestrichelt) aus der konsekutiven Inkubation mit den Fluoreszenzintensitätsprofilen (grau) des zugehörigen Kontrollexperimentes (nur BSA-Cy3) einer Adsorption von BSA in 150 mM Acetatpuffer pH 5,0

Die Verläufe der Fluoreszenzintensitätsprofile sind nahezu gleich und diese Beobachtung rechtfertigt die zuvor diskutierten Annahmen, dass das Intensitätsprofil nur aus dem Anteil an gebundenem Protein einer Teilinkubation entsteht und das optische Effekte oder Fluoreszenzlöschung wenn überhaupt nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Zur weiteren Quantifizierung wurden aus den Fluoreszenzintensitätsprofilen wie unter 3.6.5.1 beschrieben nach Gleichung 40 und 41 die relativen Kapazitäten Q_{rel}^{ch} berechnet und aufsummiert. Das aus den Einzelprofilen berechnete Summenspektrum ist mit dem Kontrollspektrum vergleichbar und demnach ist auch eine Addition der Q_{rel}^{ch} zur relativen Gesamtkapazität gerechtfertigt. Zusätzlich wurden wiederum bei jedem Experiment die

absoluten Kapazitäten $Q_{\text{abs}}(t)$ aus der Flüssigphase für die Inkubationszeiten t_{1-3} bestimmt. Abbildung 89 zeigt die Paritätsplots aller beschriebenen Experimente für A (BSA) und B (mIgG).

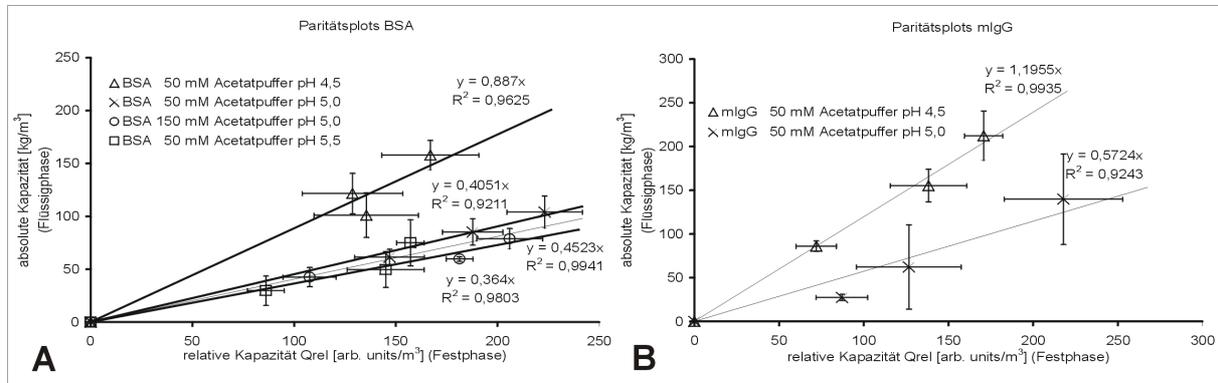


Abbildung 89: Paritätsplots der konsekutiven Inkubationen von (A) BSA und (B) mIgG. Auftragung der relativen Kapazität Q_{rel} gegen die zugehörigen absoluten Kapazitäten $Q_{\text{abs}}(t)$

Für die beiden untersuchten Proteine BSA und mIgG konnte bei allen experimentellen Bedingungen eine, in Anbetracht der im Rahmen der Auswertung gemachten Näherungen entsprechend, gute Korrelation zwischen den relativen Kapazitäten Q_{rel} und den zugehörigen absoluten Kapazitäten $Q_{\text{abs}}(t)$ beobachtet werden (s. Abb. 89 (A) u. (B)). Die hohen Abweichungen, dargestellt durch die Fehlerbalken in Abbildung 89, sind hauptsächlich auf die relativ großen Messfehler dieser Methode, bedingt durch die kleinen, transferierten Flüssigkeitsvolumina, zurückzuführen. Fluoreszenzlöschung oder optische Fehler spielen bei den gewählten Messparametern, wie bereits erwähnt, nur eine untergeordnete Rolle (s. 4.1.2). Der qualitative Informationsgehalt aus den durchgeführten Experimenten wird dadurch jedoch keinesfalls getrübt.

4.7 Titrationskurven

Der pH-Wert der Adsorptionslösung wurde bei den kinetischen Experimenten, genauso wie bei den mechanistischen Untersuchungen und Adsorptionsisothermen im Bereich von pH 4,5 bis pH 5,5 variiert. Dabei konnten teilweise gravierende Veränderungen des Adsorptionsverhaltens der beiden Proteine beobachtet werden, die zu einem großen Teil auf die pH-Wert bedingten Änderungen des Ladungszustandes auf den Moleküloberflächen der beiden Proteine zurückzuführen sind. Um eine Vorstellung von der Abhängigkeit der Oberflächenladung der beiden Modellproteine vom pH-Wert zu erhalten, wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Technische Thermodynamik der Universität Kaiserslautern Titrationskurven für beide Proteine wie unter 3.8 beschrieben generiert. Die

Methode ermöglicht die relativ genaue Bestimmung der Ladungsänderungen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Bei Kenntnis des Nettoladungszustandes bei einem pH-Wert sind die Abhängigkeiten auch absolut bestimmbar. Deshalb wurden in den Auftragungen als Nullpunkte die durch isoelektrische Fokussierung bestimmten pI -Werte herangezogen, bei denen die Proteine nachweislich, netto ungeladen vorliegen, ($pI_{BSA} = 4,8$; $pI_{mIgG} = 6,0$).

In Abbildung 90 sind zunächst die aufgenommenen Titrationskurven für BSA gezeigt.

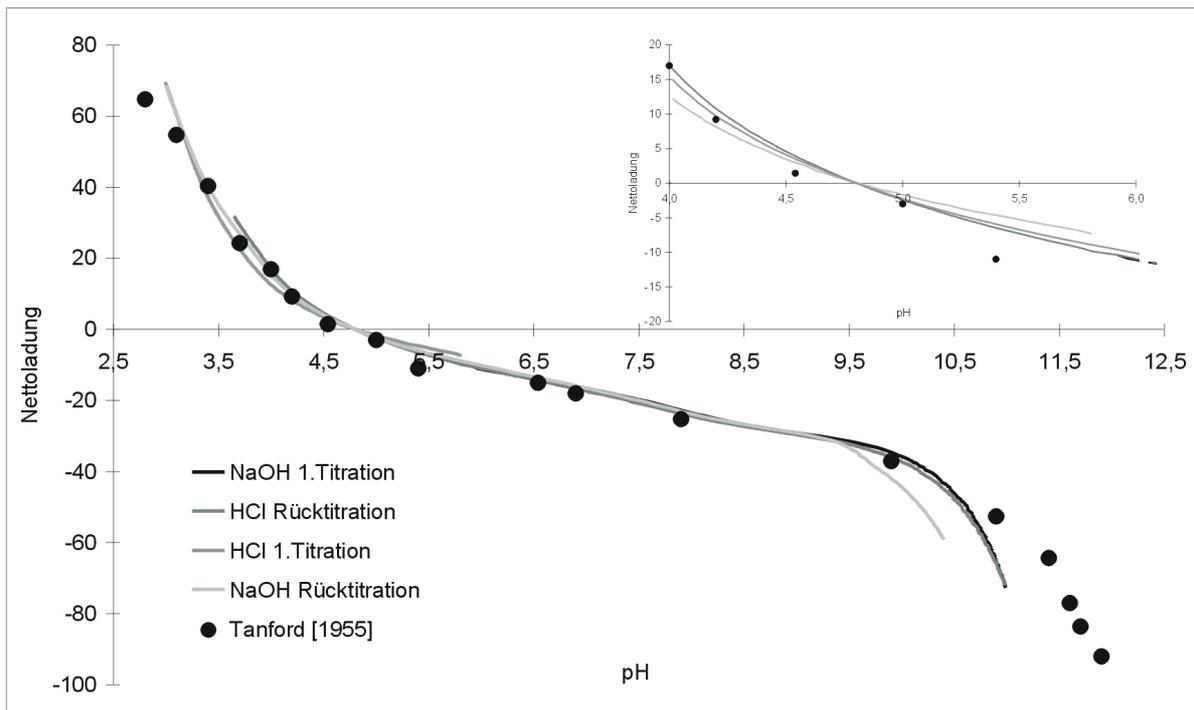


Abbildung 90: Titrationskurven einer wässrigen BSA-Proteinlösung. Vergleich mit den experimentellen Daten von Tanford (Tanford et al. 1955). Der pH-Bereich 4,0 bis 6,0 ist zur genaueren Übersicht herausvergrößert.

Insgesamt wurden vier Titrationsen mit wässrigen Proben von BSA durchgeführt. Dabei wurde eine wässrige Probe jeweils einmal mit einer sauren- bzw. basischen Lösung titriert und anschließend mit der korrespondierenden Säure oder Base zurücktitriert. So konnten für BSA Titrationskurven im pH-Wertbereich von 3–11 generiert werden.

Die Titrationskurve von BSA war bereits 1955 als eines der ersten titrierten Proteine überhaupt von Tanford et al. publiziert worden (Tanford et al. 1955). Einige Datenpunkte dieser Publikation sind in Abbildung 90 den experimentellen Daten dieser Arbeit gegenübergestellt. Es zeigt sich eine weitgehend gute Übereinstimmung der beiden Datensätze über nahezu den gesamten pH-Bereich. Lediglich in extrem saurem wie alkalischem Milieu kommt es zu Abweichungen, die vermutlich auf eine unterschiedliche Probenvorbereitung der Titrationsansätze bei den beiden Studien zurückzuführen sind. In

Abbildung 90 ist der pH-Bereich 4,0 bis 6,0, der im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet wurde herausvergrößert. Bei pH 4,5 besitzt BSA eine positive Nettoladung von ca. +4 (+/- 0,36). Eine Erhöhung des pH-Wertes auf pH 5,5 führt zu einem Abfall der positiven Ladung um 11 Ladungseinheiten auf ca. -7 (+/- 0,75). Zusätzlich ändert sich bei pH 4,8 das Ladungsvorzeichen und bei pH 5,0 ist BSA mit ca. -2 (+/- 0,35) bereits netto negativ geladen. Die bestimmten Ladungsunterschiede sind in diesem leicht sauren Milieu dabei nahezu ausschließlich auf die Entstehung neuer negativer Ladungen durch Deprotonierung von α -COOH oder Carboxylgruppen der Aminosäureseitenketten zurückzuführen. Obwohl die pK_a -Werte der einzelnen Aminogruppen eines Proteins von der lokalen, molekularen Umgebung innerhalb der Tertiärstruktur der Spezies abhängen, findet die erste potentielle Deprotonierung einer Aminofunktion bei einem pH von ca. 6,5 durch die Deprotonierung des Imidazolstickstoffs im Imidazolring des Histidins statt (Tanford 1961; Fergg et al. 1994). BSA behält also folglich seine Verteilung an positiven Ladungen über den gesamten pH-Bereich von 4,5–5,5 nahezu bei, auch wenn sich das Vorzeichen der Gesamtnettoladung ändert.

An dieser Stelle sei zusätzlich erwähnt, dass BSA im sauren Milieu ab pH 4,5 und im basischen ab pH 10,5 expandiert (Tanford et al. 1955; Tanford et al. 1955). Im Vergleich zu Titrationskurven, anderer Proteine wie z.B. Ribonuklease ist dieses Phänomen durch eine extreme(n) Steigung, bzw. Abfall der Titrationskurven in diesen beiden Regionen zu beobachten, in denen offensichtlich durch die Expansion sehr viele neue geladene Gruppen im Protein zugänglich werden (vgl. (Tanford 1961) mit Abb. 65). Während über die Expansion des Moleküls im basischen Milieu bei pH > 10,5 nicht sehr viel bekannt ist, ist der Übergang bei pH < 5,0 gut charakterisiert (Tanford et al. 1955; Arvidsson 1972; Raj und Flygare 1974; Gaigalas et al. 1992). Bei dieser sogenannten N-F Isomerisierung werden durch die Erniedrigung des pH-Wertes Carboxylgruppen protoniert, die zuvor der Hypothese nach eine kompakte Molekülstruktur durch die Ausbildung von Salzbrücken stabilisieren. Durch die Protonierung der Carboxylgruppen werden diese Brücken zerstört und das Molekül kann durch die verstärkte Einlagerung von Lösungsmittelmolekülen expandieren (Arvidsson 1972). Dieser Vorgang ist nach Tanford et al. zunächst ein Alles-oder-Nichts-Prozess, da die Salzbrücken bei einem bestimmten pK_a -Wert „brechen“ (Tanford et al. 1955). Neure Studien durch quasielastische Lichtstreuung zeigen, dass der reversible Übergang wahrscheinlich kontinuierlich verläuft, bereits bei einem pH-Wert von < 5,0 beginnt und vorwiegend auf die Beteiligung elektrostatischer Wechselwirkungen zurückzuführen ist, da das Expansionsausmaß mit niedrigerer Ionenstärke steigt (Raj und Flygare 1974). Die Expansion des Moleküls kann bis zu einem pH-Wert von 2 beobachtet werden und verändert maßgeblich die Eigenschaften des Moleküls, wie z.B. die Viskosität (Tanford 1961) und den Diffusionskoeffizienten in freier Lösung (Raj und Flygare 1974). Die Änderung dieser Eigenschaften in Abhängigkeit vom pH-Wert könnte bei der Erklärung von

Transporteigenschaften unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen eine wichtige Rolle spielen und wird im Zusammenhang mit den kinetischen- und mechanistischen Untersuchungen später noch näher diskutiert (s. 5.3; 5.4 u. 5.5).

Die experimentellen Daten für den monoklonalen IgG2a-Antikörper (mIgG), die analog der BSA-Titration erzeugt wurden, sind in Abbildung 91 dargestellt sind.

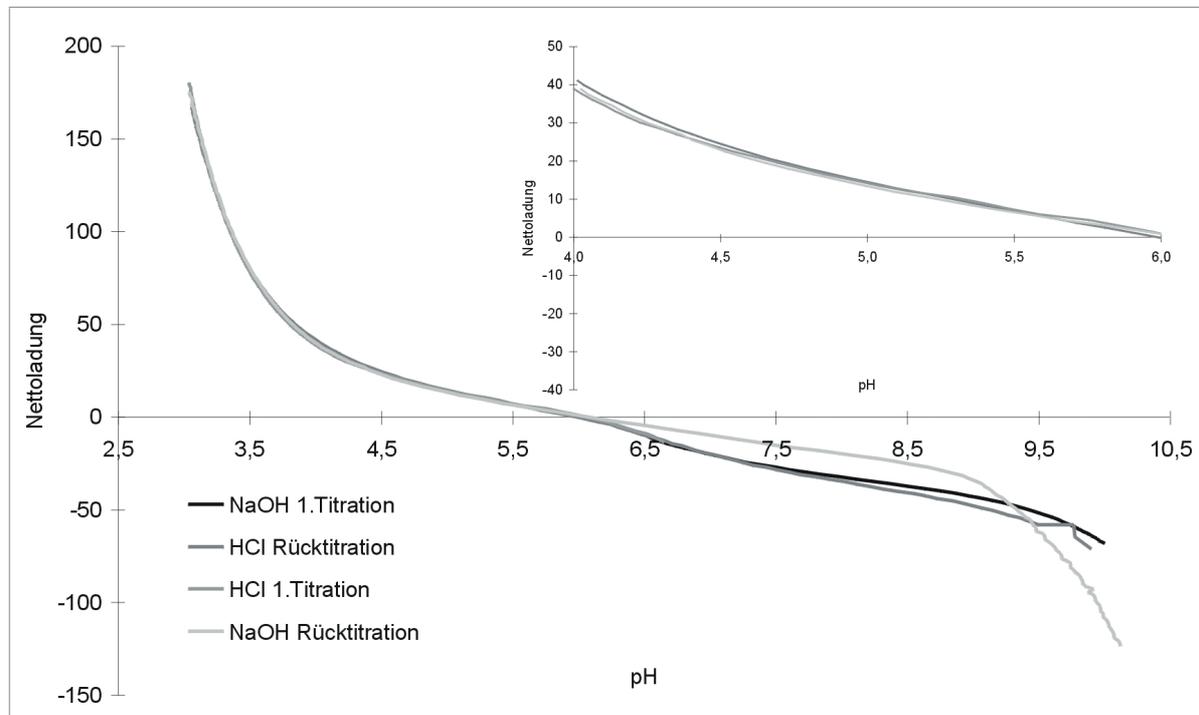


Abbildung 91: Titrationskurven einer wässrigen Proteinlösung des monoklonalen Antikörpers mIgG. Untersuchter pH-Bereich von 4,0 bis 6,0 ist herausvergrößert

Der Verlauf der Kurven zeigt, dass es ab dem isoelektrischen Punkt von 6,0 zu basischen pH-Werten hin zu einer relativ großen Abweichung der einzelnen Titrationsverläufe kommt. Die NaOH-Rücktitration einer Probe, die zuvor mit HCl bis zu einem pH-Wert von 3 titriert wurde, zeigt eine deutliche Abweichung von den restlichen „basischen“ Titrationsverläufen (s. Abb. 91). Wahrscheinlich ist es hier zu einer irreversiblen Denaturierung, bzw. Veränderung des Proteins gekommen. Analog zu BSA könnte es auch bei dem monoklonalen Antikörper im sauren Bereich zu einer Veränderung der Molekülkonformation kommen. Ab pH 4,0 nimmt die Steigung der Titrationskurve zu niedrigeren pH-Werten hin deutlich zu, was auf eine der BSA-Expansion vergleichbare Konformationsänderung schließen lässt, da auch hier auf einmal sehr viele neue Ladungsträger zugänglich werden.

Im Gegensatz zur BSA-Expansion ist diese Veränderung beim mIgG aber nicht reversibel, da sich der Titrationsverlauf in der Folge ändert (s. Abb. 91). Solche irreversiblen Veränderungen sind auch schon für andere Proteine, wie z.B. für die Ribonuklease und das Hämoglobin (Hb) beschrieben worden (Tanford 1961). In dem im Rahmen dieser Arbeit

interessanten pH-Bereich von 4,5 bis 5,5 verlaufen die Titrationskurven jedoch eindeutig. Insgesamt werden dabei 16 Ladungen verschoben, was analog dem BSA wiederum durch Deprotonierung von α -COOH oder Carboxylgruppen der Aminosäureseitenketten in diesem pH-Bereich zu erklären ist. Der isoelektrische Punkt des mIgG, bzw. Nullpunkt der Titrationskurve bei pH 6,0 führt dazu, dass das Protein netto von pH 4,5 bis 5,5 immer positiv geladen vorliegt.

Bei pH 4,5 beträgt der Ladungszustand des Moleküls ca. +23 (+/- 0,81), der sich durch eine Erhöhung des pH-Wertes zunächst um 9 Ladungen auf ca. +14 (+/- 0,31) bei pH 5,0 und schließlich auf ca. +7 (+/- 0,31) bei pH 5,5 ändert.

Auf die Ladungsverteilung wird im Zusammenhang mit den kinetischen Experimenten noch einmal ausführlich eingegangen (s. 5.3, 5.4 u. 5.5).

5. Diskussion

5.1 Validierung des experimentellen Systems

Die Optimierung und Neuentwicklung von Transportvisualisierungs- und Messmethoden mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie war das Hauptziel des Projektes. Bei allen konfokalmikroskopischen Untersuchungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, war eine kovalente Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine nötig, da die verwendeten konfokalen Laser-Raster-Mikroskope selektiv angeregte Fluoreszenzemissionen zur Bildgebung nutzen.

Die Möglichkeit einer Anregung der „natürlichen“ Proteinfluoreszenzemission, der aromatischen Aminosäuren konnte keines der im Rahmen des Projektes zugänglichen Geräte aufgrund fehlender UV-Optik und dem zugehörigen UV-Laser leisten. Bei den durchgeführten parallelen Untersuchungen mehrerer Proteinspezies (s. 4.5 u. 4.6) hätte die Fluoreszenzemission der aromatischen Aminosäuren aber nur im Falle der Einkomponentenadsorption eine echte Alternative darstellen können, da nahezu alle Proteine aromatische Aminosäuren besitzen und deshalb verständlicherweise nur ein Gesamtsignalsignal visualisiert werden könnte. Das gleiche Problem würde sich auch bei der Quantifizierung der einzelnen Proteine in der Flüssigphase durch konventionelle Fluoreszenzspektroskopie ergeben.

Zusätzlich eröffnet die Möglichkeit der Modifizierung von Proben eines Proteins mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Anregungs- und Emissionscharakteristika die zeitabhängige Lokalisierung des gebundenen Proteins innerhalb des Porennetzwerk des Adsorberpartikels zu erfassen. Für den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen müssen zwei wichtige Grundvoraussetzungen erfüllt sein, um die experimentellen Ergebnisse auf das unmodifizierte Protein übertragen zu können.

Einerseits darf das Protein durch die Kopplungsreaktion nicht gravierend verändert werden und die modifizierten Proteinspezies sollen ihre ursprünglichen biochemischen- und chromatographischen Eigenschaften weitgehend beibehalten.

Zum Anderen muss die Fluoreszenzemission des selektiven Markers unter den experimentellen Bedingungen nahezu ungelöscht und unabhängig im Partikel und in freier Lösung mit den verwendeten Geräten detektierbar sein.

Diese beiden Grundannahmen verlangten nach einer genauen biochemischen- (s. 4.1.1) und optischen Charakterisierung (s. 4.1.2) der Fluoreszenzfarbstoffe und Proteinkonjugate.

Bei den Untersuchungen kamen vier verschiedene Fluorophore mit teilweise unterschiedlichen spektralen Eigenschaften zum Einsatz. Eine mögliche Anregung mit den zur Verfügung stehenden Argon/Krypton-Mischgaslaserlinien (488 nm, 568 nm u. 647 nm) war das Hauptauswahlkriterium für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die Kopplungsreaktion erfolgte bei allen Fluorophoren unter nahezu den gleichen, experimentellen Bedingungen (s. 3.5).

Die beiden Fluoreszeinderivate Oregon GreenTM488 und AlexaTM488, bzw. die Cyaninfarbstoffe Cy3 und Cy5 sind strukturell sehr ähnlich (s. Anhang A). Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des verwendeten, monoklonalen Antikörpers wurden die meisten Charakterisierungsversuche, sowie die später diskutierten Intensitätsexperimente hauptsächlich mit BSA und den fluoreszenzmarkierten BSA-Konjugaten durchgeführt.

Die Bandbreite der durch isoelektrische Fokussierung bestimmten pI-Werte für das unmodifizierte BSA reichte von 4,68 – 4,77. Diese Ergebnisse liegen rund 0,1 pH-Einheiten unter den von Salaman et al. publizierten pI-Werten 4,78 – 4,86 (Salaman und Williamson 1971).

Im Vergleich dazu liegen die bestimmten Abweichungen der Proteinkonjugate von maximal 1,3 %, bzw. 0,06 pI-Einheiten in diesem Bereich. In früheren Studien wurde beschrieben, dass die Änderung einer Ladung am BSA-Molekül zu einer Änderung des pI-Wertes um 0,07 pI-Einheiten führen kann (Spencer und King 1971). Zieht man diesen Wert hinzu und vergleicht ihn mit den ermittelten Differenzen der pI-Werte, so ändert sich durch die Modifizierung der Proteine die Nettoladung um ca. eine Ladungseinheit pro Proteinmolekül.

Wallevik beobachtete eine gravierende Erhöhung des isoelektrischen Punktes von BSA auf 5,24, bzw. 5,45 durch chemische und thermische Denaturierung des Proteins und Entfernung der gebundenen Fettsäuren (Wallevik 1973). Eine partielle Denaturierung des Proteins durch die Reaktionsbedingungen der Kopplungsreaktion würde den pI-Wert erhöhen. Die Ergebnisse zeigen aber bei allen untersuchten Konjugaten keine signifikanten Abweichungen der bestimmten isoelektrischen Punkte. Daraus kann geschlossen werden, dass die Konformation von BSA sich durch die Kopplung nur unwesentlich ändert.

Weitere Hinweise für eine Übereinstimmung der biochemischen- und besonders die chromatographischen Eigenschaften, lieferten die Elutionsstudien mittels analytischer Gelpermeations- und Ionenaustauschchromatographie. Die ermittelten prozentualen Abweichungen der Proteinkonjugate bezogen auf die unmarkierte Spezies sind in Abbildung 92 noch einmal gegenübergestellt. Die Fehlerbalken bezeichnen die prozentualen Standardabweichungen der Mehrfachbestimmung. Die Fehler der beiden unmarkierten Proteinspezies können als methodische Fehler angesehen werden und geben die allgemeine Bestimmungsgenauigkeit für die beiden Proteine an.

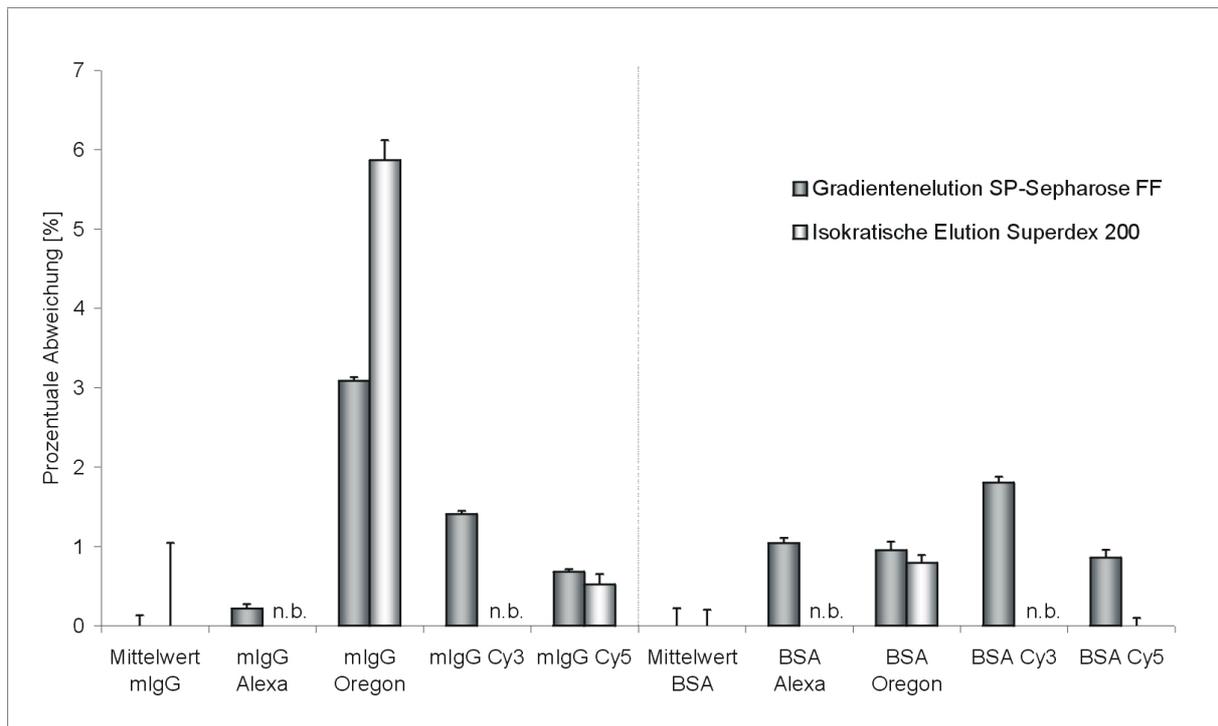


Abbildung 92: Prozentuale Abweichungen der einzelnen Farbstoffkonjugate des monoklonalen Antikörpers und BSA im Elutionsverhalten von Superdex 200 (isokratische Elution) und SP-Sepharose FF (Elution im linearen Salzgradienten). Fehlerbalken zeigen den prozentualen Standardabweichungen der Bestimmungsmethode (n = 2 – 6); (n.b. = nicht bestimmt)

Bei den durchgeführten Gelfiltrationsexperimenten zeigen lediglich die K_{av} -Werte der Oregon Green-Konjugate des monoklonalen Antikörpers (mlgG) und BSA signifikante Abweichungen im Vergleich zur unmarkierten Spezies. Die größte Abweichung beträgt hierbei ca. 6 % im Falle des mlgG-Konjugats. Bei diesem Konjugat wurde auch bei Elution im linearen Salzgradienten mit 3,1 % die größte Abweichung in der Serie ermittelt. Dieser Farbstoff scheint sich von den untersuchten Fluorophoren am wenigsten zur Kopplung an den monoklonalen Antikörper zu eignen.

Moussaoui et al. bestimmten zur Validierung ihres Systems die K_{av} -Werte von den eingesetzten FITC-Konjugaten im Vorfeld einer „Fluorescence Recovery After Photobleaching“, bzw. FRAP-Studie über die diffusiven Eigenschaften von Proteinen in Sepharose CI-B Gelfiltrationsmaterialien (Moussaoui et al. 1992). Für die Proteine Ribonuklease, Chymotrypsinogen A, Ovalbumin, Aldolase und Thyroglobulin ermittelten die Autoren in Abhängigkeit von der Größe der Proteine prozentuale Unterschiede der K_{av} -Werte im Vergleich zu den unmarkierten Spezies von 8,75 % – 0,9 %. Somit liegt die im Rahmen dieser Arbeit größte gefundene Abweichung von 6 % im Bereich der Literaturwerte. Interessant ist dabei, dass auch bei der Literaturstudie nahezu alle bestimmten K_{av} -Werte der

markierten Spezies größer und nicht, wie erwartet kleiner als die Bezugswerte der unmarkierten Spezies waren (Moussaoui et al. 1992). Analog zu den Beobachtungen dieser Arbeit wird die Retention im porösen Netzwerk des Gelfiltrationsmaterials durch die Kopplung des Fluoreszeinfarbstoffes auch für diese Proteine erhöht. Aufgrund der Stöchiometrie der Kopplungsreaktion und der damit verbundenen Molekulargewichtszunahme können nur unspezifische Wechselwirkungen mit der Gelmatrix für diesen Effekt verantwortlich sein.

Im Rahmen des Projektes bewegten sich die erhaltenen Markierungsgrade (D/P) bei beiden Modellproteinen in Abhängigkeit vom verwendeten Fluorophor zwischen 0,4 – 2. Das Molekulargewicht M_w der Fluorophore ist nach Abspaltung der Succinimidylestergruppe zwischen 400 Da und 700 Da und das entspricht einer Massenzunahme pro konjugiertem Farbstoff von ca. 0,8 % für BSA und bei dem verwendeten monoklonalen Antikörper sogar nur rund 0,4%.

Der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green wurde im Verlauf der Untersuchungen bei den Multicoloranalysen durch ein anderes Fluoreszeinderivat, den AlexaTM488 Fluoreszenzfarbstoff ersetzt. Mit diesem Molekül wird bei einem viel kleineren Markierungsgrad (D/P) von ca. 0,4 (vgl. Oregon Green ~ 2) immer noch ein gute Quantenausbeute unter den experimentellen Bedingungen erhalten und die Substanz ist auch wesentlich photo- und pH-stabiler (Verschiedene 1999). Das zugehörige Alexa-Konjugat zeigt im Vergleich zum Oregon Green Derivat des mIgG nur eine sehr geringe Abweichung im Elutionsverhalten von einer SP-Sepharose FF Matrix.

Mit Ausnahme der mIgG-Oregon Green Eigenschaften liegen alle bestimmten, chromatographischen Abweichungen unter 2%. Bei den bestimmten Retentionszeiten R_t im linearen Salzgradienten von einer SP-Sepharosematrix waren die R_t -Werte aller Proteinkonjugate mit Ausnahme des BSA-Oregon-Konjugates etwas kleiner, als der zugehörige Bezugswert des unmarkierten Proteins. Wahrscheinlich ist die kürzere Retention in einem kopplungsbedingten Wegfall positiver Ladungen und damit potentieller Bindungsstellen des Proteins an die Sulfopropylgruppen der Kationentauschermatrix begründet.

Eine verstärkte Denaturierung und Aggregation von Protein nach der Kopplungsreaktion konnte nicht beobachtet werden. Die beiden untersuchten Proteine mIgG und BSA besitzen keine enzymatische Aktivität, deshalb können anhand der Ergebnisse dieser Arbeit keine Rückschlüsse auf eine mögliche Beeinflussung der biologischen, bzw. enzymatischen Aktivität durch die Kopplung gezogen werden. Malmsten et al. untersuchten jedoch konfokalmikroskopisch die Ligandenverteilung von immobilisiertem Trypsin in Methacrylatpartikeln und setzten dabei fluoreszenzmarkiertes

Trypsin ein. Dort wurden zumindest in freier Lösung keine Anzeichen für einen Aktivitätsverlust durch eine Kopplung von Fluorophoren gefunden (Malmsten et al. 1999).

Aus der biochemischen- und chromatographischen Charakterisierung folgt, dass die kovalente Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die beiden untersuchten Proteine bei einem Markierungsgrad von bis zu 2 im Hinblick auf Transportuntersuchungen mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie kein Risiko darstellt. Eine Übertragung der experimentellen Resultate auf das Verhalten der unmarkierten Proteinspezies ist daher zulässig.

Für jedes andere experimentelle System sollten im Vorfeld der Transportuntersuchung mit konfokalen Methoden Charakterisierungsexperimente, wie z.B. die hier diskutierten, durchgeführt werden, um das Ausmaß der kopplungsbedingten Änderungen in bezug auf die biochemischen- und chromatographischen Eigenschaften zu verifizieren.

Im Rahmen der Experimente, die zur optischen Charakterisierung der Farbstoffe und Farbstoffkonjugate durchgeführt wurden, stand vor allem ein möglicher Einfluss der Adsorbermatrix und anderer anwesender Fluorophore im Vordergrund der Untersuchungen. Die gezeigten, homogenen Sättigungsprofile weisen für SP-Sepharose FF, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, eindeutig auf einen untergeordneten Einfluss von Attenuations- und Abberationseffekten hin. Es liegen weiterhin Ergebnisse für Protein-A-Sepharose von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) vor, nach denen die Matrix auch „optisch inert“ war (Linden et al. 1999). Ein reiner Agarosepartikel ist folglich als Träger für solche Untersuchungen gut geeignet.

Bei Verwendung eines anderen Trägermaterials sind die beiden Effekte bereits beobachtet worden. Malmsten et al. erhielten bei einer konfokalmikroskopischen Studie mit Glycidyl-Methacrylatträgern über die Ligandenverteilung von immobilisiertem Trypsin Fluoreszenzintensitätsprofile, die auf den Einfluss solcher Effekte zurückzuführen waren (Malmsten et al. 1999). Trotz angenommener, homogener Trypsinverteilung war in den Fluoreszenzintensitätsprofilen über den Durchmesser der Glycidyl-Methacrylatpartikel nach der Immobilisierung ein deutliches lokales Minimum der detektierten Fluoreszenzemission in den inneren Regionen der Partikel zu beobachten (vgl. Abb. 32). Durch Zusatz von Saccharose und die damit verbundene Änderung des Brechungsindex konnten die Autoren die Fluoreszenzintensitätsprofile korrigieren und die vorliegende homogene Immobilisierung von Trypsin experimentell überprüfen (Malmsten et al. 1999). Diese Möglichkeit des Zusatzes von Substanzen, wie Saccharose oder Glycerin könnte gegebenenfalls zum Angleich des Brechungsindex von der umgebenden Lösung mit der Matrix herangezogen werden, wenngleich bei Adsorptionsmessungen ein Einfluss dieser Substanzen auf die Sorptionskinetik nicht auszuschließen ist. Sinnvoller wäre darum eine Korrektur der Fluoreszenzintensitätsprofile mit mathematischen Methoden, die in der Literatur beschrieben

sind. (Visser et al. 1991; Roerdink und Bakker 1993; Liljeborg 1996; Margadant et al. 1996; Booth et al. 1998).

Der Einfluss der Anwesenheit anderer Fluorophore bildete einen weiteren Schwerpunkt bei der Validierung des experimentellen Systems. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bis zu drei unterschiedliche Fluorophore bei den Untersuchungen eingesetzt. Die Fluoreszenzspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe FITC; Cy3 und Cy5 besitzen die für einen Fluoreszenzenergieübertragung erforderliche Überlappung, insbesondere wenn man das Emissionsspektrum der FITC-Derivate und das Anregungsspektrum von Cy3 betrachtet. Die Ergebnisse (s. 4.1.2.4) weisen aber deutlich darauf hin, dass Fluoreszenzlöschungprozesse wie Fluoreszenz Resonanz Energieübertragung (FRET), bzw. „Förster“ Transfer bei den entwickelten Untersuchungsmethoden nur eine untergeordnete Rolle spielen. Unabhängig von der Farbstoffzusammensetzung im Experiment können folglich mit der vorhandenen Messtechnik reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

Die Überlappung des Emissionsspektrums der Donorfluoreszenz mit dem Anregungsspektrum des Akzeptorfluorophores ist, wie bereits im theoretischen Teil erwähnt, auch nur eine Voraussetzung für das Entstehen eines Singulett-Energieübertransfers. Zusätzlich müssen sich für einen FRET das Donor- und Akzeptormolekül räumlich sehr nahe kommen (< 10 nm) und die beiden Übergangsdipole müssen für einen Transfer eine geeignete Orientierung besitzen (z.B. (Cantor und Schimmel 1980)). Dies trifft offensichtlich bei dem Adsorptionsexperiment nicht zu.

5.2 Intensitätsexperimente

Bei den Transportuntersuchungen diente die lokal aufgelöste Fluoreszenzemission der Fluorophore aus dem Fluoreszenzintensitätsprofil zur Quantifizierung der Adsorptionsprozesse. Die relative Kapazität Q_{rel} , die aus den Fluoreszenzprofilen berechnet wurde, ist neben der Konzentration an Fluorophoren, bzw. fluoreszenzmarkiertem Protein vor allen Dingen von den Instrumenteneinstellungen, wie der Laserintensität und der Detektorempfindlichkeit, sowie der Breite der konfokalen Lochblende abhängig (s. 2.5.3.2).

Um für diese Parameter Betriebsfenster für die im Projekt verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zu finden, wurden Intensitätsexperimente mit verschiedenen BSA-Proteinkonjugaten durchgeführt. Die Variation der Farbstoffkonzentrationen im Partikel stand dabei neben den Geräteparametern im Vordergrund. Eine vergleichbare Untersuchung mit verschiedenen Konzentrationen der fluoreszenzmarkierten Spezies wird oft auch im Vorfeld von Diffusionskoeffizientenbestimmungen mittels „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ durchgeführt (Cutts et al. 1995; De Smedt et al. 1997).

Die Fluorophorkonzentration im Partikel kann über die Verdünnung der Proteinkonjugate mit unmarkiertem Protein bei gegebenen experimentellen Bedingungen individuell eingestellt

werden. Ein paralleler Einsatz von markierten BSA und unmarkiertem Protein ist unbedenklich, wie durch die bereits diskutierten Validierungsexperimente gezeigt wurde (s. 4.1). Mit zunehmender Verdünnung des markierten Proteinkonjugates sinkt aufgrund einer vergleichbaren Bindungsaffinität der beiden Spezies auch die Konzentration der immobilisierten Fluorophore im Partikel.

Einerseits ist eine möglichst hohe detektierbare Fluoreszenzintensität, bzw. Fluoreszenzfarbstoffkonzentration erwünscht. Bei den Messungen mit dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop ergibt sich unter diesen Bedingungen ein günstigeres Signal/Rauschverhältnis, bedingt durch eine geringere Detektorspannung, die eingestellt werden muss. Letztendlich wird dadurch die Empfindlichkeit der Detektion gesteigert. Zusätzlich kann auch unter relativ schonenden Anregungsbedingungen, bzw. bei niedrigeren Laserintensitäten gearbeitet, und damit der Einfluss von „Photobleaching-Effekten“ unterdrückt werden (s. 2.5.1).

Auf der anderen Seite kann eine hohe Fluorophorkonzentration im Partikel das Messergebnis verfälschen, da keine lineare Abhängigkeit mehr zwischen der Fluoreszenzintensität und der Fluorophor-, bzw. Konjugatkonzentration besteht. In den untersuchten Konzentrationsbereichen kam es bei allen Fluorophoren bereits zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Abweichungen von einer linearen Korrelation. Die Abweichung resultierte aus einer zu klein bestimmten relativen Kapazität bei hohen Fluorophorkonzentrationen und war in allen Fällen auf ein zu gering detektiertes Fluoreszenzsignal aus der Partikelmitte zurückzuführen (s. Abb. 49).

Aufgrund der kugelförmigen Geometrie wirken sich die beiden potentiell verantwortlichen Effekte der Reabsorption emittierter Fluoreszenzstrahlung, als auch das „inner filtering“ von Anregungslicht in der Mitte des Partikels am stärksten aus, da das Anregungslicht, aber auch die emittierte Fluoreszenzstrahlung hier die längste Strecke durch das mit Fluorophoren gesättigte Partikel zurücklegen müssen.

In weiteren Studien wurde durch Variation der Messparameter versucht, den physikalischen Ursachen näher auf den Grund zu gehen, bzw. herauszufinden welcher Effekt hauptsächlich für den Intensitätsverlauf des Fluoreszenzprofils bei konzentrierten Fluorophorlösungen verantwortlich ist.

Eine Variation der Laserintensität könnte dabei einen „inner filter“ Effekt im Partikel eindämmen, da wahrscheinlich mit zunehmender Laserintensität mehr Photonen die Partikelmitte erreichen und dort Fluorophore anregen können. Die Laserintensität beeinflusste aber nur die Steigung der Korrelation zwischen Q_{rel} und der Fluorophorkonzentration in der Weise, dass in allen Fällen bei höherer Laserintensität auch ein stärkerer Anstieg zu verzeichnen war. Eine Erhöhung der Laserintensität hatte aber keine Auswirkungen auf die Fluoreszenzintensitätsprofile konzentrierterer Ansätze (s. Abb. 50).

Die Eindämmung eines „inner filter“ Effektes durch Erhöhung der Laserintensität ist oft unzureichend, da es mit der Erhöhung der Anregungsenergie auch zu einer verstärkten Fluoreszenzsättigung und nicht zuletzt dadurch bedingt zu erhöhtem „Photobleaching“ der Fluorophore in der fokussierten Ebene kommt. Durch Erhöhung der Anregungsintensität befinden sich bei der Abrasterung der fokussierten Ebene mit dem Laser des Konfokalmikroskopes viel mehr Moleküle im angeregten Zustand und stehen deshalb zur weiteren Anregung und Emission innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer nicht zur Verfügung (Visscher et al. 1994). Der Fluoreszenzsättigungseffekt wirkt sich zunächst auf alle Fluorophore in der betrachteten Ebene gleichermaßen aus. Die Fluoreszenzlebensdauer, bzw. die Verweilzeit der Moleküle im angeregten Zustand ist auch sehr stark von der molekularen Umgebung und der Position im Untersuchungsobjekt abhängig (Pawley 1995). Die molekulare Umgebung ist bei dem in dieser Arbeit betrachteten System wahrscheinlich über das gesamte Partikelvolumen nahezu gleich, trotzdem kann die Erhöhung der Laserintensität netto zu keiner Eindämmung des „inner filter“ Effektes führen.

Zwei Messeinstellungen, die einen „inner filter“ Effektes deutlich eindämmen würden, sind die „Near Peak“ und die „Off Peak“ Anregung, die aber im Rahmen des Projektes aufgrund fehlender Laserausstattung nicht zur Verfügung standen (van Oostveldt und Bauwens 1990); (Pawley 1995). Bei der „Near Peak“ Anregung wird Anregungslicht mit Wellenlängen fernab des Anregungsmaximums des Fluorophores zur Anregung verwendet. Dadurch sinkt die Gesamt ereigniswahrscheinlichkeit einer Anregung, die jedoch in der fokussierten Ebene noch am größten ist.

Die „Off Peak“ Anregung, die z.B. durch Zwei-, bzw. Multiphotonanregung erzielt werden kann, vermindert ein „inner filtering“, da hierbei die Anregung ausschließlich in der fokussierten Ebene stattfindet und das Laserlicht in anderen Sektionen des Objekts zu wenig Energie zur Anregung von Fluorophoren besitzt (s. 2.5.4.2). Die Zwei-, bzw. Multiphotonanregung wird bei Konfokalmikroskopen neuerer Bauart selbst zur konfokalen Auflösung von Fluoreszenzsignalen, ohne die Verwendung von konfokalen Lochblenden, genutzt (Pawley 1995). Diese Messmöglichkeiten könnten in unserem experimentellen System den Einfluss eines „inner filter“ Effektes“ klar von der Reabsorption trennen.

Die Reabsorption emittierter Fluoreszenzstrahlung von anderen Farbstoffmolekülen kann durch eine Fluoreszenzdetektion außerhalb des Anregungsspektrums des Fluorophores weitgehend unterbunden werden (Tanke et al. 1982). Es war jedoch durch Variation des Detektionsfensters zu längerwelliger Strahlung hin, keine Verbesserung der Fluoreszenzintensitätsprofile bei höherer Fluorophorkonzentration zu beobachten (s. 4.2). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass Reabsorption emittierter Fluoreszenzstrahlung wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle spielt und folglich die Abweichungen hauptsächlich durch den „inner filter“ Effekt entstehen müssen.

Van Oostveldt und Bauwens untersuchten bei einer vergleichbaren Studie mit fluoreszenzmarkiertem Chromatin in Vogelerythrocyten die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der p-Fuchsinkonzentration mit konventioneller und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (van Oostveldt und Bauwens 1990). Verschiedene Fluorophorkonzentrationen wurden dabei durch unterschiedliche Inkubationszeiten der Erythrocyten mit dem Färbereagenz, während der Markierung des Chromatins erhalten. Die Autoren führten die Konzentrationsabhängigkeit der detektierten Fluoreszenzemission im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit anhand der verwendeten Geräteeinstellungen und Filter vorwiegend auf Reabsorption zurück. Versuche einer „Near Peak“ Anregung führten zu keiner Vergrößerung des Linearitätsbereichs und folglich spielt der „inner filter“ Effekt nur eine untergeordnete Rolle (van Oostveldt und Bauwens 1990).

Gleichzeitig konnten sie in Ihrer Untersuchung zeigen, dass die Breite der konfokalen Lochblende keinen signifikanten Einfluss auf die lineare Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und der Fluorophorkonzentration hat (van Oostveldt und Bauwens 1990). Die Breite der konfokalen Lochblende wurde im Rahmen der Untersuchungen nicht verändert, da bei Transportuntersuchungen in porösen Adsorberpartikeln mit der höchstmöglichen axialen Auflösung gearbeitet werden sollte. Aufgrund der kugelförmigen Gestalt des Untersuchungsobjektes würde bei einer niedrigen axialen Auflösung das Ergebnis durch detektierte Emissionen von darüber- und darunter liegenden Schichten stark verfälscht werden.

Auf eine Veränderung der Detektorempfindlichkeit wurde bei dieser Untersuchung als Messparameter für die einzelnen Fluorophore auch verzichtet. De Smedt et al. konnten in einer vergleichbaren Studie im Vorfeld einer FRAP Untersuchung zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von FITC-Dextranen in Dextran Methacrylatlösungen und -gelen zeigen, dass sich durch die Erhöhung der Detektorspannung bei einer Konzentrationsreihe von FITC-Dextranen analog zu einer Erhöhung der Laserintensität nur die Steigung der Korrelation ändert und der Linearitätsbereich unbeeinflusst bleibt (De Smedt et al. 1997).

Für alle eingesetzten Fluorophore konnten Arbeitsbereiche definiert werden, in denen das Fluoreszenzsignal und folglich auch die daraus berechnete relative Kapazität Q_{rel} zur Fluorophorkonzentration eine lineare Abhängigkeit besitzt. Tabelle 24 fasst die ermittelten Konzentrationsbereiche noch einmal zusammen.

Tabelle 24: Operationsfenster einzelnen Fluorophore. * Fluorophorkonzentrationen berechnet nach Gleichung 38 unter 3.6.2

Fluoreszenzfarbstoff	Linearer Arbeitsbereich [mM]
Alexa™488	$\leq 0,2 \text{ mM}^*$
Oregon™488	$\leq 0,4 \text{ mM}^*$
Cy3	$\leq 0,3 \text{ mM}^*$
Cy5	$\leq 0,2 \text{ mM}^*$

Die angegebenen Konzentrationsgrenzen können in dem betrachteten experimentellen System mit guter Näherung als universelle Richtwerte angesehen werden.

Bei der Planung von Transportuntersuchungen mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie kann mit Hilfe dieser Werte bei einem bekannten Markierungsgrad (D/P) des Proteinkonjugates durch Umstellen von Gleichung 38 die minimale Verdünnung mit unmarkiertem Protein berechnet werden, die nötig ist um bei einem möglichst intensiven Fluoreszenzsignal noch im linearen Messbereich arbeiten zu können. Als zusätzliche Information wird lediglich noch die maximale Kapazität Q_{\max} des Proteins unter den experimentellen Bedingungen benötigt, die durch eine Anpassung von experimentellen Gleichgewichtsdaten mit dem Adsorptionsmodell nach Langmuir bestimmt werden kann.

Streng genommen gelten die Werte in Tabelle 24 nur für das Adsorptionssystem BSA und SP-Sepharose in 50 mM Acetatpuffer pH 5,0, da die enge Bindung des Fluorophors an das Protein, sowie Konzentration und pH-Wert des Puffers die spektralen Eigenschaften der Fluorophore verändert. Neben einem anderen Mikromilieu, das die Proteinstruktur dem Fluoreszenzfarbstoff bietet, ändern sich bei höheren Markierungsgraden auch die Strahlungseigenschaften der Fluorophore durch die weitgehend feste Orientierung und die dadurch resultierenden Löscheffekte am Proteinmolekül. Bei Fluoreszein kommt es nachweislich bei Markierungsgraden (D/P) von 6 – 16 zu einer Abweichung der Linearität zwischen der Fluoreszenzemission und dem Markierungsgrad (Der-Balian et al. 1988); (Verschiedene 1999). Für die anderen Fluorophore dürften die Auswirkung solcher Effekte im gleichen Bereich liegen. Bei den durchgeführten Transportuntersuchungen lag der Markierungsgrad (D/P) für beide Proteine zwischen 0,4 – 2 Farbstoffmolekülen pro Proteinmolekül. Der Einfluss solcher Effekte über den Markierungsgrad ist demnach auszuschließen.

Mit einer drastischen Änderung der fluoreszierenden Eigenschaften der Farbstoffe, bedingt durch die unterschiedlichen, experimentellen Bedingungen, ist aufgrund der kleinen pH-Wert und Konzentrationsänderungen nicht zu rechnen.

Für ein anderes Adsorptionssystem unter völlig anderen experimentellen Bedingungen und anderer Adsorbermatrix sollte in jedem Fall die Linearität zwischen der Fluoreszenzintensität und lokaler Adsorption z. B. mit den gezeigten Intensitätsexperimenten überprüft und neue Betriebsbedingungen definiert werden.

5.3 Einkomponentenadsorption

Ljunglöf und Thömmes führten grundlegende Untersuchungen bei Adsorption von einem Protein an chromatographische Träger mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie durch, die letztendlich zu der Aufgabenstellung dieser Arbeit führten (Ljunglöf und Thömmes 1998). Die Autoren konnten zeigen, dass bei der Einkomponentenbatchadsorption von Lysozym und humanem Immunglobulin G an verschiedene, poröse Kationenaustauschermedien, im Verlauf der Kinetik, ein linearer Zusammenhang zwischen der lokal aufgelösten Fluoreszenz der Konfokalbilder und dem gemessenen Proteinkonzentrationsabfall in der Flüssigphase besteht. Sie lieferten weiterhin die mathematische Grundlage zur Quantifizierung der gemessenen Fluoreszenzemissionen aus den Fluoreszenzintensitätsprofilen der Konfokalbilder (Ljunglöf Thömmes 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Untersuchungen auf den Einfluss verschiedener experimenteller Parameter ausgedehnt werden, um zu zeigen, in welchem Maße Unterschiede in den Adsorptionsbedingungen mit Hilfe der konfokalmikroskopischen Messtechnik abgebildet und aufgelöst werden können.

Als Modellproteine wurden im Zuge der geplanten Zweikomponentenuntersuchungen Rinderserumalbumin BSA und ein monoklonaler IgG2a-Antikörper eingesetzt.

BSA ist ein im Rahmen kinetischer Adsorptionsuntersuchungen oft verwendetes Modellprotein, da es aufgrund des relativ niedrigen Preises nahezu unbegrenzt und in einer angemessenen Reinheit (>98%) zur Verfügung steht (Skidmore et al. 1990; Yoshida et al. 1994; Habbaba und Ülgen 1997; Miyabe und Guichon 2000).

Die experimentellen Daten der BSA-Adsorptionskinetiken im thermostatisierten Rührreaktor wurden an das „Shrinking Core“ Adsorptionsmodell angepasst (s. 2.4.6.2). Mit Ausnahme der Kinetiken bei 150 mM Acetatpuffer pH 5,0 und 50 mM Acetatpuffer pH 5,5 bestätigten die Konfokalbilder der kinetischen BSA-Experimente eine Grundannahme des Adsorptionsmodells. In den Bildern wurde eine eindeutige Grenze zwischen der Region des Partikels, die bereits mit Protein gesättigt war und dem unbesetzten Partikelkern aufgelöst, der mit der Zeit „schrumpfte“.

Eine Veränderung des pH-Wertes im Vorfeld der Adsorption moduliert vor allen Dingen die Oberflächenladung der Proteine. Zwar wurde durch das verwendete Puffersystem auch die Ionenstärke des Puffers mit zunehmendem pH-Wert erhöht (s. Tab. 8), jedoch spielt diese

Erhöhung im untersuchten pH-Bereich nur eine untergeordnete Rolle und kann bei der Diskussion vernachlässigt werden.

Das Adsorptionsgleichgewicht wird bei einer Erhöhung des pH-Wertes zunehmend ungünstiger. Die Affinität von BSA halbiert sich bei einer Erhöhung des pH-Wertes von 4,5 auf 5,0 und sinkt bei einer weiteren Erhöhung nochmals um das 50-fache (s. Tab. 15).

Der Ladungszustand von BSA verändert sich im untersuchten pH-Bereich um 11 Ladungen von + 4 bei pH 4,5 nach -7 bei pH 5,5.

Bei pH 5,0 beträgt der Ladungszustand des Moleküls bereits -2, trotzdem besitzt BSA unter diesen Bedingungen eine unerwartet hohe Kapazität und ein vergleichsweise günstiges Gleichgewicht. Die Anzahl und Verteilung der positiven Ladungen ändert sich bei einer Erhöhung des pH-Wertes von 4,5 nach 5,5 nicht, weil in diesem Bereich für Ladungsänderungen bei einer Titration des Proteins ausschließlich Deprotonierungen von Carboxylgruppen verantwortlich sind (Tanford 1961). Die Erniedrigung der Affinität von BSA kommt ausschließlich durch zunehmende Abstoßung zwischen neu entstandenen, negativen Ladungen auf der Proteinoberfläche und den negativ geladenen SP-Liganden zu Stande.

Die 6 negativen Ladungen, die durch die Erhöhung des pH-Wertes auf 5,0 neu entstanden sind, scheinen an Stellen auf der Oberfläche des Moleküls lokalisiert zu sein, die die Adsorption nicht in hohem Maße behindern, obwohl das Proteinmolekül bereits eine negative Nettoladung besitzt.

Die Bestimmung der Porendiffusionskoeffizienten $D_p(\text{eff})$ aus den Batchadsorptionskinetiken ergab für BSA zunächst eine Zunahme der Mobilität des Moleküls von pH 4,5 auf pH 5,0. Die Bindungsaffinität, die einen Teil der Triebkraft des Adsorptionsprozesses bestimmt, ist im Gegensatz dazu bei pH 4,5 größer. Die Zunahme ist wahrscheinlich der bereits angesprochene Expansionseffekt des BSA-Moleküls bei pH-Werten kleiner 5,0 verantwortlich (s. 4.7). Durch die Expansion des Moleküls verändern sich maßgeblich die molekularen Eigenschaften, wie z.B. die Viskosität (Tanford 1961) und der Diffusionskoeffizient in freier Lösung (Raj und Flygare 1974). Raj et al. konnten durch quasielastische Lichtstreuung zeigen, dass sich der Diffusionskoeffizient in freier Lösung bei einer Änderung des pH-Wertes in diesem Bereich in Abhängigkeit von der Ionenstärke erhöhen oder erniedrigen kann (Raj und Flygare 1974).

Die Adsorptionsmuster der Multicoloranalysen (s. 4.5) ergaben weiterhin bei pH 4,5 und 5,0 einen reinen Porendiffusionsmechanismus. Jedes neue BSA-Molekül muss unter diesen Bedingungen bereits gebundene BSA-Moleküle passieren. Die genaue Größenänderung des Moleküls durch eine pH-Wertänderung von 4,5 auf 5,0 ist nicht bekannt. Wenn die Diffusionseigenschaften in freier Lösung durch diese Änderung bereits beeinflusst werden, dann wirkt sich eine Größenänderung des Moleküls aufgrund des gehinderten Transport des Proteins im Porennetzwerk des Adsorbers noch gravierender aus.

Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf pH 5,5 resultiert in einem stark erniedrigten Porendiffusionskoeffizienten $D_P(\text{eff})$ für BSA. Bei diesem pH-Wert besitzt das BSA-Molekül einen Ladungszustand von -7 und obwohl alle Aminogruppen bei diesem pH-Wert noch protoniert, d.h. positiv geladen vorliegen, hat sich die Verteilung der Oberflächenladungen bei pH 5,5 durch die 5 neu entstandenen, negativen Ladungen im Vergleich zu pH 5,0 sehr ungünstig entwickelt. Aus dieser Ladungsverteilung resultiert auch die hyperbolische Form der Isotherme und ein niedriger K_a -Wert (s. 4.3.3). Der Transport wird aber auch bei pH 5,5 noch weitgehend durch einen Porentransportmechanismus bestimmt, wie die Multicoloranalysen gezeigt haben (s. 4.6).

In einer weiterführenden Studie wurde zusätzlich noch die Acetatpufferkonzentration bei einem konstanten pH-Wert von 5,0 in einem Bereich von 10 – 150 mM variiert. Die damit verbundene Erhöhung der Ionenstärke bewirkt eine zunehmende Abschirmung von Ladungen und Schwächung elektrostatischer Wechselwirkungen, die den Ionenaustausch bei der Adsorption des Proteins negativ beeinflussen sollte. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Abhängigkeit von der Ionenstärke im untersuchten Bereich in Bezug auf die Geschwindigkeit und die maximale Kapazität der Adsorption einem Optimum bei 50 mM besitzt. Die maximale Kapazität Q_{max} von BSA in 10 mM Acetatpuffer ist im Vergleich zur Isotherme bei 50 mM Acetatpuffer leicht erniedrigt, während die Affinitätskonstante K_a und somit die Affinität höher ist (s. 4.3.4 Tab. 15).

Der ermittelte Porendiffusionskoeffizient $D_P(\text{eff})$ für BSA ist wiederum in 10 mM Acetatpuffer pH 5,0 deutlich niedriger als bei 50 mM. Das unerwartete Verhalten kann mit der Ionenstärkeabhängigkeit der Debye-Länge l_D erklärt werden. Die Größe der „Ionenwolke“, mit der sich ein Proteinmolekül umgibt, ist stark von der Ionenstärke des umgebenden Milieus abhängig und kann durch die Debye-Länge l_D beschrieben werden. Je kleiner die Ionenstärke, desto größer ist l_D und folglich auch die Größe der Ionenwolke. Die Reichweite elektrostatischer Wechselwirkungen ist bei kleineren Ionenstärken am größten und führt für BSA zur größten, ermittelten Affinität bei 10 mM. Gleichzeitig stoßen sich die gleich geladenen Ionenwolken der Proteinmoleküle in 10 mM Acetatpuffer am stärksten ab, was zu einem niedrigeren Bedeckungsgrad, bzw. kleinerer maximaler Kapazität Q_{max} im Gleichgewicht führt (Adam et al. 1995).

Die starren Ladungen der Sulfopropylgruppen generieren weiterhin ein Potentialfeld im Porengerüst des Adsorbers (Velayudhan und Horvath 1988). Ein Protein bekommt beim Transport durch dieses Potentialfeld eine thermische Rotationsenergie zugeführt und beginnt in der Weise zu rotieren, dass es in einer bestimmten Orientierung, bzw. Orientierungen binden kann, die die freie Reaktionsenthalpie, bzw. Gibbsenergie des gebundenen Zustandes minimiert (Allison und McCammon 1985; Warwicker et al. 1985; Velayudhan und Horvath 1988).

Die Konfokalbilder der Kinetiken haben gezeigt, dass sich Adsorberpartikel von außen nach innen mit Protein füllen. Aus den Multicoloranalysen folgte für die BSA-Adsorption bei pH 5,0, dass der Transport der Proteine im porösen Adsorber ausschließlich durch Porentransport erfolgt und jedes Proteinmolekül im Verlauf der Kinetik zunehmend Proteinmoleküle passieren muss, die bereits am Adsorber gebunden sind.

Am Poreneingang und in den Porengängen ändert sich somit im Verlauf der Kinetik durch die Wechselwirkung von BSA mit dem elektrischen Potentialfeld, das von jedem BSA-Molekül zunächst überwunden werden muss. Aufgrund der zunehmenden elektrostatischen Abstoßung der Ionenwolken wird die Kinetik verlangsamt, obwohl die Bindungsaffinität, die zum Teil die Triebkraft der Adsorption mitbestimmt, in 10 mM Acetatpuffer am größten ist. Bei einer Erhöhung der Pufferkonzentration auf 50 mM sind diese Abstoßungseffekte durch die leicht erhöhte Ionenstärke wahrscheinlich besser abgeschirmt und die Proteine können „leichter“ und vor allen Dingen auch schneller eindringen und den Adsorberpartikel sättigen. Im Zuge einer weiteren Zunahme der Acetatpufferkonzentration zunächst auf 100 mM und schließlich 150 mM ist eine zunehmend erniedrigte Mobilität von BSA zu beobachten, die sich in kleineren, effektiven Porendiffusionskoeffizienten $D_p(\text{eff})$ niederschlägt. Die Fluoreszenzintensitätsprofile der verschiedenen Ionenstärken zeigen, dass eine Erhöhung der Acetatpufferkonzentration von 100 auf 150 mM zur größten Veränderung der intrapartikulären Transportvorgänge führt (s. Abb. 57). Das Adsorptionsgleichgewicht wird mit einer Erhöhung der Acetatpufferkonzentration von 50 mM auf 150 mM zunehmend ungünstiger (s. Tab. 15). Von 50 mM auf 100 mM sinkt die Assoziationskonstante K_a von BSA nur um rund 40 %, während eine weitere Erhöhung der Pufferkonzentration auf 150 mM zu einer weiteren Erniedrigung des K_a -Wertes von 90% führt.

In den Fluoreszenzintensitätsprofilen während der Kinetik äußert sich diese Veränderung durch ein Abflachen der Adsorptionsfront bei 150 mM im Vergleich zu den Profilen bei niedrigeren Ionenstärken. Die Adsorptionsisotherme besitzt unter diesen Bedingungen einen eher hyperbolischen Verlauf. Der bestimmte R^* -Parameter liegt bei 150 mM Acetatpuffer mit 0,3 gerade noch im Gültigkeitsbereich des „Shrinking Core“ Modells und eine Bestimmung des $D_p(\text{eff})$ war aufgrund dieser Annahmen zulässig, da die Gleichgewichtslage im kinetischen Experiment ausreichend irreversibel war. Aufgrund der erzeugten Konfokalbilder und Fluoreszenzintensitätsprofile bei 150 mM beschreibt der mit dem „Shrinking Core“ Modell ermittelte $D_p(\text{eff})$ den realen Adsorptionsverlauf nur unzureichend, da offensichtlich keine steile Adsorptionsfront vorliegt, die eine weitere Voraussetzung des Modells darstellt. Weiterhin wurde in den Multicoloranalysen unter diesen Bedingungen ein partieller Weitertransport von initial gebundenem Protein beobachtet, so dass kein reiner Porentransport mehr vorliegt und eine weitere Annahme des Modells nicht erfüllt ist (s. 4.6). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass konfokalmikroskopische Analysen des

Proteintransport bei der Auswahl eines kinetischen Adsorptionsmodells helfen und Grenzbereiche der Gültigkeit definieren können.

Der verwendete, monoklonale IgG2a Antikörper wurde im Rahmen des Projektes aus Hybridomaüberstand aufgereinigt und charakterisiert. Die Einflüsse einer Änderung des pH-Wertes und der Ionenstärke auf die Eigenschaften dieses Moleküls bei der Adsorption an SP-Sepharose FF werden im Folgenden näher diskutiert. Bei einem pH-Wert von 4,5 wurden Konfokalbilder und Daten erhalten, die wiederum relativ gut durch die Vorstellung des „Shrinking Core“ Modells wiedergegeben werden. Der bestimmte Porendiffusionskoeffizient $D_P(\text{eff})$ ist mit $2,47\text{E}-13 \text{ m}^2/\text{s}$ rund 7 mal kleiner als der korrespondierende Wert ($1,66\text{E}-12$) für BSA. Der Unterschied ist auf die Größe der beiden Moleküle zurückzuführen. Bei pH 4,5 gilt für beide Proteine, wie in den Multicoloranalysen ermittelt wurde, dass der Proteintransport im Adsorberpartikel durch Porentransport kontrolliert wird. Jedes Proteinmolekül in der Porenflüssigkeit muss an bereits gebundenen Proteinen vorbeitransportiert werden und deshalb ist der Transport für kleinere Proteine begünstigt. Die Gleichgewichtslage, ausgedrückt durch den Gleichgewichtsparemeter R^* , betrug für das Experiment bei pH 4,5 0,25 und liegt somit im Gültigkeitsbereich ausreichender Irreversibilität der Isotherme (s. Tab. 18).

Eine Erhöhung des pH Wertes auf 5,0 führte zu einer drastischen Veränderung des Adsorptionsverhaltens, wie ein Vergleich der erhaltenen Fluoreszenzintensitätsprofile deutlich zeigt. Bei pH 5,0 wurde im Verlauf der Kinetik eine temporäre Akkumulation von mIgG nahe der Adsorptionsfront beobachtet. Nach ca. 20 Stunden wurde jedoch wiederum ein Fluoreszenzintensitätsprofil erhalten, dass eine homogene Sättigung des Adsorbers mit Protein zeigte.

Der Nettoladungszustand des Antikörpers erniedrigt sich bei einer Erhöhung des pH-Wertes von 4,5 auf 5,0 um rund 9 Ladungen von +23 zu +14 (vgl. BSA ~ 5). Offensichtlich verleihen die zusätzlichen, negativen Ladungen dem mIgG-Molekül ganz andere Transport- und Adsorptionseigenschaften.

Die Adsorptionsisotherme ist bei 50 mM Acetatpuffer pH 5,0 rechtwinklig geformt, was auf ein günstiges Adsorptionsgleichgewicht unter diesen Bedingungen hindeutet. Die ermittelte Langmuir-Assoziationskonstante K_a ist etwa halb so groß, wie der entsprechende BSA-Wert (s. 4.6). Die Bindungsaffinität ist unter diesen Bindungen somit etwas schlechter als die Affinität von BSA. Aus der SMA-Anpassung der experimentellen Gleichgewichtsdaten folgt, dass der Antikörper bei pH 5,0 im Vergleich zum BSA mit rund einer Ladung viel „lockerer“ gebunden ist (z_i BSA ~ 5). Gleichzeitig werden bei der Bindung des mIgG-Moleküls, ausgedrückt durch den wesentlich höheren Faktor ρ_i von 253 mehr Bindungsstellen der SP-Sepharose FF sterisch abgeschirmt, als durch die Bindung des BSA-Moleküls (ρ_i ~ 75). Die

genannten Faktoren würden eine größere Mobilität des Proteins im Adsorberpartikel begünstigen, die anhand des Adsorptionsmuster aus den Multicoloranalysen ermittelt wurde. Der mathematischen Beschreibung der Kinetiken wurde für die Batchadsorptionen das „Homogeneous Diffusion“ Modell zu Grunde gelegt, da aufgrund der dargestellten Ergebnisse die Annahmen des „Shrinking Core“ Modells keinesfalls erfüllt sind (s. 2.4.6.2). Das Adsorptionsmuster unterscheidet sich bei pH 5,0 gravierend von dem Verhalten des BSA-Moleküls und deutet auf einen Transport an der Festphasenoberfläche, bzw. Oberflächentransport im Adsorberpartikel hin. Das „Homogeneous Diffusion“ Modell kann das beobachtete Akkumulationsphänomen nicht beschreiben, aber dem Modell liegt ein Transport zugrunde, der von einem Gradienten ($\partial Q/\partial r$) des gebundenen Proteins an der Festphase mit abhängt (Weaver und Carta 1996; Chang und Lenhoff 1998; Lewus et al. 1998).

Die beobachtete Änderung des mlgG-Transportes bei einer Erhöhung des pH-Werts von 4,5 auf 5,0 führt, wenn man die ermittelten effektiven Diffusionskoeffizienten $D_H(\text{eff})$ vergleicht, zu einer Verdopplung der Adsorptionsgeschwindigkeit bei pH 5,0 (s. Abb. 64).

Die Porengeometrie für die initiale Bindung des mlgG-Moleküls bleibt bei pH 5,0 im Vergleich zu pH 4,5 weitgehend bestehen und der Transport des mlgG-Moleküls ist unter diesen Bedingungen durch bereits gebundene mlgG-Moleküle nicht in dem Maße „behindert“, wie bei einem Porendiffusionsmechanismus.

Eine Erhöhung des pH-Wertes auf pH 5,5 führt zu einer weiteren Steigerung der Mobilität des mlgG-Moleküls im Adsorberpartikel. Der ermittelte, effektive Diffusionskoeffizient $D_H(\text{eff})$ ist unter diesen Bedingungen 4 mal so groß wie bei pH 5,0, während der Ladungszustand des Moleküls sich nochmals von +14 auf +7 halbiert (s. Abb. 64). Die neu entstandenen, negativen Ladungen auf der Moleküloberfläche begünstigen wiederum den Transport an der Oberfläche der Festphase. Die Lage des Adsorptionsgleichgewichts ist durch die Erhöhung des pH-Wertes auf 5,5 nicht signifikant beeinflusst (s. Tab. 18). Bei diesem pH-Wert wurde keine Multicoloranalyse durchgeführt. Die beschriebenen Ergebnisse und die Konfokalbilder bei diesem pH-Wert deuten aber darauf hin, dass der Transport von mlgG analog zum Adsorptionsmuster bei pH 5,0 durch Oberflächentransport erfolgt. Das beschriebene Akkumulationsphänomen wurde auch bei pH 5,5 beobachtet. Im Vergleich zur Adsorption bei pH 5,0 ist das Ausmaß des Effektes stark erniedrigt und die Kinetik des Auftretens und Verschwindens stark beschleunigt.

Insgesamt folgt aus den beschriebenen Ergebnissen, dass die Adsorptionsgeschwindigkeit im Gegensatz zur BSA-Adsorption an SP-Sepharose FF durch eine Erhöhung des pH-Wertes steigt. Vernachlässigt man die komplexe, dreidimensionale Struktur der Proteine, so sind die Veränderungen der Oberflächenladung von BSA bezogen auf die Molekülmasse in kDa im untersuchten pH-Bereich rund 1,6 mal so groß wie beim mlgG-Molekül, mit einer

zusätzlichen Vorzeichenänderung. Demnach hängt der Einfluss der pH-Wertänderung auf die Adsorptionsgeschwindigkeit des Proteinmoleküls wahrscheinlich stärker von der Aminosäuresequenz, bzw. der aus der dreidimensionalen Struktur resultierenden Ladungsverteilung auf der Moleküloberfläche ab und muss im Einzelfall genauer betrachtet werden.

Eine Erhöhung der Acetatpufferkonzentration bei einem konstanten pH-Wert von 5,0 führt im Falle des Antikörpers, wiederum im Gegensatz zur BSA-Adsorption, zu einer Erhöhung der Mobilität des Moleküls im Adsorbermaterial. Der ermittelte effektive Diffusionskoeffizient $D_H(\text{eff})$ steigt bei einer Erhöhung der Acetatpufferkonzentration auf 100 mM zunächst um das Vierfache an, bevor sich die Mobilität des Moleküls bei 150 mM Acetatpuffer nochmals verdoppelt.

Aus der Anpassung der Isothermendaten mit dem SMA-Modell folgt, dass die ermittelte Gleichgewichtskonstante K_i mit 174 rund 230-fach höher als bestimmte K_i -Wert aus den BSA-Daten ist. Ein Vergleich dieser Werte verdeutlicht, dass das Adsorptionsgleichgewicht von mIgG einer Erhöhung der Ionenstärke gegenüber nicht so empfindlich reagiert, wie das Adsorptionsgleichgewicht von BSA. Das beschriebene Akkumulationsphänomen wurde auch bei den beiden Experimenten mit höherer Ionenstärke beobachtet (s. Abb. 67). Die Erhöhung der Ionenstärke beeinflusste das Phänomen wiederum in der Weise, dass das Ausmaß der akkumulierten Proteinmenge ab- und die Geschwindigkeit des Auftretens und Verschwindens zunahm. Der Transport des mIgG-Moleküls erfolgt auch bei einer Erhöhung der Ionenstärke überwiegend durch Oberflächentransport, da die Ionenstärke die Mobilität des Proteins im Porennetzwerk des Adsorbers erhöht.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass für die unterschiedlichen Einflüsse des pH-Wertes und der Ionenstärke auf das Adsorptionsverhalten der beiden Modellproteine BSA und mIgG im wesentlichen Unterschiede in den Transportmechanismen verantwortlich sind. Während ein Oberflächentransport durch eine Erhöhung des pH-Wertes genau wie durch eine höhere Ionenstärke beeinflusst wird. Aufgrund der gesteigerten Mobilität des Moleküls wirken sich im gleichen Bereich die beiden Parameter auf die Geschwindigkeit der Adsorption bei reinem Porentransport negativ aus.

In dem folgenden Abschnitt soll der beobachtete „Akkumulationseffekt“ bei der Adsorption des mIgG-Antikörpers ausführlicher diskutiert werden. Für mögliche Erklärungsansätze werden die wichtigsten Beobachtungen in bezug auf den „Akkumulationseffekt“ unten nochmals zusammengefasst.

1. Der Effekt besitzt eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert und somit vom Ladungszustand eines Proteins.
2. Der Effekt ist auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen, weil das Ausmaß der Proteinakkumulation durch eine Erhöhung des pH-Wertes und der Ionenstärke stark beeinflusst wird.
3. Das Auftreten und Verschwinden der Akkumulation korreliert mit der Adsorptionsgeschwindigkeit des Proteins.
4. Der Effekt wurde nur bei vorliegendem Transport an der Festphasenoberfläche nach initialer Bindung beobachtet

Lenhoff et al. beobachtete mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie ein vergleichbares Phänomen bei der Bindung von Lysozym an SP-Sepharose FF in einer Durchflusszelle (Lenhoff und Dziennik 1999).

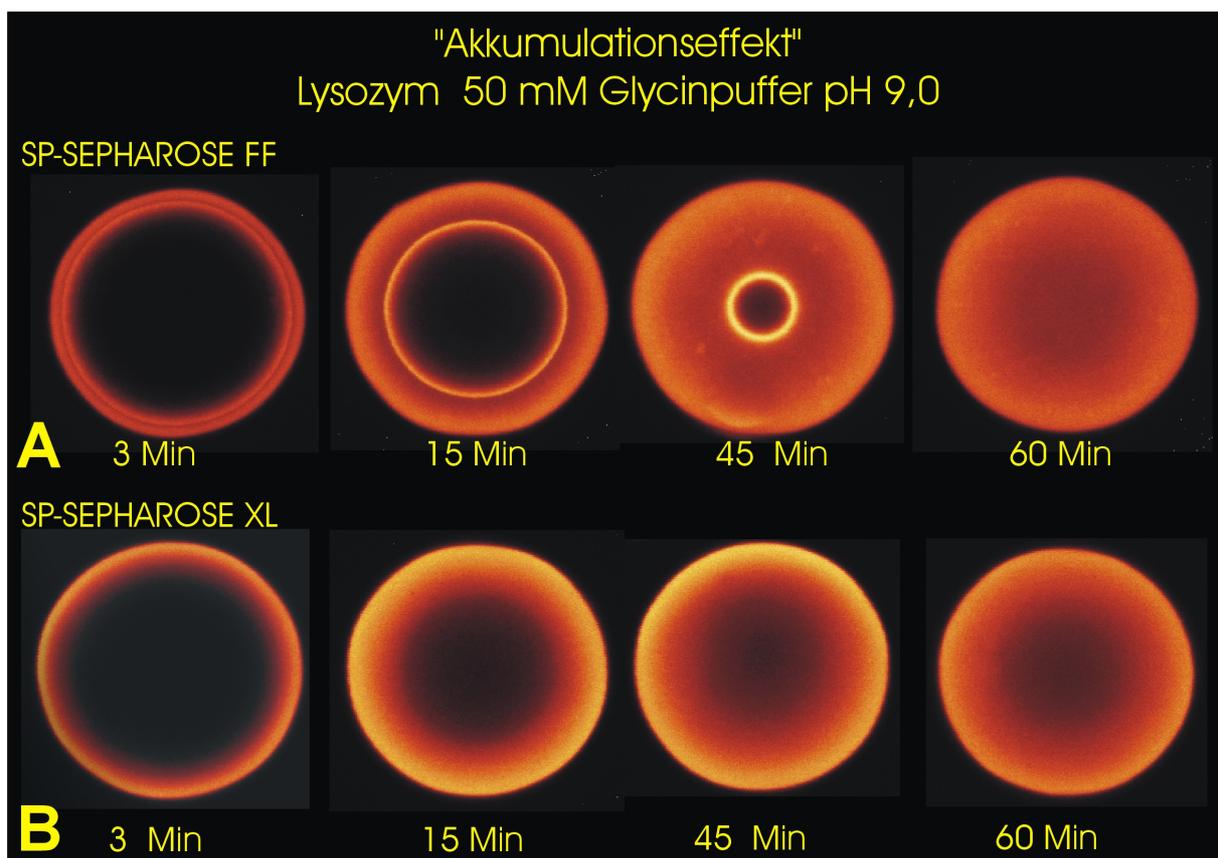


Abbildung 93: Konfokalbilder von SP-Sepharose Partikeln, die im Verlauf von Inkubationen mit Lysozym in 50 mM Glycinpuffer pH 9,0 zu verschiedenen Zeiten erzeugt wurden [3 Min, 15 Min, 45 Min, und 60 Min]. (A) SP-Sepharose FF; (B) SP-Sepharose XL Als fluoreszierender Marker wurde in den Experimenten Cy5 eingesetzt

Um die Beobachtungen dieses Autors im Rahmen dieser Arbeit besser diskutieren zu können, wurden zusätzlich zwei Batchadsorptionskinetiken mit Lysozym an zwei verschiedene SP-Sepharose Adsorber durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Exemplarische Konfokalaufnahmen dieser beiden Kinetiken sind in Abbildung 93 dargestellt.

Die Fluoreszenzintensität in den Konfokalbildern ist wiederum durch einen Farbcode in der Weise dargestellt, dass eine hellerer Farbton eine höhere Fluoreszenzintensität signalisiert.

Abbildung 93 (A) verdeutlicht, dass auch bei der Adsorption von Lysozym an SP-Sepharose FF ein „Akkumulationseffekt“ auftritt. An der Adsorptionsfront bildet sich analog der Adsorption des monoklonalen Antikörper bei pH 5,0 und pH 5,5 eine Zone verstärkter Proteinbindung aus, die nach 60 Minuten wiederum verschwunden ist. Weiterhin ist in Abbildung 68 (B) zu beobachten, dass dieser Effekt matrixspezifisch zu sein scheint und bei Verwendung eines anderen Adsorbentmaterials, wie der SP-Sepharose XL nicht zu beobachten ist. Bei der Adsorption des monoklonalen Antikörpers (mIgG) an SP-Sepharose XL tritt unter vergleichbaren Bedingungen dieser Effekt auch nicht auf (Hubbuch et al. 2002). Beide Chromatographiemedien tragen einen Sulfopropylgruppen in vergleichbarer Dichte ($FF = 0,214 \text{ mmol/mL}$ und $XL = 0,210 \text{ mmol/mL}$) (Ljunglöf 2000). Der Unterschied zwischen den beiden, verwendeten Adsorbentmaterialien besteht darin, dass bei der XL-Matrix modifizierte Sulfopropylgruppen auf das Agarosegerüst der Sepharose aufgepfropft sind, während bei der FF-Matrix die Sulfopropylgruppen direkt am Gerüstpolymer gebunden sind. (Thömmes 1999). Somit kann der obigen Liste der Abhängigkeiten dieses Phänomens noch eine strenge Abhängigkeit von der Matrix hinzugefügt werden.

Lenhoff et al. versuchten diesen Effekt durch eine elektrophoretische Triebkraft im System zu erklären (Lenhoff und Dziennik 1999). Bei der Annahme einer elektrischen Potentialdifferenz zwischen dem Partikelmittelpunkt und der Partikeloberfläche könnte ein „elektrischer Sog“ auf die geladenen Proteinmoleküle ausgebildet werden. Wenn diese Kraft unter bestimmten Bedingungen das Ausmaß der Triebkraft der diffusiven Transportprozesse im porösen Netzwerk übersteigt, wird die poröse Adsorbentmatrix, beziehungsweise die Maschenweite des Netzwerks selber limitierend und es könnte zu einer lokalen Aufkonzentrierung an der Adsorptionsfront, bedingt durch den verstärkten Sog, bzw. die „elektrophoretische Triebkraft“ kommen. Wenn die Proteine in der Mitte des Partikels angekommen sind, ist die Potentialdifferenz ausgeglichen und die Akkumulation wird ausgeglichen (Lenhoff und Dziennik 1999).

Für diese Erklärung spricht anhand der Ergebnisse dieser Arbeit, dass dieses Potentialfeld stark von den experimentellen Bedingungen Ionenstärke und pH-Wert abhängen müsste. Weiterhin würde das Kräftegleichgewicht zwischen den „elektrophoretischen“ und „diffusiven“ Triebkräften, analog der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins in Abhängigkeit von der eingestellten Maschenweite eines Polyacrylamidgels, stark von der

verwendeten Matrix beeinflusst. Durch die Einlagerung von Sulfopropylidextranketten in das Porenvolumen eines Agarosegerüsts werden bei der XL- im Vergleich zur FF-Matrix die Porendurchmesser kleiner. Die ionische Kapazität und somit das Potential müsste bei beiden Medien nahezu gleich sein. Zusätzlich ist eine bessere Zugänglichkeit zu den Sulfopropylliganden gewährleistet. Der „elektrophoretische Filtereffekt“ sollte diesen Annahmen folgend, bei einer kleineren Maschenweite im Gegensatz zu den gezeigten Ergebnissen stärker ausgeprägt sein.

Völlig vernachlässigt sind bei diesem Erklärungsansatz des „Akkumulationseffektes“ die Transportmechanismen der Proteine. Auch der Transport von Lysozym erfolgt an beiden Matrizes durch „Oberflächentransport“, wie experimentelle Studien verdeutlichen (Daten nicht gezeigt). Das würde bedeuten, dass der wesentliche Effekt der Akkumulation in jedem Fall gebunden an die Festphase und nicht durch gehinderte Diffusion in der Porenflüssigkeit stattfindet.

Das Konzentrationsniveau der Akkumulationszone wird beim späteren Ausgleich zur homogenen Proteinverteilung in keinem Fall wieder erreicht. Die Affinität des Proteins muss folglich lokal an der Adsorptionsfront im Vergleich zu den restlichen Regionen im Partikel stark erhöht sein. Nimmt man die streng schematische Modellvorstellung eines Oberflächendiffusionsprozesses als Grundlage, so „rollt“ das Protein an den Ionenaustauschliganden, in unserem Falle an den negativ geladenen Sulfopropylliganden, der Festphase entlang (Ruthven 1984). Weiterhin befinden sich in unmittelbarer Nähe der Liganden analog der Ionenwolke um die Proteine positiv geladene Natriumionen.

Diese sogenannten „Doppelschichten“ zeichnen sich wiederum dadurch aus, dass die Ionenkonzentration in der Doppelschicht höher als in der übrigen Porenflüssigkeit ist (Kopaciewicz et al. 1983). Während des Adsorptionsprozesses muss innerhalb genauso wie außerhalb des Adsorberpartikels Elektroneutralität herrschen und der Strom der ausgetauschten Natriumionen bei der Adsorption des Proteins ist demnach nach außen gerichtet (Helfferich und Hwang 1991). Die Doppelschicht schirmt die negativen Ladungen des Kationentauschers zunächst ab. Durch das „Entlangrollen“ der Proteinmoleküle könnte diese Schicht temporär zerstört werden, und die Affinität der Proteinmoleküle zu den Matrixliganden ist temporär größer, da die Sulfopropylliganden in dem Bereich kurz hinter der rollenden Adsorptionsfront weniger abgeschirmt vorliegen. Der Oberflächentransport der Moleküle an der Adsorptionsfront ist im Vergleich zu den nachrückenden Molekülen verlangsamt, da die Doppelschicht erst durch den Ionentausch zerstört werden muss und die nachfolgend, schneller transportierten Moleküle bewirken eine lokale Aufkonzentrierung.

Zusätzlich könnte sich durch diesen Aufkonzentrierungseffekt in der Bindungszone ein Donnan Potential ausbilden. Die Polyelektrolyte, bzw. die Proteine mIgG und Lysozym waren unter den Adsorptionsbedingungen netto jeweils positiv geladen. Der „Donnan Effekt“, bzw.

die Kompensation der positiven Ladungen des Proteins führt netto zu einer lokalen Konzentrationserhöhung der negativen Gegenionen (Adam et al. 1995). Das bedeutet, dass sich zwischen der Proteinmenge, die konzentriert an die Festphase gebunden ist und den restlichen Ionen in der Flüssigphase ein negatives Donnanpotential ausbilden kann. Es liegt dann keine positiv geladene Doppelschicht mehr vor, sondern eine negativ geladene Ionenschicht vor. Diese Potentialdifferenz könnte eine negativ geladene Brücke bilden und die Bindung von Proteinen kurz hinter der „rollenden Front“ von Proteinmolekülen zusätzlich erleichtern und dazu führen, dass die beiden Effekte sich temporär hochschaukeln.

Dieser alternative, biophysikalische Erklärungsansatz bindet den Oberflächentransportmechanismus des Proteins im Gegensatz zu der Hypothese von Lenhoff mit ein, der unbedingte Voraussetzung für das Auftreten des Phänomens zu sein scheint. Er deckt sich auch weitgehend mit der beobachteten starken Abhängigkeit vom Ladungszustand des Proteins und der Ionenstärkeabhängigkeit, da wiederum nur elektrostatische Wechselwirkungen betrachtet werden. Aber auch mit Hilfe dieser Hypothese kann der starke Einfluss der Adsorbermatrix nicht eindeutig erklärt werden, da die Adsorptionsmuster beider Proteine an SP-Sepharose XL auch auf einen Oberflächentransport hindeuten (Hubbuch et al. 2002).

Für einen fundierten Erklärungsansatzes wäre die Messung von Potentialdifferenzen innerhalb der Partikel nötig, die zur Zeit an Partikeln der Größenordnung von 100 μm ohne chemische Lösungszusätze noch nicht durchzuführen sind.

Die diskutierten Ergebnisse der Einkomponentenadsorption haben gezeigt, welche zusätzlichen Informationen mit Hilfe der konfokalen Analyse des Proteintransportes erhalten werden können. Durch die parallele Visualisierung der Transportprozesse kann ein sinnvolles Adsorptionsmodell zur Beschreibung der intrapartikulären Transportprozesse gewählt werden.

Die mikroskopisch beobachtete, temporäre Akkumulation von Protein in porösen Adsorbentien unter bestimmten experimentellen Bedingungen verdeutlicht, dass die Transportprozesse von Proteinen von wesentlich komplexerer Natur sind, als in allen bestehenden Adsorptionsmodellen bisher angenommen. Die gezeigten Ergebnisse sollten deshalb in der Zukunft einen Anstoß dafür geben, bestehende Modelle gründlich zu überdenken und neue mathematische Ansätze zu entwickeln, die ein breiteres Spektrum an Transportvorgängen einschließen und voraussagen können.

5.4 Zweikomponentenadsorption

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Ausweitung kinetischer Untersuchungen mit konfokaler Laser Raster-Mikroskopie auf Zweikomponentenadsorptionssysteme. Mit Hilfe einer geeigneten Messanordnung und bei der Nutzung von zwei getrennten Detektorkanälen des Konfokalmikroskops kann die Fluoreszenzemission von zwei Fluorophoren nahezu gleichzeitig gemessen und zur Bildgebung genutzt werden. Die unabhängige Detektion der Fluoreszenzsignale ist bei den beiden verwendeten Fluorophorklassen FITC und Cy5 gewährleistet, wie bei der optischen Charakterisierung bereits gezeigt wurde (s.4.1.2). Als Modellsystem wurde bei den Untersuchungen die parallele Adsorption des Rinderserumalbumins (BSA) und Immunglobulin G betrachtet. In Langzeitinkubationsexperimenten wurde bei der parallelen Adsorption von BSA und polyklonalem Humanimmunglobulin G (hIgG) an SP-Sepharose FF nach 20 stündiger Inkubationszeit eine heterogene Verteilung der beiden Proteine im Partikel beobachtet. BSA war in den äußeren Regionen des Partikels gebunden, während mIgG vorwiegend in den inneren Regionen der SP-Sepharose FF lokalisiert war. (s. Abb. 44). Diese Beobachtung war unerwartet, da in der Porenflüssigkeit der Agarose die Diffusion größerer Moleküle, wie dem Antikörper eher behindert und deswegen langsamer sein sollte, als der Transport von BSA.

Die parallele Adsorption von hIgG und BSA kann streng genommen nicht als reine Zweikomponentenadsorption bezeichnet werden. Bei dem verwendeten polyklonalen Humanimmunglobulin G handelt es sich zwar um Antikörper mit einer vergleichbaren Struktur und Größe, aber durchaus anderen biochemischen Eigenschaften aufgrund der unterschiedlichen Primärsequenzen. Die isoelektrischen Punkte bei polyklonalem Immunglobulin G bewegen sich beispielsweise zwischen 4,6 und 7,2. Die Bindungseigenschaften der einzelnen Spezies an einen Kationenaustauscher sind folglich bei gegebenem pH-Wert unterschiedlich, was eine Interpretation der erzielten Resultate beim Vergleich unterschiedlicher experimenteller Bedingungen deutlich erschwert.

Zu einer genaueren Untersuchung der heterogenen Verteilung von BSA und „der Antikörper“ wurde in der Folge mit einem monoklonalen Antikörper (mIgG) gearbeitet, der aus Hybridomaüberstand isoliert und charakterisiert wurde (s. 3.4). Die Verwendung dieses monoklonalen Antikörpers erleichterte die Interpretation der Adsorptionsergebnisse ganz erheblich. Die Adsorption von BSA und mIgG wurde unter verschiedenen experimentellen Bedingungen in Batchadsorptionskinetiken verfolgt (s. 4.5). Variiert wurden der pH-Wert, die Acetatpufferkonzentration, bzw. die Ionenstärke und die Proteinzusammensetzung. Die beiden Modellproteine besitzen verschiedene Aminosäurezusammensetzungen und Strukturen, und dem zu Folge wird das Adsorptionsverhalten der Spezies bei einer Änderung der experimentellen Bedingungen unterschiedlich beeinflusst. In dem untersuchten pH-

Bereich von pH 4,5 bis pH 5,5 ändert sich die Nettoladung von BSA das Vorzeichen von positiv zu negativ, während mIgG mit einem isoelektrischen Punkt von 6,0 über den untersuchten pH-Bereich positiv geladen bleibt. Bei der simultanen Adsorption beider Proteine bei pH 4,5 wird der monoklonale Antikörper mit der Zeit vom netto positiv geladenen BSA-Molekül verdrängt. Ein Vergleich der entsprechenden Adsorptionsisothermen, bzw. der ermittelten Gleichgewichtskonstanten des SMA-Modells zeigt, dass die BSA-Konstante bei pH 4,5 signifikant höher ist als die entsprechende mIgG-Konstante. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die heterogene Konzentrationsverteilung der beiden Proteine wahrscheinlich auf Verdrängungseffekte zurückzuführen ist. Im Verlauf der Kinetik könnte initial gebundenes mIgG von BSA-Molekülen verdrängt werden. Da der Gesamtproteinfluss hauptsächlich in die Matrix hinein führt, wird verdrängtes mIgG vornehmlich an freien SP-Liganden weiter innen im Partikel binden. Ein kinetisches Argument ist weniger wahrscheinlich, da das größere mIgG-Molekül wie bereits erwähnt schneller im Porenkanal transportiert werden müsste, als das kleinere BSA-Molekül.

Bei einer Vernachlässigung der Anwesenheit des anderen Proteins kann man die effektiven Porentransportkoeffizienten $D_p(\text{eff})$ zum Vergleich heranziehen, die in den Einkomponentenexperimenten durch Anpassung an das „Shrinking Core“ Modell ermittelt wurden. Der $D_p(\text{eff})$ des mIgG-Moleküls ist bei pH 4,5 rund um den Faktor 10 kleiner als der korrespondierende BSA-Wert (s. 4.3). Da bei pH 4,5 beide Proteine, wie in den Multicoloranalysen gezeigt wurde, ausschließlich in der Porenflüssigkeit im Partikel transportiert werden, beschreibt der $D_p(\text{eff})$ die Mobilität der Proteine in der Flüssigphase der Porenkanäle und kann als Maß für die Mobilität der Proteine herangezogen werden. Dieser Vergleich unterstreicht, dass die heterogene Proteinverteilung bei pH 4,5 nur durch Verdrängungseffekte, die sich aus der Thermodynamik des Adsorptionssystems ergeben, entsteht und kinetische Erklärungsansätze bei diesen Bedingungen ausgeschlossen sind.

Bei pH 5,0 bleibt die heterogene Proteinverteilung über den Partikel erhalten, aber die absolute Kapazität im Untersuchungszeitraum ist unter diesen Bedingungen für mIgG höher. Dieses Ergebnis wird wiederum durch die SMA-Anpassung der Isothermen durch eine um den Faktor 2 höhere Gleichgewichtskonstante K_{12} des Antikörpers gestützt.

Weiterhin ist die Adsorption von BSA bei pH 5,0 empfindlicher gegenüber Änderungen des initialen Konzentrationsverhältnisses der beiden Proteine. Die ermittelte BSA-Adsorptionsrate $AUR_{300}(D)$ ist bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen stark von der Anwesenheit des Antikörpers abhängig, während im Gegenzug die Adsorptionsrate von mIgG weitgehend unbeeinflusst von der Anwesenheit von BSA zu sein scheint.

Ein Vergleich der in den Multicoloranalysen (s. 4.6) ermittelten Transportmechanismen der beiden Proteine unter diesen Bedingungen weist bei Vernachlässigung der anderen Proteinkomponente auf einen sehr großen Unterschied unter diesen Bedingungen hin. Die

BSA-Adsorption erfolgt bei pH 5,0 wiederum durch Porentransport, dessen Geschwindigkeit stark vom Konzentrations- oder Potentialgradient in der Porenflüssigkeit abhängt. Im Gegensatz dazu weist das erhaltene Adsorptionsmuster der Multicoloranalyse des Antikörpers unter diesen Bedingungen auf einen Oberflächentransportmechanismus hin, der mehr von der Menge bereits gebundener mlgG-Moleküle abhängt. In diesem Fall würde der Transport von mlgG nahezu unabhängig von der Anwesenheit von BSA erfolgen, da der Transport in der Interphase zwischen Porenflüssigkeit und Matrixoberfläche statt findet. Streng schematisch kann man sich vorstellen, dass der Antikörper bei diesem Transport an den Porenwänden entlang „rollt“.

BSA wird hingegen ausschließlich in der Porenflüssigkeit im Partikel transportiert. Eine Präsenz von mlgG führt einerseits zu einem behinderten Transport. Zusätzlich ist die Adsorptionsgeschwindigkeit auch von der „Steilheit“ des Gradienten, bzw. von der initialen Proteinkonzentration abhängig, die mit zunehmender mlgG-Konzentration sinkt.

Zieht man wiederum die Einkomponentenkinetiken der beiden Proteine zum Vergleich hinzu, so ist bei pH 5,0 in 50 mM Acetatpuffer eine gesteigerte Adsorptionsgeschwindigkeit für mlgG im Vergleich zu BSA zu beobachten. Die ermittelten Transportkoeffizienten $D_P(\text{eff})$ und $D_H(\text{eff})$ können aufgrund der unterschiedlichen Modellannahmen nicht gegenübergestellt werden. Vergleicht man aber die Zeiten bis zur Sättigung so ist, bedingt durch den veränderten Transportmechanismus, eine deutliche Geschwindigkeitszunahme der mlgG-Adsorption zu beobachten. Die heterogene Proteinverteilung ist diesen Ergebnissen zu Folge bei pH 5,0 eher auf kinetische Effekte zurückzuführen.

Eine höhere Ionenstärke bedingt durch einen konzentrierteren Acetatpuffer führt auch zu einer Abnahme der BSA-AUR₃₀₀(D), während wiederum die Adsorptionsrate von mlgG ansteigt. Die Multicoloranalysen und Einkomponentenkinetiken haben gezeigt, dass es für BSA bei 150 mM Acetatpuffer pH 5,0 nur zu einer geringen Veränderung des Adsorptionsmusters kommt und diese Veränderung nicht zu einer Geschwindigkeitszunahme führt. Die Mobilität von BSA sinkt mit zunehmender Ionenstärke. Im Gegenzug dazu wird die Einkomponentenadsorption von mlgG durch eine Erhöhung der Ionenstärke kinetisch begünstigt. Die gegensätzlichen Abhängigkeiten von der Ionenstärke können darum analog der Abhängigkeit von der Zusammensetzung auf unterschiedliche Transportmechanismen der beiden Proteine unter diesen Bedingungen zurückgeführt werden. Die SMA-Gleichgewichtskonstanten sind bei gegebenem pH-Wert im untersuchten Konzentrationsbereich definitionsgemäß unabhängig von der Ionenstärke des Lösungsmilieus. Der niedrigere K_{13} -Wert von BSA bei pH 5,0 weist im Vergleich zum K_{12} für mlgG auf eine Bindungsaffinität hin, die empfindlicher gegenüber der Ionenstärke ist.

Bei einer weiteren Erhöhung des pH-Wertes auf 5,5 wurde bei einem equimolaren Konzentrationsverhältnis zu Beginn der Adsorption über den gesamten, betrachteten

Versuchszeitraum kein BSA im Partikel detektiert. In der Flüssigphase konnte im Gegensatz dazu eine Kapazität für das Protein bestimmt werden. Bei der Verdünnung von 1:10 mit unmarkiertem Protein, mit der bei allen durchgeführten Zweikomponentenexperimenten gearbeitet wurde, war unter diesen experimentellen Bedingungen das Detektionslimit im Konfokalmikroskop unterschritten. Die ermittelte mIgG-AUR₃₀₀(D) war bei pH 5,5 im Vergleich zu den anderen beiden pH-Werten stark erhöht. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen, die bei den Einkomponentenuntersuchungen gemacht wurden. Dabei war die Adsorptionsgeschwindigkeit von mIgG in der untersuchten pH-Reihe bei pH 5,5 am größten, während für BSA unter diesen Bedingungen der kleinste $D_p(\text{eff})$ bestimmt wurde. Weiterhin ist das Bindungsgleichgewicht stark zum mIgG verschoben (s. 4.4.3 Abb. 44). Während sich die SMA-Gleichgewichtskonstante von mIgG im Vergleich zum entsprechenden Wert bei pH 5,0 nur ungefähr halbiert, sinkt der K_{13} -Wert für BSA um das 130-fache. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass sich die Bedingungen für eine BSA-Adsorption bei einer Erhöhung des pH-Wertes auf 5,5 gravierend verschlechtern.

Wie die diskutierten Ergebnisse gezeigt haben, erlauben die durchgeführten Zweikomponentenexperimente mit konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie eine detaillierte Untersuchung von Transportphänomenen von zwei Komponenten bei der Adsorption an einen porösen Träger. In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass das hier betrachtete Modellsystem der Adsorption eines monoklonalen Antikörpers und BSA ein reales Trennproblem repräsentiert, das bei der industriellen Aufarbeitung von Hybridomaüberständen mittels Kationenaustauschchromatographie zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern häufig vorliegt.

IgG-Antikörper können vergleichsweise einfach über eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten Protein A oder Protein G Trägern nahezu homogen hergestellt werden. Die hohen Kosten der verwendeten Affinitätschromatographiematerialien machen in der Industrie solche Prozesse jedoch oft unrentabel und die Kationenaustauschchromatographie stellt eine billigere, wenngleich weniger selektive Alternative dar. Zum Vergleich sind die Kosten für 25 mL der erwähnten Materialien in Tabelle 25 gegenübergestellt.

Tabelle 25: Vergleich der Kosten für 25 mL der Adsorbermaterialien SP-Sepharose™ FF; Protein G-Sepharose FF und rProtein A-Sepharose™ FF [Produktinformation von Amersham Pharmacia Biotech 2001]

Material	SP-Sepharose™ FF	Protein G-Sepharose™ FF	rProtein A-Sepharose™ FF
Preis [DM]	80.-*	3850.-*	2.975.-*

Ein Vergleich der Preise in Tabelle 25 zeigt, dass einmal abgesehen von erzielbaren Kapazitäten und Aufreinigungsfaktoren, die Kosten für chromatographische Träger bei

Verwendung der Affinitätsmaterialien in industriellen Prozessen um ca. das 50-fache höher im Vergleich zur Kationenauschermatrix sind.

In den Zweikomponentenadsorptionsexperimenten in verschiedenen Acetatpuffern wurde das Trennproblem bei der Darstellung von monoklonalen Antikörpern mittels Kationenaustauschchromatographie auf ein reines Zweikomponentensystem reduziert, um Einflüsse der geänderten Parameter genauer zu untersuchen. Intuitiv würde man bei einer Kationenaustauschchromatographie wahrscheinlich bei einem niedrigen pH-Wert und niedriger Ionenstärke arbeiten, da unter diesen Bedingungen mit der höchsten Proteinkapazität zu rechnen ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass diese Annahme nur für ein nicht kompetitives Adsorptionsgleichgewicht gilt. Bei der Betrachtung von Mehrkomponentenadsorptionen, wie sie bei realen Prozessen immer vorliegen, sollte die Selektivität der Adsorption miteinbezogen werden, um die Effizienz eines Aufarbeitungsprozesses zu erhöhen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit verschiebt sich das Adsorptionsgleichgewicht zu Gunsten von mIgG, wenn sich der pH-Wert erhöht. Eine Erhöhung des pH-Wertes von 4,5 zu 5,5 verändert das Verhältnis der BSA/mIgG Kapazitäten, die im Versuchszeitraum ermittelt wurden, von 3,1 nach 0,1 also günstig zur „Produktseite“ (s. Tab. 19).

Weiterhin kann chromatographische Selektivität auch im Hinblick auf die Adsorptionskinetik betrachtet werden. Die im Rahmen der Studie bestimmte molare Adsorptionsrate $AUR_{300}(D)$ könnte als charakteristischer Parameter zur Ermittlung dieser „kinetischen Selektivität“ herangezogen werden. In der industriellen Proteinchromatographie repräsentieren 5 Minuten, bzw. 300 Sekunden eine typische Säulenverweilzeit der Komponenten (z.B. 15 cm Betthöhe und 200 cm/h Fliessgeschwindigkeit ergeben eine Säulenverweilzeit von 4,5 Minuten). Der beobachtete Adsorptionsratenanstieg ist ein weiteres Argument für eine Durchführung der Aufarbeitung bei erhöhtem pH-Wert. Tatsächlich wird eine Aufarbeitung von monoklonalen Antikörpern oft im pH-Bereich von 5,0 bis 5,5 durchgeführt (z.B. (Feuser et al. 1999)).

Eine Erhöhung der Ionenstärke kann auch eine Selektivitätssteigerung bewirken. Die bestimmten SMA-Parameter haben gezeigt, dass das Adsorptionsgleichgewicht von BSA bei einem pH-Wert von 5,0 wesentlich empfindlicher auf eine Erhöhung der Ionenstärke reagiert, als das mIgG-Gleichgewicht. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Erhöhung der Acetatpufferkonzentration von 50 mM auf 150 mM das Verhältnis der beiden „Pseudogleichgewichtskapazitäten“ BSA/mIgG von 0,9 auf 0,35 sinkt. Das Verhältnis der Adsorptionsraten $AUR_{300}(D)$ BSA/mIgG ist sogar um den Faktor 100 erniedrigt (s. Abb. 76). In diesem Fall ist die „kinetische Selektivität“ sehr viel deutlicher ausgeprägt, als die thermodynamische. Aus dieser Diskussion folgt, dass zur Optimierung von

Adsorptionsbedingungen in industriellen Prozessen eine Erhöhung des pH-Werts und der Ionenstärke zu optimalen Ergebnissen führt.

Im realen Prozess stellt BSA sicher nicht die einzige Verunreinigung dar. Die übrigen Proteine, die der Hybridomaüberstand noch enthält, sind mit dem Konfokalmikroskop nicht „sichtbar“, dennoch konkurrieren sie mit den beiden Modellproteinen um die SP-Liganden in dem Träger. Um eine reale Prozesssituation zu simulieren, wurden zusätzlich noch Experimente bei drei verschiedenen pH-Werten mit einem modifizierten Hybridomaüberstand durchgeführt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass auch bei der Anwesenheit anderer Proteine im Partikel, die gleiche heterogene Verteilung der beiden Proteine beobachtet wurde.

Die Leitfähigkeiten der verdünnten Hybridomaüberstände bei den drei untersuchten pH-Werten entsprechen einem ca. 170 mM Acetatpuffer. Bei Vernachlässigung der anderen Proteine in der Lösung könnten wir die Situation mit diesen Bedingungen vergleichen, obgleich keine Isothermendaten für die Überstände vorliegen.

Zu einer Fortführung der Diskussion über die Selektivitäten kann nur die Änderung des pH-Werts betrachtet werden, da keine Experimente für verschiedene Verdünnungen durchgeführt wurden. Eine weitere Verdünnung der Hybridomaüberstände ist im Industrieprozess oft nicht praktikabel, da die Flüssigkeitsmengen, die im Prozess „bewegt“ werden müssen, durch die Verdünnung entsprechend steigen.

Ein Vergleich der im Rahmen der Versuchszeit ermittelten Kapazitäten BSA/mlgG zeigt, dass wiederum durch eine Erhöhung des pH-Wertes von 4,5 auf 5,0 das Verhältnis günstig für den Antikörper von 1,1 nach 0,15 verschoben wird. Nimmt man den Quotienten als Maß für die Selektivität der Adsorption, so steigt die „thermodynamische Selektivität“ durch eine Erhöhung auf pH 5,0 um den Faktor 7 an. Eine weitere Erhöhung des pH-Werts auf 5,5 führt hingegen zu einem leicht erhöhten Wert von 0,2, da unter diesen Bedingungen die mlgG-Kapazität aufgrund der hohen Ionenstärke bereits stark erniedrigt ist (s. 4.4.3). Der kinetische Vergleich ist nur im pH-Bereich zwischen 4,5 und 5,0 möglich, da auch bei unverdünntem Einsatz des markierten Proteinkonjugates keine $AUR_{300}(D)$ aus den Fluoreszenzintensitätsprofilen zu ermitteln war. Die entsprechenden Adsorptionsratenquotienten weisen wiederum auf eine günstige Selektivitätsverschiebung bei erhöhten pH-Wert hin. Der Quotient bei pH 5,0 ist mit 0,07 niedriger als der korrespondierende Wert bei pH 4,5 (6,7). Die „kinetische Selektivität“ ist durch die relativ kleine pH-Wertänderung um 0,5 Einheiten 100-fach gesteigert.

Die Zweikomponentenadsorptionsergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass konfokale Laser-Raster-Mikroskopie auch die parallele Untersuchung von zwei Komponenten ermöglicht. Es wurde festgestellt, dass relativ kleine Änderungen des Reaktionsmilieus teilweise gravierende Änderungen des Adsorptionsverhaltens der beiden Proteine bewirken können.

Die konfokale Bildgebung erlaubt die Visualisierung von Verdrängungseffekten und heterogenen Proteinverteilungen, die über die Flüssigphase grundsätzlich nicht ermittelbar sind.

In der Literatur sind erst wenige Arbeiten über Zweikomponentenadsorption von Proteinen an poröse Träger publiziert. Lewus et al. untersuchten in einer vergleichbaren Studie die parallele Adsorption von Cytochrom C und Lysozym an einen S-Hyper-D Kationenaustauscher über Messungen in der Flüssigphase ohne Nutzung der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (Lewus und Carta 1999). Die Autoren beobachteten eine deutliche Verdrängung von gebundenem Cytochrom C durch Lysozym. In einer Zweikomponentenadsorptionsanalyse von BSA und Hämoglobin konnten Fargues et al. anhand von Zweikomponentendurchbruchskurven eine Verdrängung von BSA durch Hämoglobin von einem Hydroxyapatitträger beobachten (Fargues et al. 1998). Es wäre mit Sicherheit interessant, diese Verdrängungseffekte mittels konfokalmikroskopischer Analyse zu untersuchen. Wahrscheinlich ergeben sich in diesen Systemen aufgrund der Verdrängungseffekte auch heterogene Proteinverteilungen in den Trägern und dieses Phänomen ist „normaler“, als bislang angenommen.

In jedem Fall erlaubt die konfokale Laser-Raster Mikroskopie im wahrsten Sinne des Wortes einen genaueren Einblick in kompetitive Mehrkomponentengleichgewichte.

5.5 Multicoloranalyse der Proteinadsorption

Die Methode der konfokalmikroskopischen Analyse von Adsorberpartikeln im Verlauf einer konsekutiven Inkubation mit drei verschiedenen Farbstoffkonjugaten eines Proteins wurde im Rahmen des Projektes entwickelt und optimiert, um aus den erhaltenen Adsorptionsmustern Rückschlüsse auf den Transportmechanismus der beiden untersuchten Proteine unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen zu erhalten. Als Modellsystem zur Entwicklung und Optimierung der Methode wurde das Adsorptionsverhalten der beiden Modellproteine BSA und mIgG an den porösen Kationenaustauscher SP-Sepharose FF untersucht, da die Ergebnisse aus den kinetischen Untersuchungen auf mögliche Änderungen der Transportmechanismen in Abhängigkeit der experimentellen Bedingungen hinwiesen.

Im Falle von BSA wird das Adsorptionsmuster durch eine pH-Werterhöhung von 4,5 auf 5,0 nicht beeinflusst, obwohl sich bei BSA mit einem isoelektrischen Punkt von 4,8 die Nettoladung von positiv zu negativ in diesem Intervall umkehrt. Aus den Experimenten bei beiden pH-Werten resultierten Adsorptionsmuster, die sich sehr gut mit dem „Shrinking Core“ Modell beschreiben ließen (s. 4.5.1). Die Fluoreszenzintensitätsprofile der Einkomponentenkinetiken zeigten eine steile Adsorptionsfront für BSA, die sich mit der Zeit zur Partikelmitte bewegte (s. 4.3.2.1). Bei pH 5,5 flachte die Adsorptionsfront stark ab und

zusammen mit der ungünstigen Gleichgewichtslage war das „Shrinking Core“ Modell, streng genommen, unter diesen Bedingungen nicht mehr gültig (s. 4.3.2.1 u. 5.3).

Mit Hilfe der konsekutiven Inkubationen wurde für alle Bedingungen eine zusätzliche Information über den Transportmechanismus erhalten. Initial gebundenes Protein verbleibt an der gleichen Stelle im Partikel, bis sich das System im Adsorptionsgleichgewicht befindet. Der Transport für BSA erfolgt somit im gesamten pH-Bereich ausschließlich durch Porentransport, während das Adsorptionsmusters von mIgG nur bei pH 4,5 auf Porentransport schließen lässt.

Bei diesem Transport müssen alle Proteine, die neu in den Partikel eindringen wollen, an bereits gebundenen Spezies vorbeitransportiert werden. Inwiefern dieser Proteintransport durch die Dimensionen der Proteine und Poren behindert werden kann, soll im Folgenden durch einen Größenvergleich für die Adsorption von BSA an SP-Sepharose FF erläutert werden.

Eine 3D-Struktur für BSA durch Röntgenstrukturanalyse ist bisher nicht aufgelöst worden. Whitley et al. gaben die Dimensionen des ellipsoiden BSA-Monomers im Rahmen einer Studie von Proteinadsorptionsgleichgewichten an verschiedenen porösen Ionenaustauschermedien mit 14,1 nm und 4,2 nm für die Haupt- und Nebenachse an (Whitley et al. 1989).

Hagel et al. bestimmten die Porendimensionen verschiedener polymerer Träger durch Gelpermeationschromatographie. Für Sepharose 6 FF, die der unmodifizierten Matrix der SP-Sepharose FF entspricht wurde dabei ein mittlerer Wert von 29,8 nm ermittelt (Hagel et al. 1996).

Whitley et al. ermittelten weiterhin, dass der Bedeckungsgrad der inneren Oberfläche eines Adsorbers ca. 32% nicht übersteigt (Whitley et al. 1989). Ljunglöf fand vor und nach der Sättigung von SP-Sepharose FF mit BSA in 50 mM Acetatpuffer pH 4,5 einen prozentualen Unterschied des zugänglichen Porenvolumen ΔV_{Pore} von rund 20% (Ljunglöf 2001). Eine Gegenüberstellung dieser Dimensionen verdeutlicht, dass die Porengeometrie durch die Bindung von BSA teilweise erheblich beeinflusst werden kann.

Eine leichte Änderung des Adsorptionsmusters ergibt sich durch Erhöhung der Pufferkapazität auf 150 mM und damit der Ionenstärke im System. Die Erhöhung führt zu einer zunehmenden Abschirmung von Ladungen des adsorbierenden Moleküls. Zusätzlich sind auch mehr Natriumionen in der Lösung vorhanden, die mit den Proteinen um die Bindungsstellen im Adsorber konkurrieren und das Bindungsgleichgewicht wird in der Regel ungünstiger. Unter diesen Bedingungen scheint BSA weiter ins Partikelinnere transportiert zu werden. Dieser zusätzliche Transport führt jedoch nicht zu einer Erhöhung der Gesamtadsorptionsgeschwindigkeit bei 150 mM. Der Proteintransport im Partikel erfolgt

unter diesen Bedingungen weiterhin hauptsächlich in der Flüssigphase bis zur Bindung des Proteins an die Adsorbermatrix, also durch Porentransport.

Bei der Adsorption des monoklonalen Antikörpers wurde eine drastische Änderung des Adsorptionsmusters bei einer Erhöhung des pH-Wertes von 4,5 auf 5,0 beobachtet. Die Situation bei pH 5,0 ist keinesfalls mehr durch einen Porentransportmechanismus beschreibbar. Hier scheint ein anderer Transportmechanismus die Adsorptionskinetik stark zu begünstigen. Eine naheliegende Erklärung des erhaltenen Adsorptionsmusters ist die Annahme eines Oberflächentransportmechanismus. Initial gebundenes Protein wird dabei in der Interphase zwischen flüssiger und fester Phase in Abhängigkeit vom Beladungsgrad weiter ins Partikelinnere transportiert. Die höhere Geschwindigkeit ergibt sich im Vergleich zum Porentransport des Proteins bei pH 4,5 dadurch, dass gebundenes Protein kontinuierlich in der Pore weitertransportiert wird und die sterische Hinderung durch bereits gebundene Proteine nicht so stark ins Gewicht fällt.

An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass mit Hilfe der Multicoloranalyse zwar eindeutig ein Porentransportmechanismus identifiziert werden kann. Der Oberflächentransport ist zunächst nicht von Adsorption, Weitertransport in der Flüssigphase und späterer sekundärer Adsorption weiter innen im Adsorberpartikel unterscheidbar, da dafür die lokale Auflösung des Konfokalmikroskopes nicht ausreicht.

Da das „Shrinking Core“ Modell streng genommen nur für sehr günstige Adsorptionsgleichgewichte gültig ist, war die Annahme einer Abhängigkeit des Adsorptionsmusters vom Bindungsgleichgewicht naheliegend. Ein Vergleich der Adsorptionsisothermen mit den Adsorptionsmustern bei verschiedenen experimentellen Bedingungen zeigt im Falle der BSA-Adsorption bei pH 4,5 und 5,0 tatsächlich sehr günstige Bindungsgleichgewichte, manifestiert durch eine nahezu rechtwinklige Isotherme und relativ hohe Assoziationskonstanten K_a (s. 4.4.4 Tab. 15). Durch eine weitere Erhöhung des pH-Wertes auf 5,5, bzw. der Pufferkonzentration auf 150 mM nehmen die Isothermen eine hyperbolische Form ein und man erhält ein eher ungünstiges Bindungsgleichgewicht unter diesen Bedingungen. Der K_a -Wert bei pH 5,5 ist dabei rund um den Faktor 2 niedriger als bei 150 mM Acetatpuffer. Im Gegensatz dazu wurde nur bei der BSA-Adsorption in 150 mM Acetatpuffer eine Änderung des Adsorptionsmusters beobachtet. Ein kleiner Teil an initial gebundenem Protein wurde weiter ins Partikelinnere transportiert, während eine Erhöhung des pH-Wertes auf 5,5 nicht zu einem sekundären Transport führte (s. 4.5.1). Die beiden zuletzt beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Korrelation zwischen dem Transportmechanismus und dem Adsorptionsgleichgewicht eines Proteins vermutlich nicht besteht.

Im Falle des mIgG Antikörpers verläuft die Isotherme bei pH 4,5 eher hyperbolisch, während bei pH 5,0 ein günstiges Bindungsgleichgewicht mit einer annähernd rechtwinkligen

Isotherme ermittelt wurde. Hier scheint im Vergleich zu der Situation bei BSA ein gegenläufiger Trend vorzuliegen.

In vielen bereits veröffentlichten Adsorptionsstudien werden theoretisch gerechnete Adsorptionsmuster, bzw. Transportmechanismen diskutiert, die nur durch Anpassung der experimentellen Flüssigphasendaten an komplexere mathematische Adsorptionsmodelle, aufgrund der dabei gemachten Annahmen über den Transportmechanismus erhalten wurden, z.B. (Tsou und Graham 1985; Yoshida et al. 1994; Fernandez und Carta 1996; Fernandez und Carta 1996; Ma et al. 1996; Weaver und Carta 1996). So berechneten z.B. Yoshida et al. mit einer komplexen mathematischen Lösung bei der Adsorption von BSA an stark basisches Chitosan, einem Anionentauscher, einen parallelen Transport des Proteins durch Poren- und Oberflächendiffusion (Yoshida et al. 1994). Aufgrund der damals fehlenden Messmethode zur Bestimmung von intrapartikulären Konzentrationsprofilen, konnten die Autoren nur durch mathematische Anpassung von Konzentrationsverläufen aus der Flüssigphase an verschiedene Adsorptionsmodelle, Informationen über den Adsorptionsprozess erhalten. Der Diskussion legten Sie weiterhin die verschiedenen Annahmen der Modelle in bezug auf den Transportmechanismus zu Grunde (Yoshida et al. 1994).

Die konfokale Laser Raster-Mikroskopie, insbesondere die neu entwickelte Technik Multicoloranalyse von Adsorberpartikeln könnte sich für solche Studien als leistungsfähiges Werkzeug zum Erhalt zusätzlicher Informationen über die Transportvorgänge der Proteine erweisen.

5.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die konfokalmikroskopische Analyse von Proteintransportphänomenen in porösen Adsorbermaterialien optimiert und auf Mehrkomponentengleichgewichte ausgeweitet (Linden et al. 1999; Linden et al. 2001). Weiterhin konnte eine effiziente Methode zur Untersuchung des Transportmechanismus von Proteinen in porösen Strukturen entwickelt werden (Linden et al. 2001). Es wurde dabei in allen Fällen die statische Adsorption der Proteine im Rührreaktor untersucht. Die ermittelten kinetischen Daten und Adsorptionsisothermen, sowie die aufgenommenen Fluoreszenzintensitätsprofile in dieser Arbeit werden in der Zukunft die experimentelle Grundlage zur Entwicklung neuer mathematischer Modellierungsansätze von Adsorptionsprozessen liefern. Gerade die beobachteten Akkumulationsphänomene bei der Adsorption des monoklonalen Antikörpers und die Zweikomponentenexperimente haben gezeigt, dass mathematische Ansätze zur Beschreibung von Adsorptionsprozessen teilweise überdacht, bzw. neu entwickelt werden müssen. Auf der Suche nach dem universellen Modell, bzw. bei der Auswahl eines

geeigneten Modellansatzes kann konfokale Laser-Raster-Mikroskopie in jedem Fall ein nützliches Werkzeug sein.

Die Bestimmung anderer Parameter im Verlauf eines Adsorptionsprozesses sind wahrscheinlich mit der Messtechnik möglich. Zur Zeit sind bereits Fluoreszenzfarbstoffe kommerziell erhältlich, deren fluoreszierende Eigenschaften gravierend von den äußeren Bedingungen, wie pH-Wert, Ionenstärke abhängen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das bereits für Fluoreszein beschrieben, dessen Quantenausbeute relativ stark vom pH-Wert der Lösung abhängig ist (s. 4.1.2 u. 5.1.). Diese Eigenschaft ist im Rahmen einer neueren Untersuchung bereits verwendet worden, um enzymaktivitätsbedingte pH-Wertänderungen in porösen Adsorbentien zu bestimmen (Spiess und Kasche 2001). Diese Methode kann wahrscheinlich auch zur Messung dieser Änderungen bei der Adsorption im Partikel herangezogen werden.

Weiterhin sind bereits Fluorophore beschrieben worden, die ihre Quantenausbeute durch Einlagerung von ein- oder zweiwertigen Kationen verändern (Verschiedene 1999). Diese könnten zur Messung von lokalen Salzkonzentrationen verwendet werden.

Im Zuge der weiteren Ausweitung der konfokalen Messmethoden sind Arbeiten in einer mit Adsorbentmaterial gepackten Durchflusszelle geplant. Auf diese Weise würde eine Chromatographiesäule miniaturisiert und die Untersuchungsbedingungen der realen Prozesssituation weiter näher kommen. Eine solche Messanordnung erlaubt zusätzlich die Visualisierung, bzw. Quantifizierung von dynamischen Adsorptionsgleichgewichten. Zusätzlich können konvektive Einflüsse bedingt durch geänderte Fließgeschwindigkeiten auf die intrapartikulären Transportprozesse untersucht und nicht zuletzt Desorptionsstudien durchgeführt werden. Die Desorption von Proteinen, z.B. im linearen Salzgradienten ist bislang mit konfokaler Laser Rastermikroskopie noch in keiner Arbeit betrachtet worden und eröffnet mit Sicherheit ein interessantes und ergiebiges Forschungsfeld bei der Untersuchung von Ein- und Mehrkomponentengleichgewichten.

Ein anderer Forschungsansatz geht in die Richtung der Untersuchung des eigentlichen Adsorptions-, bzw. Bindungsprozesses an die Liganden eines porösen Trägers. Die Bindung von Proteinen an die Matrixliganden kann eine Konformationsänderung bewirken. Für BSA wurden solche Konformationsänderungen durch Adsorption an Silikat- und Polystyrolpartikel bereits beschrieben (Norde und Giacomelli 2000). Die Autoren konnten nach homomolekularer Elution einen erhöhten β -Faltblattanteil in der Proteinstruktur durch CD-Spektroskopie im Vergleich zum Anteil vor der Adsorption nachweisen (Norde und Giacomelli 2000).

Eine Veränderung der fluoreszierenden Eigenschaften des Proteins, bzw. des Proteinkonjugates ist bei der Bindung, bedingt durch die Konformationsänderung möglich. Bei einer Erhöhung der spektralen Auflösung von Konfokalmikroskopen ist eine

Untersuchung solcher Vorgänge durch die Aufnahme lokal aufgelöster Fluoreszenzspektren denkbar. Die erwarteten Verschiebungen sind jedoch vergleichsweise klein und zur Zeit noch mit keinem Gerät bestimmbar. Ein weiterer Ansatz wäre die Verwendung konfokaler Ramanmikroskope (Schrof et al. 1998; Schaeberle et al. 1999). Diese Geräte sind in der Lage Ramanstreulicht lokal aufzulösen. Ein Protein besitzt ein charakteristisches Ramanspektrum und die Intensität einzelner Banden, zum Beispiel das Schwingungsmuster einer Amidbindung, könnte zur Bildgebung verwendet werden. Durch eine Änderung der Proteinkonformation verschieben sich die charakteristischen Ramanbanden von Bindungsmotiven im Proteinmolekül, was zu einem deutlichen Intensitätsverlust, bzw. Anstieg des detektierten Ramanstreulichtes führt.

Ältere Studien haben bereits gezeigt, dass durch die konfokale Ramanspektroskopie die Verteilung von Antikörpern in CNBr-aktivierter Agarose bestimmt werden kann (Ljunglöf et al. 2000). Die Autoren konnten zeigen, dass sie mit dieser Messmethode genau wie mit konfokaler Fluoreszenzspektroskopie die gleiche Ligandenverteilung ermittelt werden konnte (Ljunglöf et al. 2000). Die konfokale Ramanspektroskopie hat im Vergleich zur konfokalen Fluoreszenzspektroskopie den Vorteil, dass eine Markierung der Proteine nicht mehr nötig ist. Aufgrund des komplexen Ramanspektrums eines Proteins sind mit dieser Methode wahrscheinlich auch Mehrkomponentensysteme abbildbar. Der große Nachteil der Technik liegt zur Zeit noch in der Zeit, die zur Erstellung eines Konfokalbildes nötig ist. Im Vergleich zu wenigen Sekunden (ca. 6-25 sec. in Abhängigkeit vom gewählten Messprogramm) im Falle der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie dauert eine solche Aufnahme mehrere Stunden, was einen Einsatz dieser Technik im Rahmen von Transportuntersuchungen, wie z.B. die dieser Arbeit beschriebenen, nicht sinnvoll macht. In der Zukunft sollte die Weiterentwicklung dieser Messtechnik auf jeden Fall verfolgt werden.

Im Zuge der Ausweitung von Transportuntersuchungen mit Proteinen mit anderen spektroskopischen Methoden könnte in der Zukunft weiterhin bildgebende NMR-Spektroskopie zum Einsatz kommen. In der medizinischen Diagnostik werden bereits mehrere bildgebende Verfahren eingesetzt, die auf kernmagnetischer Resonanz basieren. Zur Zeit sind die Auflösungen noch begrenzt, jedoch könnte sich das in der Zukunft durch Verbesserung der entsprechenden Geräte ändern.

6. Zusammenfassung

Die Untersuchung von Proteintransportphänomenen in porösen Adsorberpartikeln mit der Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie stand im Fokus der vorliegenden Arbeit. Die Adsorption von Rinderserumalbumin (BSA) und einem monoklonalen Antikörper (mIgG) an den porösen Kationenaustauscher SP-Sepharose FF wurde dabei im Ein- und Zweikomponentenadsorptionssystem betrachtet. Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit bildete die Weiter- und Neuentwicklung experimenteller Methoden zur Aufklärung und Visualisierung von Transportvorgängen in porösen Adsorberpartikeln mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie.

Dieses bildgebende Verfahren ermöglicht die Detektion von Fluoreszenzemissionen von gebundenen Proteinen in porösen Adsorberpartikeln, die mit geeigneten Fluoreszenzmarkern modifiziert wurden mit hoher lokaler Auflösung und ohne mechanische Zerstörung. Durch die Messanordnung des Mikroskops wird nur die Fluoreszenzemission aus der fokussierten Region des Partikels detektiert, während angeregte Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene effizient durch eine konfokale Lochblende vor den Detektoren des Mikroskops blockiert wird. So können in wenigen Sekunden über die Erzeugung von Konfokalbildern lokal aufgelöste Fluoreszenzen gebundener Konjugate von bis zu drei verschiedenen Fluoreszenzmarkern im Partikel nahezu simultan gemessen werden.

Durch diese Technik wird erstmals die intrapartikuläre Konzentrationsverteilung im Verlauf einer Adsorption experimentell zugänglich. Aus den Konfokalbildern kann über die Generierung von Fluoreszenzintensitätsprofilen eine relative Kapazität Q_{rel} berechnet werden, die der summierten Fluoreszenzintensität bezogen auf das Partikelvolumen entspricht und zum Anteil an gebundenem Protein nach Kalibrierung in Beziehung gesetzt werden kann.

In einer ausführlichen biochemischen Charakterisierung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffkonjugate konnte durch isoelektrische Fokussierung, analytische Gelpermeations- und Kationenaustauschchromatographie von Konjugatsproben im Vergleich zu den unmodifizierten Spezies gezeigt werden, dass die für die konfokalmikroskopische Untersuchung nötige Markierung der Proteine mit den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen zu keinen gravierenden Veränderungen der biochemischen und chromatographischen Eigenschaften führt. Die Ergebnisse von Transportuntersuchungen der fluoreszenzmarkierten Spezies sind folglich auf das unmodifizierte Protein übertragbar.

Eine optische Charakterisierung verschiedener Farbstoffkonjugate ergab einerseits, dass die Agarosematrix der SP-Sepharose FF ein optisch günstiges Untersuchungsmedium darstellt und eine Korrektur des Messsignals in bezug auf regionale Detektionsunterschiede in Abhängigkeit von der Position im Partikel bei dieser Matrix nicht notwendig sind. Weiterhin

konnte auch ein gegenseitiger Einfluss verschiedener Fluoreszenzmarker auf die individuelle Fluoreszenzemission ausgeschlossen werden, was eine getrennte Detektion von bis zu drei geeigneten Fluoreszenzmarkern, bzw. Proteinen im Rahmen konfokalmikroskopischer Transportuntersuchungen ermöglicht.

Durch die Vermessung von SP-Sepharose FF Partikelproben, die zuvor mit verschiedenen Mischungsverhältnissen von markierten und unmarkiertem BSA ins Sättigungsgleichgewicht inkubiert wurden, konnten für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Arbeitsbereiche definiert werden, in denen eine lineare Korrelation zwischen der detektierten Fluoreszenzemission im Konfokalmikroskop und den über das gebundene BSA im Partikel immobilisierten Fluoreszenzfarbstoffen besteht.

In einer weiteren ausführlichen Studie im Rahmen der Arbeit erfolgte die Untersuchung der Einkomponentenadsorption der beiden Modellproteine an den SP-Sepharose FF Träger. In 50 mM Acetatpuffer wurde der Einfluss des pH-Wertes im Bereich von 4,5 bis 5,5 und bei pH 5,0 der Einfluss der Acetatpufferkonzentration bzw. Ionenstärke im Bereich 10 mM bis 150 mM Acetatpuffer auf das Adsorptionsverhalten der beiden Proteine untersucht.

Die Adsorptionsgleichgewichte der beiden Proteine wurden experimentell für die untersuchten experimentellen Bedingungen bestimmt. Die Adsorptionsisothermen konnten an das Modell nach Langmuir und das „Steric Mass Action“ Modell angepasst werden, um charakteristische Gleichgewichtsparameter zu bestimmen.

Durch Batchadsorptionskinetiken im thermostatisierten Rührreaktor wurde die Einstellung des Sättigungsgleichgewichts zeitlich sowohl mit Hilfe des Konfokalmikroskops durch Vermessung von Partikelproben als auch über die Flüssigphase durch Messung der kalibrierten Fluoreszenzintensität verfolgt. Aus den ermittelten Daten konnten durch Anpassung an das „Shrinking Core“ und das „Homogeneous Diffusion“ Adsorptionsmodell Transportkoeffizienten $D_p(\text{eff})$ und $D_H(\text{eff})$ bestimmt werden, die die Mobilität der Modellproteine bei den verschiedenen experimentellen Bedingungen charakterisieren. Die erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass BSA und der monoklonale Antikörper von Änderungen des pH-Werts und der Ionenstärke unterschiedlich beeinflusst werden. Während sich die Adsorptionsgeschwindigkeit, bzw. die Mobilität von BSA mit Erhöhung des pH-Werts und der Ionenstärke weitgehend erniedrigt, kommt es bei dem monoklonalen Antikörper zu einer größeren Mobilität des Moleküls im Partikel. Bei der Adsorption des monoklonalen Antikörpers konnte durch die konfokale Analyse ein bisher nicht publiziertes Akkumulationsphänomen des Proteins im Verlaufe einer Batchadsorptionskinetik visualisiert werden, dessen Auftreten und Ausmaß stark vom pH-Wert und der Ionenstärke des Reaktionsmilieus abhängt.

Die beobachteten Unterschiede im Adsorptionsverhalten legten die Vermutung nach einem unterschiedlichen Transportmechanismus der beiden Proteine bei den unterschiedlichen

Bedingungen nahe. Um Informationen über die Transportmechanismen der beiden Proteine zu erhalten wurde im Rahmen dieser Arbeit die Multicoloranalyse der Proteinadsorption entwickelt. Dabei werden poröse Träger im Verlaufe einer Batchadsorptionskinetik konsekutiv mit Proteinproben inkubiert, an die unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Diese Methode erlaubt die zeitabhängige Lokalisierung eines Proteins nach initialer Bindung und lässt erstmals Rückschlüsse auf den Mechanismus des Proteintransports zu. Nach den Ergebnissen dieser Studie wird BSA vorwiegend durch die Pore hin zum Liganden im Partikel transportiert, während bei Adsorption des monoklonalen Antikörpers in Abhängigkeit vom pH-Wert zusätzlich ein sekundärer Transport nach initialer Bindung möglich ist.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung der parallelen Adsorption der beiden Modellproteine BSA und mIgG an den porösen SP-Sepharose FF Träger. Neben der Generierung von Zweikomponentengleichgewichtsdaten, die an das „Steric Mass Action“ Modell angepasst wurden, konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Adsorption und der Transport zweier Proteine in einem Partikel bei verschiedenen pH-Werten, Acetatpufferkonzentrationen und Konzentrationsverhältnissen visualisiert und quantifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sich bei der Adsorption der beiden Proteine eine heterogene Verteilung der beiden Spezies im Partikel einstellen kann. Die unerwartete Beobachtung, dass der Antikörper vorwiegend in der Mitte des Partikels gebunden ist, während das BSA die äußeren Regionen bevorzugt, konnte durch Verdrängungseffekte, die im Rahmen der mikroskopischen Untersuchungen beobachtet wurden, erklärt werden. Durch den Zusatz von fluoreszenzmarkierten Konjugaten der beiden Proteine zu einem Hybridomaüberstand konnte eine reale Prozesssituation simuliert werden. Aus den Ergebnissen der Zweikomponentenstudie konnten Ansätze für die Optimierung von Prozessbedingungen bei der Darstellung monoklonaler Antikörper abgeleitet werden.

7. Literatur

- Adam, G., P. Lauger und G. Stark (1995). Physikalische Chemie und Biophysik. Berlin, Springer-Verlag.
- Ahmed, M. und D. L. Pyle (1999). "Investigation on single protein adsorption on ion exchangers using confocal laser scanning microscopy." J. Chem. Technol. Biotechnol. **74**: 193-198.
- Allison, S. A. und J. A. McCammon (1985). "Dynamics of substrate binding to copper zinc superoxide dismutase." J. Phys. Chem. **89**: 1072-1074.
- Arnold, F. H., H. W. Blanch und C. R. Wilke (1985). "Analysis of Affinity Separations. I: Predicting the Performance of Affinity Adsorbers." The Chemical Engineering Journal **30**: B9-B23.
- Arnott, S., A. Fulmer und W. E. Scott (1974). "The agarose double helix and its function in agarose gel structure." Journal of Molecular Biology **90**: 269-284.
- Arve, B. H. und A. I. Liapis (1987). "Modeling and Analysis of Biospecific Adsorption in a Finite Bath." AIChE J. **33**: 179-193.
- Arvidsson, E. O. (1972). "Salt bonding in proteins. A model for the abnormal hydrogen ion titration and the strong anion binding of serum albumin." Biopolymers **11**: 2197 - 2221.
- Bellot, J. C. und J. S. Condoret (1993). "Theoretical study of the ion-exchange preparative chromatography of a two-protein mixture." J. Chromatogr. **635**: 1-17.
- Bellot, J. C. und J. S. Condoret (1991). "Liquid chromatography modelling: A review." Process Biochemistry **26**: 363-376.
- Blum, H., H. Beier und H. J. Gross (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels." Electrophoresis **8**: 93-99.

- Booth, M. J., M. A. A. Neil und T. Wilson (1998). "Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media." Journal of Microscopy **192**: 90-98.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding." J. Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Brooks, C. A. und M. Cramer (1992). "Steric mass action ion exchange: Displacement profiles and induced salt gradients." AIChE Journal **38**(12): 1969-1978.
- Bryers, J. D. und F. Drummond (1998). "Local macromolecule diffusion coefficients in structurally non-uniform bacterial biofilms using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)." Biotechnol. Bioeng. **60**(4): 462-473.
- Canfield, R. E. (1963). "The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme." Journal of Biological Chemistry **238**(8): 2698-2707.
- Cantor, C. R. und P. R. Schimmel (1980). Part I: The conformation of biological macromolecules. Biophysical Chemistry. New York, W. H. Freeman and Company. **1. Auflage**.
- Cantor, C. R. und P. R. Schimmel (1980). Part II: Techniques for the study of biological structure and function. Biophysical Chemistry. New York, W. H. Freeman and Company. **1. Auflage**.
- Chang, C. und A. Lenhoff (1998). "Comparison of protein adsorption isotherms and uptake rates in preparative cation-exchange materials." J. Chromatogr. A **827**: 281-293.
- Charcosset, C. und J.-C. Bernengo (2000). "Comparison of microporous membrane morphologies using confocal scanning laser microscopy." J. Membrane Sci. **168**: 53-62.
- Charcosset, C., A. Cherfi und J.-C. Bernengo (2000). "Characterisation of microporous membrane morphology using confocal scanning laser microscopy." Chem. Eng. Sci. **55**: 5351-5358.

- Coffmann, J. L., E. N. Lightfoot und T. W. Root (1997). "Protein diffusion in porous chromatographic media studied by proton and fluorine PFG-NMR." Journal of Physical Chemistry **101**(12): 2218-2223.
- Cowan, G. H., M. D. LeVan und D. Tondeur (1989). Development of physical and mathematical modelling methods for scale-up of batch stirred tank and packed-bed column adsorption and chromatographic units. Adsorption: Science and Technology. A. E. Rodrigues. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers. **158**: 517-537.
- Cutts, L. S., P. A. Roberts, J. Adler, M. C. Davies und C. D. Melia (1995). "Determination of localized diffusion coefficients in gels using confocal scanning laser microscopy." Journal of Microscopy **180**: 131-139.
- Dai, W. S. und T. A. Barbari (2000). "Characterisation of mesh size asymmetry in hydrogel membranes using confocal microscopy." J. Membrane Sci. **171**: 45-58.
- Danielsson, A., A. Ljunglöf und H. Lindblom (1988). "One-step purification of monoclonal IgG antibodies from mouse ascites. An evaluation of different adsorption techniques using high performance liquid chromatography." J Immunol Methods **115**(1): 79-88.
- De Smedt, S. C., T. K. L. Meyvis, J. Demeester, P. Van Oostveld, J. C. G. Blonk und W. E. Hennink (1997). "Diffusion of macromolecules in dextran methacrylate solutions and gels as studied by confocal scanning laser microscopy." Macromolecules **30**(17): 4863-4870.
- Denk, W., J. P. Strickler und W. W. Webb (1990). "Two-photon laser scanning microscopy." Science **248**: 73-76.
- Denk, W., J. P. Strickler und W. W. Webb (1991). Two-photon laser microscopy. Patent #5034613. USA, Cornell Research Foundation, Inc.
- Der-Balian, G. P., N. Kameda und G. L. Rowley (1988). "Fluorescein labeling of Fab' while preserving single thiol." Anal Biochem **173**(1): 59-63.
- Dorfner, K. (1991). Ion exchangers. Berlin, Walter de Gruyter Verlag.

- Fargues, C., M. Bailly und G. Grevillot (1998). "Adsorption of BSA and Hemoglobin on hydroxyapatite support: Equilibria and multicomponent dynamic adsorption." Adsorption **4**: 5-16.
- Fergg, F., D. E. Kuehner, H. W. Blanch und P. J. M. (1994). Hydrogen-ion titrations of amino acids and proteins in solutions containing concentrated Electrolyte. Berkeley: 1 - 64.
- Fernandez, M. A. und G. Carta (1996). "Characterization of protein adsorption by composite silica-polyacryamide gel anion exchangers II. Mass transfer in packed columns and predictability of breakthrough behaviour." J. Chromatogr. A **746**: 185-198.
- Fernandez, M. A. und G. Carta (1996). "Characterization of protein adsorption by composite silica-polyacryamide gel anion exchangers I Equilibrium in agitated contactors." J. Chromatogr. A **746**: 169-183.
- Feuser, J., M. Halfar, D. Lütkenmeyer, N. Ameskamp, M.-R. Kula and J. Thömmes (1999). "Interaction of mammalian cell culture broth with adsorbents in expanded bed adsorption of monoclonal antibodies." Process Biochemistry **34**: 159-165.
- Gadam, S. D., G. Jayaraman und S. M. Cramer (1993). "Characterisation of non-linear adsorption properties of dextran based polyelectrolyte displacers in ion-exchange systems." J. Chromatogr. **630**: 37 - 52.
- Gaigalas, A. K., J. B. Hubbard, M. McCurley und S. Woo (1992). "Diffusion of bovine serum albumin in aqueous solutions." J. Phys. Chem. **96**: 2355 - 2359.
- Gebauer, K. H. (1996). Stofftransport und Kinetik in der Protein-Chromatografie am Beispiel neuer Membran-Adsorbentien. Düsseldorf, VDI Verlag.
- Gibbs, S. J., E. N. Lightfoot und T. W. Root (1992). "Protein diffusion in porous gel filtration chromatography media studied by pulsed field gradient NMR spectroscopy." Journal of Physical Chemistry **96**(18): 7458-7461.
- Göppert-Mayer, M. (1931). "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen." Ann. Phys. **9**: 273.

- Gribbon, P. und T. E. Hardingham (1998). "Macromolecular diffusion of biological polymers measured by confocal fluorescence recovery after photobleaching." Biophys. J. **75**: 1032-1039.
- Guex, N. und M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling." Electrophoresis **18**: 2714-2723.
- Guex, N. und M. C. Peitsch (1999). "Molecular modelling of proteins." Immunology News **6**: 132-134.
- Guex, N. und M. C. Peitsch (1999). "Protein modelling for all." Trends in Biochemical Sciences **24**: 364-367.
- Habbaba, M. M. und K. Ö. Ülgen (1997). "Analysis of protein adsorption to ion exchangers in a finite bath." J. Chem. Technol. Biotechnol. **69**: 405 - 414.
- Hagel, L. (1998). Gel Filtration. Protein Purification. J. C. Janson und L. G. Ryden. New York, Wiley-VCH. **2**: 79-145.
- Hagel, L., M. Östberg und T. Andersson (1996). "Apparent pore size distributions of chromatography media." J. Chromatogr. **743**: 33-42.
- Harris, L. J., S. B. Larson, K. W. Hasel und A. McPherson (1997). "Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody." Biochemistry **36**(7): 1581-97.
- Heim, R., A. B. Cubitt und R. Y. Tsien (1995). "Improved green fluorescence." Nature **373**(6516): 663-4.
- Heim, R., D. C. Prasher und R. Y. Tsien (1994). "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12501-4.
- Heim, R. und R. Y. Tsien (1996). "Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer." Curr Biol **6**(2): 178-82.
- Helfferich, F. G. (1990). "Models and physical reality in ion-exchange kinetics." Reactive Polymers **13**: 191-194.

- Helfferrich, F. G. und Y.-L. Hwang (1991). Ion exchange kinetics. Ion exchangers. K. Dorfner. Berlin, Walter de Gruyter Verlag. **1. Auflage**.
- Hell, S., G. Reiner, C. Cremer und E. H. K. Stelzer (1993). "Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index." Journal of Microscopy **169**: 391-405.
- Hilfger, C., F. Grigioni, C. DeBeaufort, G. Michel und F. Hentgest (1998). "Datenbankeintrag einer Sequenz des Rinderserumalbuminprecursorproteins." EMBL/Genbank/DDBJ Databases.
- Hirokawa, Y., H. Jinnai, Y. Nishikawa, T. Okamoto and T. Hashimoto (1999). "Direct observation of internal structures in poly(N-isopropylacrylamide) chemical gels." Macromolecules **32**: 7093-7099.
- Hjerten, S. (1962). "Chromatographic separation according to size of macromolecules and cell particles on columns of agarose suspensions." Archives of Biochemistry and Biophysics **99**: 466-475.
- Hubbuch, J., T. Linden, A. Ljunglöf und J. Thömmes (2001). "Microscopic analysis of protein adsorption to composite media using confocal laser scanning microscopy." in Vorbereitung.
- Hunter, A. K. und G. Carta (2000). "Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion-exchangers I. Morphology and equilibrium capacity." J. Chromatogr. A **897**: 65-80.
- Hunter, A. K. und G. Carta (2000). "Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion exchangers. II. Adsorption rates and column behavior." J. Chromatogr. A **897**(1-2): 81-97.
- Janeway, C. A. und P. Travers (1995). Immunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Janson, J. C. und L. Ryden (1998). Protein purification. New York, John Wiley & Sons, Inc.

- Kang, Y., J. B. Nah und B. T. Min (1990). "Dispersion and fluctuation of fluidized particles in a liquid-solid fluidized bed." Chem.Eng.Comm. **97**: 197-208.
- Karau, A. (1998). Verfahrenstechnische Grundlagen und Anwendungen der Fließbettadsorption in der Proteinaufarbeitung. Düsseldorf, VDI Verlag GmbH.
- Kim, H.-B., M. Hayashi, K. Nakatani und N. Kitamura (1996). "In situ measurements of ion-exchange processes in single polymer particles: Laser trapping microspectroscopy and confocal fluorescence microspectroscopy." Analytical Chemistry **68**: 409-414.
- Kopaciewicz, W., M. A. Rounds, J. Fausnaugh und F. E. Regnier (1983). "Retention model for high-performance ion-exchange chromatography." J. Chromatogr. **266**: 3-12.
- Kümmel, R. und E. Worch (1990). Adsorption aus wässrigen Lösungen. Leipzig, Deutscher Verlag für Grundstoffind.
- Laca, A., L. A. Garcia, F. Argüeso und M. Diaz (1999). "Protein diffusion in alginate beads monitored by confocal microscopy. The application of wavelets for data reconstruction und analysis." J. Industr. Microbiol. Biotechnol. **23**: 155-165.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Langedijk, A. C., S. Spinelli, C. Anguille, P. Hermans, J. Nederlof, J. Butenandt, A. Honegger, C. Cambillau und A. Plückthun (1999). "Insight into odornat perception: The crystal structure and binding characteristics of antibody fragments directed against the musk odorant traseolide." J. Mol. Biol. **292**: 855-869.
- Langmuir, I. (1918). "The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum." J. Am. Chem. Soc. **40**: 1361.
- Lenhoff, A. M. und S. R. Dziennik (1999). Beitrag 22b. präsentiert auf dem jährlichen Treffen des American institute of chemical engineers, Dallas, TX.
- Levenspiel, O. (1972). Chemical Reaction Engineering. New York, Wiley.
- Levenspiel, O. (1984). The Chemical Reactor Omnibook. Corvallis, Oregon, OSU Bookstore.

- Levenspiel, O. und W. K. Smith (1957). "Notes on the diffusion-type model for the longitudinal mixing of fluids in flow." Chemical Engineering Science **6**: 227-233.
- Lewus, R. K., F. H. Altan und G. Carta (1998). "Protein adsorption and desorption on gel-filled rigid particles for ion exchange." Ind. Eng. Chem. Res. **37**: 1079-1087.
- Lewus, R. K. und G. Carta (1999). "Binary protein adsorption on gel-composite ion-exchange media." AIChE Journal **45**(3): 512-522.
- Lewus, R. K. und G. Carta (1999). "Protein diffusion in charged polyacrylamide gels: Visualization and analysis." J. Chromatogr. A **865**(1-2): 155-68.
- Leyva-Ramos, R. und C. J. Geankoplis (1985). "Model simulation and analysis of surface diffusion of liquids in porous solids." Chemical Engineering Science **40**(5): 799-807.
- Liljeborg, A. (1996). "Simulation of light attenuation within fluorescent microspheres used for liquid fraction separation recorded by a CSLM." SPIE **2655**: 11-17.
- Linden, T., C. Lacki, A. Ljunglöf und J. Thömmes (2001). "Binary adsorption of monoclonal IgG and BSA to porous cation exchangers studied by confocal laser scanning microscopy." AIChE Journal **submitted**.
- Linden, T., A. Ljunglöf, L. Hagel, M.-R. Kula und J. Thömmes (2001). "Visualising patterns of protein uptake within porous media using confocal laser scanning microscopy." Sep. Sci. Tech. **70**(1).
- Linden, T., A. Ljunglöf, M.-R. Kula und J. Thömmes (1999). "Visualizing two-component protein diffusion in porous adsorbents by confocal scanning laser microscopy." Biotechnol. Bioeng. **65**(6): 622-630.
- Ljunglöf, A. (2000). Molar ionic capacities of SP-Sepharose FF and SP-Sepharose. XL Persönliche Information, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.
- Ljunglöf, A. (2001). Properties of SP-Sepharose XL media, part 1: Distribution coefficients. Interner Arbeitsbericht Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden.

- Ljunglöf, A., P. Bergvall, R. Bhikhabhai und R. Hjorth (1999). "Direct visualisation of plasmid DNA in individual chromatography adsorbent particles by confocal scanning laser microscopy." J. Chromatogr. A **844**: 129-135.
- Ljunglöf, A. und R. Hjorth (1996). "Confocal microscopy as a tool for studying protein adsorption to chromatographic matrices." J. of Chromatogr. A **743**: 75-83.
- Ljunglöf, A., M. Larsson, K.-G. Knuutila und J. Lindgren (2000). "Measurement of ligand distribution in individual adsorbent particles using confocal scanning laser microscopy and confocal micro-Raman spectroscopy." J. Chromatogr. A **893**: 235-244.
- Ljunglöf, A. und Thömmes, J. (1998). "Visualising intraparticle protein transport in porous adsorbents by confocal microscopy." J. of Chromatogr. A **813**: 387-395.
- Ma, Z., R. D. Whitley und N.-H. L. Wang (1996). "Pore and surface diffusion in multicomponent adsorption and liquid chromatography systems." AIChE Journal **42**(5): 1244-1262.
- Malmsten, M., K. Xing und A. Ljunglöf (1999). "Confocal Microscopy Studies of Trypsin Immobilization on Porous Glycidyl Methacrylate Beads." J Colloid Interface Sci **220**(2): 436-442.
- Margadant, F., T. Leemann und P. Niederer (1996). "A precise light attenuation correction for confocal scanning microscopy with $O(n^{4/3})$ computing time and $O(n)$ memory requirements for n voxels." Journal of Microscopy **182**: 121-132.
- Mattisson, C., T. Nylander, A. Axelsson und G. Zacchi (1996). "Diffusivity measurements using holographic laser interferometry in a cubic lipid-water phase." Chem. Phys. Lipids **84**: 1-12.
- McAlpine, S. R. und S. L. Schreiber (1999). "Visualizing functional group distribution in solid-support beads by using optical analysis." Chem. Eur. J. **5**(12): 3528-3532.
- Minsky, M. (1957). Microscopy apparatus. Patent #3013467. USA.
- Minsky, M. (1988). "Memoir on inventing the confocal scanning microscope." Scanning **10**: 128-138.

- Miyabe, K. und G. Guichon (2000). "Kinetic study of the mass transfer of bovine serum albumin in anion-exchange chromatography." J. Chromatogr. A **866**: 147-171.
- Morris, J. E., A. S. Hoffmann und R. R. Fisher (1993). "Affinity precipitation of proteins by polyligands." Biotechnol. Bioeng. **41**: 991-997.
- Moussaoui, M., M. Benlyas und P. Wahl (1992). "Diffusion of proteins in Sepharose Cl-B gels." J. Chromatogr. **591**: 115-120.
- Murray, J. L. (2000). "Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age." Semin Oncol **27**(6 Suppl 11): 64-70; discussion 92-100.
- Nicoud, R. M. und A. Seidel-Morgenstern (1996). "Adsorption isotherms: Experimental determination and application to preparative chromatography." Isolation & Purification **2**: 165-200.
- Norde, W. und C. Giacomelli (2000). "BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states." J. Biotechnol. **79**: 259-268.
- Ogston, A. G., B. N. Preston und J. D. Wells (1973). "On the transport of compact particles through solutions of chain polymers." Proc. R. Soc. Lond. **333 A**: 297.
- Palsson, E., A.-L. Smeds, A. Petersson und P.-O. Larsson (1999). "Faster isolation of recombinant factor VII SQ with a superporous agarose matrix." J. Chromatogr. A **840**: 39-50.
- Pawley, J. B. (1995). Handbook of Biological Confocal Microscopy. New York, Plenum Press.
- Peitsch, M. C. (1995). "Protein modelling by email." Bio/Technology **13**: 658-660.
- Peitsch, M. C. (1996). "ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling." Biochem. Soc. Trans. **24**: 274-279.

- Peitsch, M. C., T. Schwede und N. Guex (2000). "Automated protein modelling - the proteome in 3D." Pharmacogenomics **1**(257-266).
- Peters jr, T. (1985). "Serum albumin." Adv. Protein Chem. **37**: 161-245.
- Pluen, A., P. A. Netti, R. K. Jain und D. A. Berk (1999). "Diffusion of macromolecules in agarose gels: Comparison of linear and globular configurations." Biophysical Journal **77**: 542-552.
- Poitevin, E. und P. Wahl (1988). "Study of the translational diffusion of macromolecules in beads of gel chromatography by the FRAP method." Biophysical Chemistry **31**: 247-258.
- Porath, J., J. C. Janson und T. Laas (1971). "Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes: I. Desulphated and reduced cross-linked agar and agarose in spherical bead form." J. Chromatogr. **60**: 167-177.
- Porath, J., T. Laas und J. C. Janson (1975). "Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes: III. Rigid agarose gels cross-linked with divinyl sulphone (DVS)." J. Chromatogr. **103**: 49-62.
- Raj, T. und W. H. Flygare (1974). "Diffusion studies of bovine serum albumin by quasielastic light scattering." Biochemistry **13**(16): 3336-3340.
- Rämsch, C. (2000). Untersuchungen zur Verteilung von nativen und entfalteten Enzymen in wässrigen Zweiphasensystemen. Fakultät für Maschinenwesen. Aachen, Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule: 126.
- Redinbo, M. R., D. Cascio, M. K. Choukair, R. D., S. Merchant und T. O. Yeates (1993). "The 1,5 Å crystal structure of plastocyanin from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Biochemistry **32**: 10560-10567.
- Redinbo, M. R., T. O. Yeates und S. Merchant (1994). "Palstocyanin: Structural and functional analysis." J. Bioenerg. Biomemb. **26**: 49-66.
- Roerdink, J. B. T. M. und M. Bakker (1993). "An FFT-based method for attenuation correction in fluorescence confocal microscopy." Journal of Microscopy **169**: 3-14.

- Ruiz-Bevia, F., J. Fernandez-Sempere und J. Colom-Valiente (1989). "Diffusivity measurement in calcium alginate gel by holographic interferometry." *AIChE Journal* **35**: 1895-1898.
- Ruthven, D. M. (1984). *Principles of adsorption and adsorption processes*. New York, Wiley-Interscience.
- Ruthven, D. M. (1989). Adsorption Kinetics. *Adsorption: Science and Technology*. A. E. Rodriques, LeVan, M. D., Tondeur, D. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. **158**: 87-114.
- Salaman, M. R. und A. R. Williamson (1971). "Isoelectric focusing of proteins in the native and denatured states. Anomalous behaviour of plasma albumin." *Biochem J* **122**(1): 93-9.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaeberle, M. D., H. R. Morris, J. F. Turner II und P. J. Treado (1999). "Raman chemical imaging spectroscopy." *Analytical Chemistry News & Features*: 175-181.
- Schrof, Klingler, Heckmann und Horn (1998). "Confocal fluorescence and raman microscopy in industrial research." *Colloid & Polymer Science* **276**(7): 577-588.
- Scott, S. D. (1998). "Rituximab: A new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma." *Cancer Pract.* **6**(3): 195-197.
- Sellen, D. B. (1986). "The diffusion of compact macromolecules within hydrogels." *Br. Polym. J.* **18**: 28-31.
- Sellen, D. B. (1987). "Laser light scattering studies of polyacrylamide gels." *Polym. Sc.* **25**: 699-716.
- Siuzdak, G. (1996). *Mass spectrometry for biotechnology*. San Diego, Academic Press, Inc.

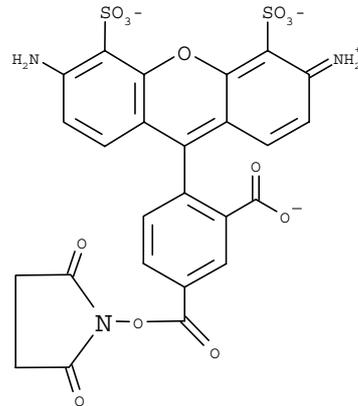
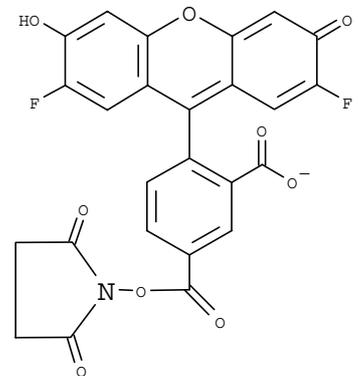
- Sjoberg, R., J. Nygren und M. Kubista (1995). "Absorption und fluorescence properties of fluorescein." Spectrochim. Acta A **51**.
- Skavril, F. V. (1992). Immunglobulin G. Human Protein Data. A. Haeberli. New York, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. **1. Auflage**.
- Skidmore, G. L., B. J. Horstmann und H. A. Chase (1990). "Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose FF." Journal of Chromatography **498**: 113-128.
- Slater, M. J. (1992). Principles of ion exchange technology. Oxford, Butterworth & Heinemann.
- Spencer, E. M. und T. P. King (1971). "Isoelectric heterogeneity of bovine plasma albumin." J Biol Chem **246**(1): 201-8.
- Spiess, A. C. und V. Kasche (2001). "Direct measurement of pH-Profiles in immobilized enzyme carriers during kinetically controlled synthesis using clsm." Biotechnol. Progr. **17**: 294-303.
- Subramanian, A., K. E. Van Cott, D. S. Milbrath and W. H. Velander (1994). "Role of local antibody density effects on immunosorbent efficiency." J. Chromatogr. A **672**: 11-24.
- Switzer, R. C., 3rd, C. R. Merrill und S. Shifrin (1979). "A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels." Anal Biochem **98**(1): 231-7.
- Tanford, C. (1961). Physical chemistry of macromolecules. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Tanford, C., J. G. Buzzell, D. G. Rands und S. A. Swanson (1955). "The reversible expansion of bovine serum albumin in acid solutions." Journal of the American Chemical Society **77**(24): 6421-6428.
- Tanford, C., J. D. Hauenstein und D. G. Rands (1956). "Phenolic hydroxyl ionization in Proteins. II. Ribonuclease." Journal of the American Chemical Society **77**(24): 6409-6413.

- Tanford, C. und R. Roxby (1972). "Interpretation of protein titration curves. Application to lysozyme." Biochemistry **11**(11): 2192-8.
- Tanford, C., S. A. Swanson und W. S. Shore (1955). "Hydrogen ion equilibria of bovine serum albumin." Journal of the American Chemical Society **77**(24): 6414-6421.
- Tanford, C. und M. L. Wagner (1954). "Hydrogen ion equilibria of lysozyme." **76**.
- Tanke, H. J., P. Van Oostveldt und P. Van Duijn (1982). "A parameter for the distribution of fluorophores in cells derived from measurements of inner filter effect and reabsorption phenomenon." Cytometry **6**: 359-369.
- Thömmes, J. (1999). "Investigations on protein adsorption to Agarose-Dextran composite media." Biotechnol. Bioeng. **62**: 358-362.
- Thömmes, J., A. Bader, M. Halfar, A. Karau und M.-R. Kula (1996). "Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a Protein A coated adsorbent in expanded beds." J. Chromatogr. A **752**: 111-122.
- Tong, J. und J. L. Anderson (1996). "Partitioning and diffusion of proteins and linear polymers in polyacrylamide gels." Biophysical Journal **70**(3): 1505-1513.
- Tongta, A., A. I. Liapis und D. J. Siehr (1994). "Equilibrium and kinetic parameters of the adsorption of α -chymotrypsinogen A onto hydrophobic porous adsorbent particles." J. Chromatogr. A **686**: 21-29.
- Tsou, H.-S. und E. E. Graham (1985). "Prediction of adsorption and desorption of protein on dextran-based ion-exchange resin." AIChE Journal **31**(12): 1959-1966.
- Tyn, M. T. und T. W. Gusek (1990). "Prediction of Diffusion Coefficients of Proteins." Biotechnol. Bioeng. **35**: 327-338.
- van der Wiel, J. P. und J. A. Wesselingh (1989). Continuous adsorption in biotechnology. Adsorption: Science and technology. A. E. Rodrigues, LeVan, M. D., Tondeur, D. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. **158**: 427-469.

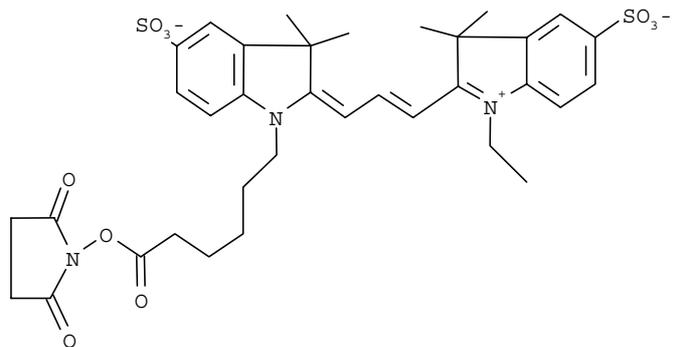
- van Oostveldt, P. und S. Bauwens (1990). "Quantitative fluorescence in confocal microscopy (The effect of the detection pinhole aperture on the re-absorption and inner filter phenomena)." Journal of Microscopy **158**: 121-132.
- Velayudhan, A. und C. Horvath (1988). "Preparative chromatography of proteins: Analysis of the multivalent ion-exchange formalism." J. Chromatogr. **443**: 13-29.
- Velayudhan, A. und C. Horvath (1994). "Adsorption and ion-exchange isotherms in preparative chromatography." J. Chromatogr. A **663**: 1-10.
- Verschiedene (1999). Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Leiden, Molecular Probes.
- Visscher, K., G. J. Brakenhoff und T. D. Visser (1994). "Fluorescence saturation in confocal microscopy." Journal of Microscopy **175**: 162-165.
- Visser, T. D., F. C. Groen und G. J. Brakenhoff (1991). "Absorption and scattering correction in fluorescence confocal microscopy." Journal of Microscopy **163**: 189-200.
- Waki, S., J. D. Harvey und A. R. Bellamy (1982). "Study of agarose gels by electron microscopy of freeze-fractured surfaces." Biopolymers **21**: 1909-1926.
- Wallevik, K. (1973). "Isoelectric Focusing of Bovine Serum Albumine Influence of Binding of Carrier Ampholytes." Biochimica et Biophysica Acta **322**: 75 - 87.
- Warwicker, J., D. Ollis, F. M. Richards und T. A. Steitz (1985). "Electrostatic field of the large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I." J Mol Biol **186**(3): 645-9.
- Weatherley, L. R. (1994). Engineering processes for bioseparations. Oxford, Butterworth & Heinemann Ltd.
- Weaver, L. E. und G. Carta (1996). "Protein adsorption on cation exchangers: comparison of macroporous und gel-composite media." Biotechnol. Progr. **12**: 342-355.
- Westermeier, R. (1990). Elektrophorese-Praktikum. Weinheim, VCH.

- Westrin, B. A. (1991). Diffusion measurements in gels. Chemical engineering I; Chemical Center. Lund, Lund University: 149.
- Whitley, R. D., J. M. Brown, P. Karajgikar und N.-H. L. Wang (1989). "Determination of ion-exchange equilibrium parameters of amino acid and protein systems by an impulse response technique." J. Chromatogr. **483**: 263-287.
- Whitley, R. D., R. Wachter und N.-H. L. Wang (1989). "Ion-exchange equilibria of lysozyme, myoglobin and bovine serum albumin. Effective valence an exchanger capacity." J. Chromatogr. **465**: 137-156.
- Wright, P. R., F. J. Muzzio und B. J. Glasser (1998). "Batch uptake of lysozyme: Effect of solution viscosity und mass transfer on adsorption." Biotechnol. Progr. **14**: 913-921.
- Yagi, S. und D. Kunii (1955). Combustion of carbon particles in flames und fluidized beds. 5th Symposium on Combustion, New York, Reinhold Publishers.
- Yoshida, H. und K. Fujita (1999). "Fabrication of hard dextran DEAE: Adsorption equilibria of BSA." Adsorption **5**: 63-71.
- Yoshida, H. und T. Kataoka (1989). "Adsorption of BSA on cross-linked chitosan: The equilibrium isotherm." The Chemical Engineering Journal **41**: B11-B15.
- Yoshida, H., M. Yoshikawa und T. Kataoka (1994). "Parallel transport of BSA by surface und pore diffusion in strongly basic chitosan." AIChEJ **40**(12): 2034-2044.

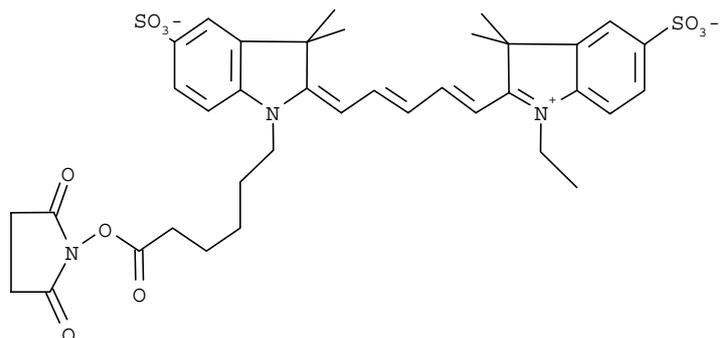
Anhang A: Strukturformeln der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

A.1: Fluoreszenzfarbstoff AlexaTM488 M_w : 643 g/molA.2: Fluoreszenzfarbstoff Oregon GreenTM488 M_w : 509 g/mol

A.3: Fluoreszenzfarbstoff Cy3

 M_w : 778 g/mol

A.4: Fluoreszenzfarbstoff Cy5

 M_w : 792 g/mol

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

Unterprogramm Grafi.bas

Option Explicit

```
Public Sub zeichnen_li(ort As Object)
```

```
Dim li As Integer
```

```
Dim x1 As Single
```

```
Dim x2 As Single
```

```
Dim y1 As Single
```

```
Dim y2 As Single
```

```
'Einzelne Punkte auslesen und bearbeiten
```

```
For li = 0 To i - 4
```

```
'Koordinaten festlegen
```

```
    x1 = xPos(feld(li).i, i, ort)
```

```
    y1 = yPos(feld(li).y, highY.y, ort)
```

```
    x2 = xPos(feld(li + 1).i, i, ort)
```

```
    y2 = yPos(feld(li + 1).y, highY.y, ort)
```

```
'Graph zeichnen
```

```
    ort.Line (x1, y1)-(x2, y2)
```

```
'    x1 = xPos(feld(li).i, i, Plot.Pic)
```

```
'    y1 = yPos(feld(li).y, highY.y, Plot.Pic)
```

```
'    x2 = xPos(feld(li + 1).i, i, Plot.Pic)
```

```
'    y2 = yPos(feld(li + 1).y, highY.y, Plot.Pic)
```

```
,
```

```
' 'Graph zeichnen
```

```
'    Plot.Pic.Line (x1, y1)-(x2, y2)
```

```
Next li
```

```
End Sub
```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

```
Public Function xPos(xWert As Double, maxX As Double, ort As Object)
```

```
'xWert zeigt auf die zu berechnende Position
'maxX gibt den größten xWert der erwartet wird an
'Ort gibt den Ort der Darstellung an
```

```
Dim scaX As Double
Dim weite
```

```
weite = ort.Width - ort.Width / 10
scaX = (weite / maxX) + ((Ort.Width / maxX) / 10)
```

```
xPos = scaX * xWert + ort.Width / 20
'xPos = scaX * xWert
```

```
End Function
```

```
Public Function yPos(yWert As Double, maxY As Double, ort As Object)
```

```
Dim scaY As Double
Dim hoch
```

```
hoch = ort.Height - ort.Height / 5
scaY = (hoch / maxY)
```

```
yPos = ort.Height - (scaY * yWert) - ort.Height / 10
```

```
End Function
```

```
Public Sub StartKreuz(ort As Object)
```

```
Dim x1 As Double
Dim y1 As Double
Dim x2 As Double
Dim y2 As Double
Dim x3 As Double
Dim y3 As Double
```

```
x1 = xPos(0, i / 2, ort)
y1 = yPos(highY.y, highY.y, ort)
x2 = xPos(0, i / 2, ort)
y2 = yPos(0, highY.y, ort)
x3 = xPos(i / 2, i / 2, ort)
y3 = yPos(0, highY.y, ort)
```

```
ort.Line (x1, y1)-(x2, y2)
ort.Line (x2, y2)-(x3, y3)
```

```
End Sub
```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

Unterprogramm Mathe.bas

Option Explicit

Public Function Xschnitt(fld() As test, Start As Double, ende As Double)
'Public Function Xschnitt(fld() As Test, siz As Double)

```
Dim m As Integer
Dim sx As Double
Dim sy As Double
Dim qx As Double
Dim sxy As Double
Dim stei As Double
Dim schn As Double
Dim siz As Double
```

```
sx = 0
sy = 0
sxy = 0
qx = 0
siz = 0
```

```
For m = Start To ende
    sx = sx + fld(m).i
    sy = sy + fld(m).y
    sxy = sxy + fld(m).i * fld(m).y
    qx = qx + fld(m).i ^ 2
    siz = siz + 1
Next m
```

```
stei = (siz * sxy - sx * sy) / (siz * qx - sx ^ 2)
```

```
'MsgBox (stei)
schn = (sy / siz) - (stei * sx / siz)
'MsgBox (schn)
Xschnitt = -schn / stei
'MsgBox (Xschnitt)
```

End Function

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

Public Function AchsenschnittT(fld() As test, Start As Double, ende As Double)

```
Dim m As Integer
Dim sx As Double
Dim sy As Double
Dim qx As Double
Dim sxy As Double
Dim stei As Double
Dim schn As Double
Dim siz As Double
```

```
sx = 0
sy = 0
sxy = 0
qx = 0
siz = 0
```

```
For m = Start To ende
    sx = sx + fld(m).i
    sy = sy + fld(m).yr
    sxy = sxy + fld(m).i * fld(m).yr
    qx = qx + fld(m).i ^ 2
    siz = siz + 1
Next m
```

```
stei = (siz * sxy - sx * sy) / (siz * qx - sx ^ 2)
```

```
AchsenschnittT = (sy / siz) - (stei * sx / siz)
```

End Function

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

Public Function SteigungG(fld() As test, Start As Double, ende As Double)

```
Dim m As Integer
Dim sx As Double
Dim sy As Double
Dim qx As Double
Dim sxy As Double
Dim stei As Double
Dim schn As Double
Dim siz As Double
```

```
sx = 0
sy = 0
sxy = 0
qx = 0
siz = 0
m = 0
```

For m = Start To ende

```
    sx = sx + fld(m).i
    sy = sy + fld(m).yr
    sxy = sxy + fld(m).i * fld(m).yr
    qx = qx + fld(m).i ^ 2
    siz = siz + 1
Next m
```

SteigungG = (siz * sxy - sx * sy) / (siz * qx - sx ^ 2)

End Function

Public Function Bestimmtheit(fld() As test, Start As Double, ende As Double)

```
Dim m As Double
Dim sx As Double
Dim sy As Double
Dim qx As Double
Dim sxy As Double
Dim stei As Double
Dim schn As Double
Dim siz As Double
Dim qy As Double
Dim test As Double
```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

```

sx = 0
sy = 0
sxy = 0
qx = 0
siz = 0
qy = 0

```

```

For m = Start To ende
  sx = sx + fld(m).i
  sy = sy + fld(m).yr
  sxy = sxy + fld(m).i * fld(m).yr
  qx = qx + fld(m).i ^ 2
  qy = qy + fld(m).yr ^ 2
  siz = siz + 1

```

```

Next m

```

```

  Bestimmtheit = Abs((((siz * sxy) - (sx * sy)) / Sqr(((siz * qx) - sx ^ 2) * ((siz * qy) - sy
^ 2))))

```

```

End Function

```

```

Public Sub regi(ort As Object)

```

```

  Dim xsl As Double
  Dim st As Double
  Dim achsE As Double
  Dim x1 As Double
  Dim y1 As Double
  Dim x2 As Double
  Dim y2 As Double
  Dim check As Boolean
  Dim stg As Double
  Dim maxsteiG As Double
  Dim m As Double
  Dim sto As Double
  Dim high2 As test
  Dim minsteiG As Double
  Dim SteigtestV As Double
  Dim SteigtestP As Integer
  Dim DecTestV As Double
  Dim DecTestP As Integer
  Dim swt As Integer

```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

```
'ort.Cls
'Call StartKreuz(ort)
'Call StartKreuz(ort)
'Call zeichnen_li(ort)
'Call zeichnen_li(Plot.Pic)
```

```
m = 0
stg = 0
x1 = 0
x2 = 0
y1 = 0
y2 = 0
maxsteiG = 0
minsteiG = 0
```

```
SteigtestV = 0
SteigtestP = 0
DecTestV = 0
DecTestP = 0
```

```
'##### wichtig #####
swt = 6 ' Bestimmt die Suchweite vor und Hinter der Position ( halbe Anzahl der
Regressionpunkte )
'#####
```

```
For m = (swt + 1) To i - (swt + 1)
  If SteigungG(feld, m - swt, m + swt) > SteigtestV Then
    SteigtestV = SteigungG(feld, m - swt, m + swt)
    SteigtestP = m
  End If

  If SteigungG(feld, m - swt, m + swt) < DecTestV Then
    DecTestV = SteigungG(feld, m - swt, m + swt)
    DecTestP = m
  End If
```

```
Next m
```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

```

#####Ermittlung der Steigungen#####

maxsteiG = SteigtestP - swt
sto = SteigtestP + swt

If Graf.btY1.ListIndex > -1 Then
    maxsteiG = Graf.btY1.ListIndex
End If
If Graf.tpY1.ListIndex > -1 Then
    sto = Graf.tpY1.ListIndex
End If

Graf.btY1.ListIndex = maxsteiG
Graf.tpY1.ListIndex = sto

' x1 = xPos(feld(maxsteiG).i, i, ort)
' y1 = yPos(feld(maxsteiG).y, highY.y, ort)
' ort.Circle (x1, y1), weite
' x1 = xPos(feld(sto).i, i, ort)
' y1 = yPos(feld(sto).y, highY.y, ort)
' ort.Circle (x1, y1), weite

xsl = (Xschnitt(feld, maxsteiG, sto))
st = (SteigungG(feld, maxsteiG, sto))
achsE = (AchsenschnitT(feld, maxsteiG, sto))

'Ausgabe Hauptfenster
x1 = xPos(xsl, i, ort)
y1 = yPos(0, highY.y, ort)
x2 = xPos(highY.i, i, ort)
y2 = yPos(st * highY.i + achsE, highY.y, ort)

ort.Line (x1, y1)-(x2, y2), vbRed

Graf.SchnittLI.text = Int(xsl + 0.5)
Graf.bestLI.text = BestimmtheiT(feld, maxsteiG, sto)

```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

```
minsteiG = DecTestP - swt  
sto = DecTestP + swt
```

```
If Graf.btY2.ListIndex > -1 Then  
    minsteiG = Graf.btY2.ListIndex  
End If  
If Graf.tpY2.ListIndex > -1 Then  
    sto = Graf.tpY2.ListIndex  
End If
```

```
Graf.btY2.ListIndex = minsteiG  
Graf.tpY2.ListIndex = sto  
xsl = (Xschnitt(feld, Graf.btY2.ListIndex, Graf.tpY2.ListIndex))  
st = (Steigung(feld, Graf.btY2.ListIndex, Graf.tpY2.ListIndex))  
achsE = (Achsenschnitt(feld, Graf.btY2.ListIndex, Graf.tpY2.ListIndex))
```

```
x1 = xPos(xsl, i, ort)  
y1 = yPos(0, highY.y, ort)  
x2 = xPos(highY.i, i, ort)  
y2 = yPos(st * highY.i + achsE, highY.y, ort)
```

```
ort.Line (x1, y1)-(x2, y2), vbGreen
```

```
Graf.SchnittRE.text = Int(xsl + 0.5)  
Graf.bestRE.text = Bestimmtheit(feld, Graf.btY2.ListIndex, Graf.tpY2.ListIndex)
```

```
End Sub
```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

Unterprogramm Analysestart.bas

```
Option Explicit
Public Type test
    i As Double
    x As Double
    y As Double
    yr As Double
End Type
```

```
Public Type test1
    x As Double
    y As Double
    p As Double
End Type
```

```
Public Qualy As Single
Public weg As String ' Pfad zur Quelldatei
Public feld() As test ' Datenfeld
Public i As Double ' Anzahl der Datenpaare
Public highY As test ' Höchster Wert im Datenfeld
Public weite As Byte ' Größe der Indexpunkte im Graph
Public pos As Long ' Position des höchsten y - Werts im Feld
Public Fehlerquadrat As Double
Public Sichtweite As Double
Public suchweite As Single
Public pi As Double
Public Faktor As Double
Public SeitE As Long
Public x As Long
Public y As Long
Public links As Integer
Public rechts As Integer
Public delx As Single
Public XIU As Double
Public YIU As Double
Public XIO As Double
Public YIO As Double
Public XrU As Double
Public YrU As Double
Public XrO As Double
Public YrO As Double
```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

'Mathematik abgeschaltet, nachschauen, was erneuert werden kann

Sub main()

```
'Größe Punkt festlegen
Dim text As Variant
Dim Text2 As Variant
Dim Text3 As Variant
Dim start1 As Variant
Dim start2 As Variant
Dim ende1 As Variant
```

```
weg = ""
weite = 50
Qualy = 95
suchweite = 6
```

```
pi = 4 * Atn(1)
Hauptfenster.Show
```

```
'Einlesen, Datensatz 1
```

```
Call laden
```

End Sub

Public Sub laden()

```
Graf.Dialog1.Filter = "*.txt|*.txt"
Graf.Dialog1.ShowOpen
```

```
If Graf.Dialog1.filename <> "" Then
    i = 0
    Graf.btY1.Clear
    Graf.btY2.Clear
    Graf.tpY1.Clear
    Graf.tpY2.Clear
```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

```
weg = Graf.Dialog1.filename
ReDim feld(0)
highY = feld(0)
Call einlesen
'oeffnen.Show
End If
```

```
End Sub
```

```
Sub einlesen()
```

```
Dim Zeile As String
Dim semi As Integer
Dim Zahl1 As String
Dim Zahl2 As String
Dim ZahlA As String
Dim k As Integer
Dim m As Integer
Dim summe As Double
```

```
Graf.Show
```

```
Open Graf.Dialog1.filename For Input As #1
Graf.Caption = "Analyse" + " " + Graf.Dialog1.filename
i = 0
Do Until EOF(1)
Line Input #1, Zeile
If Zeile <> "" Then
```

```
ReDim Preserve feld(i + 1)
semi = 0
semi = InStr(Zeile, ";")
Zahl1 = Left(Zeile, semi - 1)
Zahl2 = Mid(Zeile, semi + 1, Len(Zeile) - semi - 1)
```

```
Zahl1 = "0" + LTrim(Zahl1)
Zahl2 = LTrim(Zahl2)
```

```
semi = 0
semi = InStr(Zahl1, ".")
```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

```

    If semi <> 0 Then
        ZahlA = Left(Zahl1, semi - 1) + "," + Mid(Zahl1, semi + 1, Len(Zahl1) -
semi)
        'MsgBox (ZahlA + " " + Zahl1)
    Else
        ZahlA = Zahl1
    End If

    feld(i).i = i
    feld(i).x = CDb1(ZahlA)
    feld(i).y = CDb1(Zahl2)
    If i > 1 Then delx = delx + feld(i).x - feld(i - 1).x

    If feld(i).y > highY.y Then
        highY = feld(i)
        pos = i
    End If

    i = i + 1

End If

Loop

i = i - 1

Close #1

For k = 0 To i - 3
    summe = 0
    For m = 0 To 2

        summe = summe + feld(k + m).y

    Next m
    feld(k).yr = summe / 3
    'MsgBox (feld(k).yr)

    Graf.btY1.AddItem "X: " + CStr(feld(k).x) + " Y: " + CStr(feld(k).y), CInt(feld(k).i)
    Graf.tpY1.AddItem "X: " + CStr(feld(k).x) + " Y: " + CStr(feld(k).y), CInt(feld(k).i)
    Graf.btY2.AddItem "X: " + CStr(feld(k).x) + " Y: " + CStr(feld(k).y), CInt(feld(k).i)
    Graf.tpY2.AddItem "X: " + CStr(feld(k).x) + " Y: " + CStr(feld(k).y), CInt(feld(k).i)

```

Anhang B 1.: Visual Basic Programm „Analyse“ zur Auswertung von Intensitätsprofilen

Next k

'Call regi(Graf.bild_li)

Graf.Show

Plot.Show

delx = delx / (i - 1)

End Sub

Anhang B 2.: Visual Basic Programm „Convert“ zur Konvertierung der Intensitätsprofile

Unterprogramm Startconvert.bas

Option Explicit

Public weg As String ' Pfad zur Quelldatei

Public wb As Workbook

Public Swb As Workbook

Sub Main()

weg = ""

oeffnen.Show

Call laden

End Sub

Public Sub laden()

Dim check As Boolean

Dim i As Integer

check = False

oeffnen.Dialog1.Filter = "*.xls|*.xls"

oeffnen.Dialog1.ShowOpen

If oeffnen.Dialog1.filename <> "" Then

i = 0

weg = oeffnen.Dialog1.filename

Set wb = GetObject(oeffnen.Dialog1.filename)

oeffnen.Show

Call convert

Else

End

End If

End Sub

Anhang B 2.: Visual Basic Programm „Convert“ zur Konvertierung der Intensitätsprofile

```
Sub convert()  
Dim Reihe As Long  
    Dim SeitE As Integer  
  
    Dim xw As Double  
    Dim yw1 As Double  
    Dim yw2 As Double  
    Dim yw3 As Double  
  
    Dim sht As Worksheet  
  
    Dim Text1 As String  
    Dim Text2 As String  
    Dim Text3 As String  
    Dim file1 As String  
    Dim file2 As String  
    Dim file3 As String  
    Dim state As String  
  
    oeffnen.Caption = weg  
    oeffnen.mng.Text = CStr(wb.Sheets.Count)  
  
    For SeitE = 1 To wb.Sheets.Count  
        oeffnen.cnt.Text = Str(SeitE)  
  
        Set sht = wb.Worksheets(SeitE)  
  
        Reihe = 5  
  
        file1 = sht.Name + "_C1.txt"  
        file2 = sht.Name + "_C2.txt"  
        file3 = sht.Name + "_C3.txt"  
  
        Open file1 For Output As 1  
        Open file2 For Output As 2  
        Open file3 For Output As 3  
  
        Do While sht.Cells(Reihe, 2).Value <> ""
```

Anhang B 2.: Visual Basic Programm „Convert“ zur Konvertierung der Intensitätsprofile

```
xw = CDbI(sht.Cells(Reihe, 1).Value)
yw1 = CDbI(sht.Cells(Reihe, 2).Value)
yw2 = CDbI(sht.Cells(Reihe, 3).Value)
yw3 = CDbI(sht.Cells(Reihe, 4).Value)
```

```
Text1 = Str(xw) + ";" + Str(yw1) + ";"
Text2 = Str(xw) + ";" + Str(yw2) + ";"
Text3 = Str(xw) + ";" + Str(yw3) + ";"
```

```
Print #1, Text1
Print #2, Text2
Print #3, Text3
state = "Reihe : " + CStr(Reihe) + " Sheet : " + CStr(SeitE)
oeffnen.Caption = state
Reihe = Reihe + 1
```

Loop

```
Close #1
Close #2
Close #3
```

Next SeitE

Set wb = Nothing

```
Unload oeffnen
End Sub
```

Anhang C: Experimentelle Daten zur Einkomponentenadsorption im Rührreaktor

Anhang C 1.: BSA 50 mM Acetatpuffer pH 4,5

Volumen Reaktor: 25 mL

c_i : 2,51 kg/m³

V_{Gel} : 0,16 mL

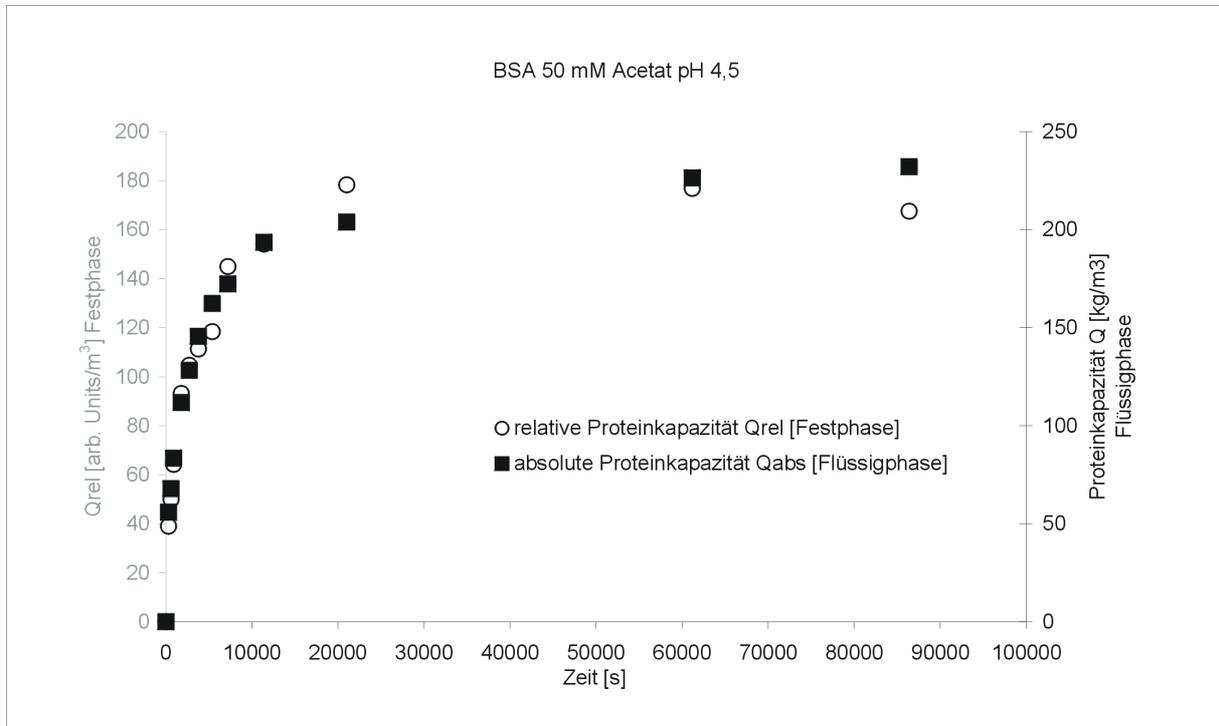


Abbildung C1: Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel (BSA 50 mM Acetat pH 4,5)

Tabelle C1: Experimentelle Daten (BSA 50 mM Acetat pH 4,5)

Zeit		Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz.	Kapazität Qabs (Flüssigphase)	Kapazität Qrel (Festphase)	F(t)
[Min]	[s]	I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]	[kg/m ³]	[kg/m ³]	[kg/m ³]	Qrel/Qrel ^{eq}
0	0	6202352	6289695	6233933	2,51	0,00	0,00	0,00
5	300	5497665	5565326	5519405	2,45	55,82	38,97	0,22
10	600	5341515	5412163	5364748	2,37	67,90	49,96	0,28
15	900	5163513	5194175	5166753	2,27	83,37	64,26	0,36
30	1800	4788938	4840200	4802478	2,09	111,83	93,20	0,52
45	2700	4568290	4643195	4593652	1,99	128,14	104,58	0,60
63	3780	4366721	4397889	4370214	1,88	145,60	111,24	0,62
90	5400	4154131	4181024	4155487	1,77	162,37	118,36	0,67
120	7200	4022990	4058197	4028503	1,70	172,29	144,94	0,81
190	11400	3736267	3803213	3757649	1,57	193,45	154,08	0,87
350	21000	3632633	3639336	3623894	1,50	203,90	178,37	1,00
1020	61200	3311017	3385429	3336132	1,36	226,39	176,87	1,00

Anhang C 2.:BSA 10 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

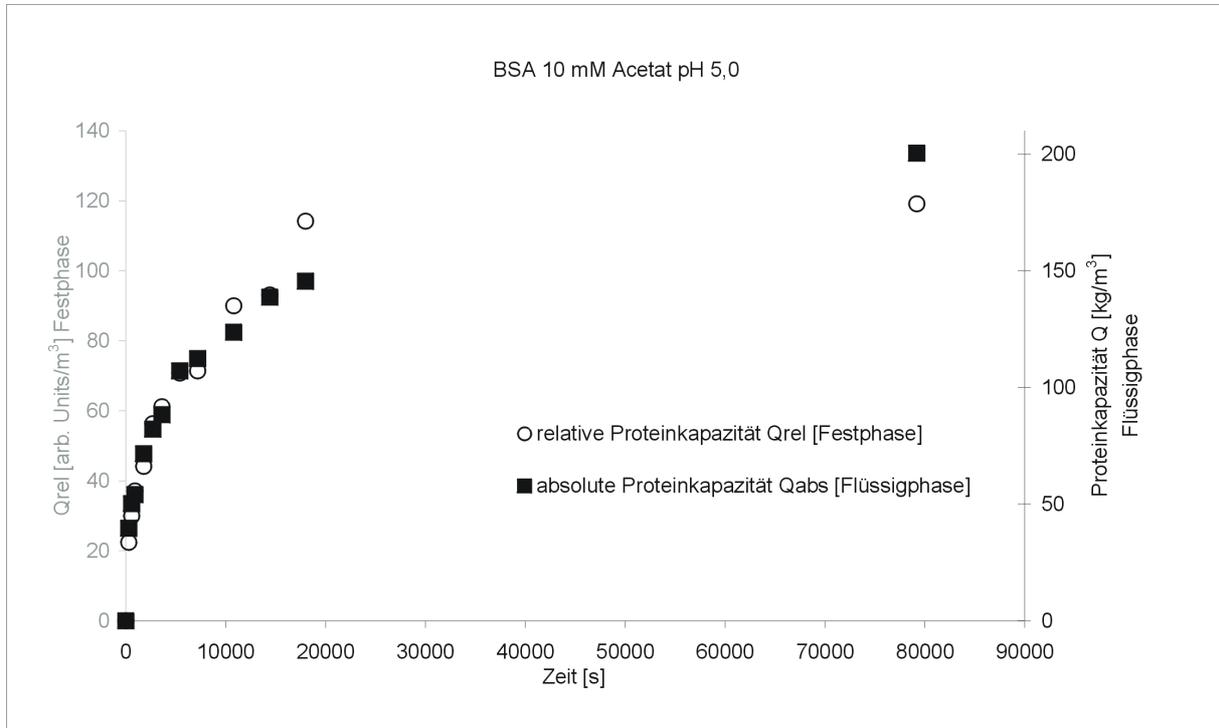
 c_i : 2,42 kg/m³ V_{Gel} : 0,2 mL

Abbildung C2: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (BSA 10 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle C2: Experimentelle Daten (BSA 10 mM Acetat pH 5,0)

Zeit [Min]	Zeit [s]	Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Q_{abs} (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Q_{rel} (Festphase) [mg/ml]	F(t) Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}
		I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	4818237	4812150	4799203	2,42	0,00	0,00	0,00
5	300	4142481	4217138	4163819	1,89	39,71	22,47	0,20
10	600	3979900	4043213	3995566	1,80	50,23	29,92	0,26
15	900	3926666	3974234	3934459	1,77	54,05	37,08	0,32
30	1800	3647624	3693166	3654404	1,63	71,55	44,09	0,39
45	2700	3502002	3497944	3483982	1,55	82,20	56,31	0,49
60	3600	3391001	3414109	3386564	1,50	88,29	61,13	0,54
90	5400	3094011	3110635	3086332	1,35	107,05	70,82	0,62
120	7200	2976995	3056327	3000670	1,30	112,41	71,35	0,62
180	10800	2852844	2821566	2821214	1,21	123,62	89,97	0,79
240	14400	2539290	2653371	2580340	1,09	138,68	93,05	0,82
300	18000	2463433	2509931	2470691	1,04	145,53	114,17	1,00
1320	79200	1601922	1617192	1593566	0,60	200,35	119,17	1,00
360	21600	2452661	2460717	2440698	1,02	147,41	131,47	1,15
900	54000	2089601	2142752	2100186	0,85	168,69	134,76	1,18

Anhang C 3.:BSA 50 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

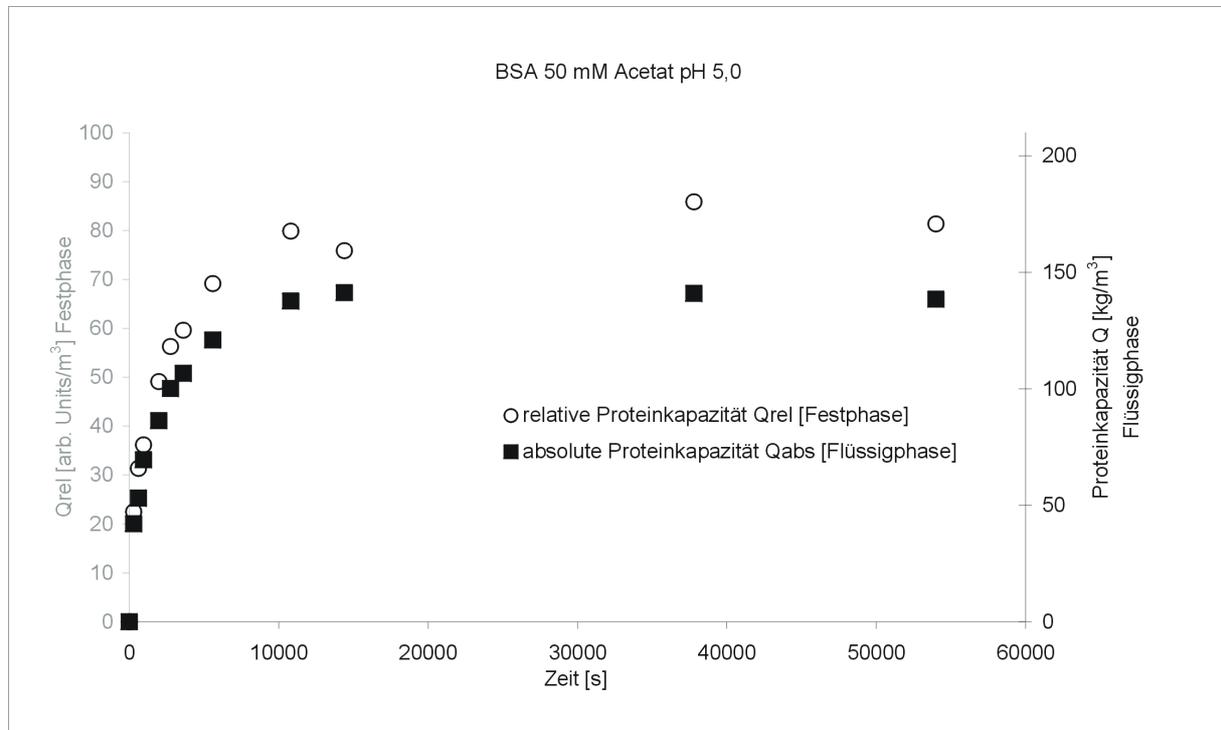
 c_i : 2,39 kg/m³ V_{Gel} : 0,20 mL

Abbildung C3: : Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel BSA 50 mM Acetat pH 5,0

Tabelle C3: Experimentelle Daten (BSA 50 mM Acetat pH 5,0)

Zeit		Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Qabs (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Qrel (Festphase) [mg/ml]	F(t) Qrel/Qrel ^{eq}
[Min]	[s]	I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	475639	479147	476026,5	2,39	0,00	0,00	
5	300	409036	411047	408675	2,06	42,09	0,28	
10	600	391871	392751	390944,5	1,97	53,18	0,39	
16	960	368102	364151	364760	1,84	69,54	0,44	
33	1980	337812	340419	337749	1,71	86,42	0,60	
46	2760	313463	320934	315832	1,60	100,12	0,69	
60	3600	305661	307433	305180,5	1,54	106,78	0,73	
93	5580	283540	284212	282509,5	1,43	120,95	0,85	
180	10800	255956	257819	255521	1,30	137,82	0,98	
240	14400	250309	252045	249810,5	1,27	141,39	0,93	
630	37800	250323	252976	250283	1,27	141,09	1,12	
900	54000	253880	257524	254335,5	1,29	138,56	1,00	

Anhang C 4.:BSA 100 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

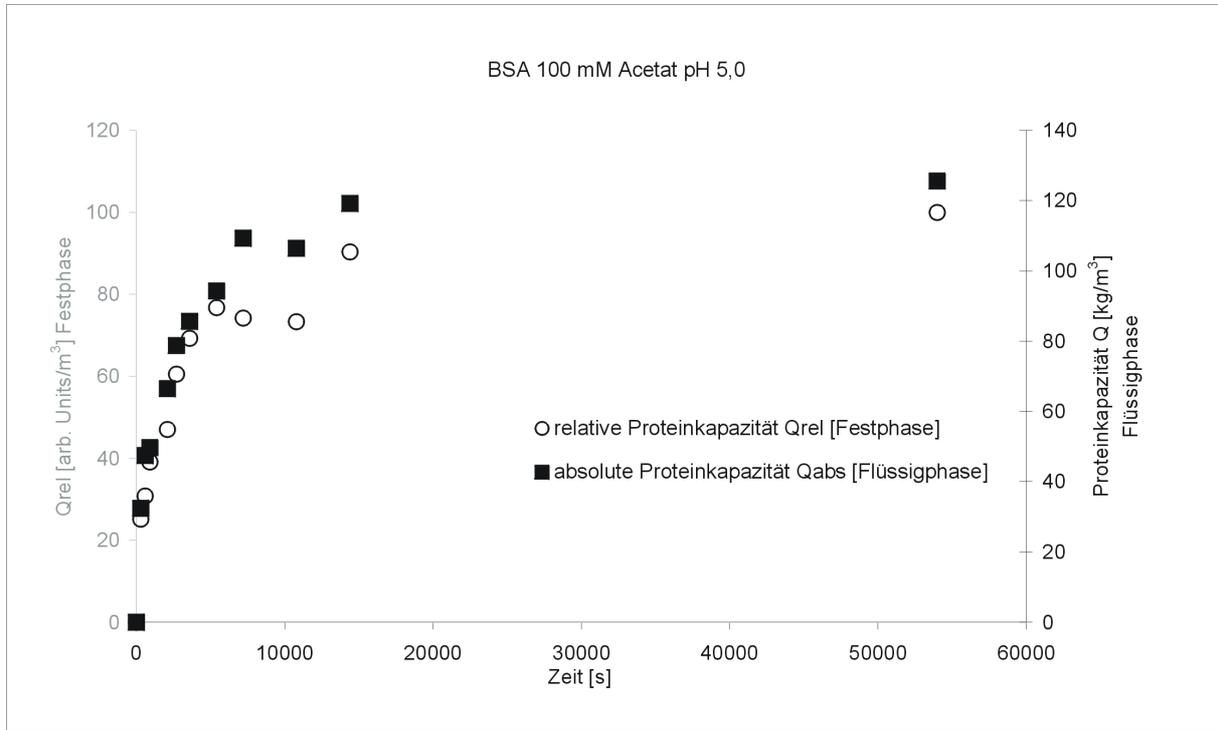
 c_i : 2,64 kg/m³ V_{Gel} : 0,22 mL

Abbildung C4: : Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel BSA 100 mM Acetat pH 5,0

Tabelle C4: Experimentelle Daten (BSA 100 mM Acetat pH 5,0)

Zeit [Min]	Zeit [s]	Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Qabs (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Qrel (Festphase) [mg/ml]	F(t) Qrel/Qrel ^{eq}
		I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	4759983	4732739	4734175	2,46	0,00	0,00	0,00
5	300	4214623	4258656	4224454	2,18	32,41	25,14	0,25
10	600	3998553	4021636	3997909	2,05	47,45	30,82	0,31
15	900	3957499	3986839	3959983	2,03	49,77	39,06	0,39
30	2100	3695328	3730898	3700927	1,88	66,55	47,06	0,47
45	2700	3503029	3553073	3515865	1,78	78,70	60,52	0,61
60	3600	3374036	3429568	3389616	1,72	85,65	69,31	0,69
90	5400	3256278	3294140	3263023	1,64	94,33	76,80	0,77
120	7200	3035352	3048221	3029601	1,51	109,38	74,23	0,74
180	10800	3095474	3080940	3076021	1,54	106,48	73,36	0,73
240	14400	2866166	2912576	2877185	1,43	119,21	90,35	0,90
900	54000	2776539	2815918	2784043	1,37	125,58	99,98	1,00

Anhang C 5.:BSA 150 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

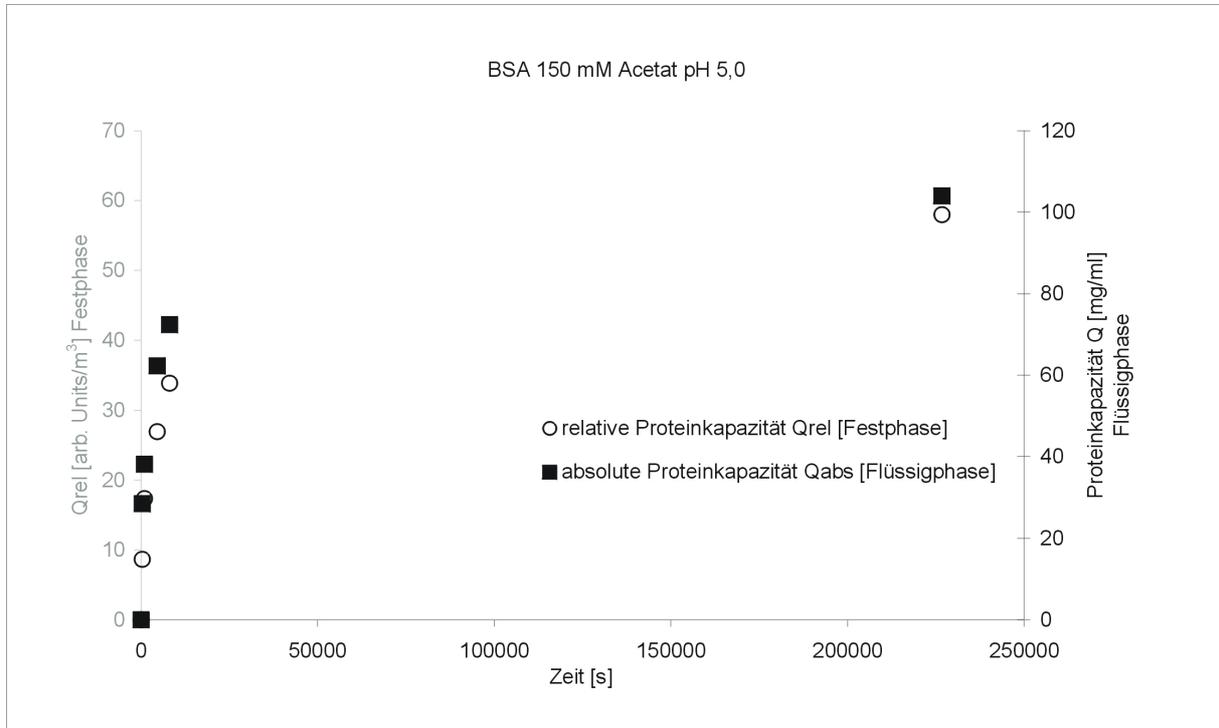
 c_i : 2,64 kg/m³ V_{Gel} : 0,22 mL

Abbildung C5: : Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel BSA 150 mM Acetat pH 5,0

Tabelle C5: Experimentelle Daten (BSA 150 mM Acetat pH 5,0)

Zeit		Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Qabs (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Qrel (Festphase) [mg/ml]	F(t) Qrel/Qrel ^{eq}
[Min]	[s]	I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	5013531	5059016	5028756	2,64	0,00	0,00	0,00
5	300	4538667	4550699	4537165	2,26	28,45	8,67	0,15
15	900	4345629	4407241	4368917	2,17	38,19	17,33	0,30
75	4500	3949821	3969842	3952314	1,96	62,29	26,93	0,46
135	8100	3768758	3800507	3777115	1,88	72,43	33,88	0,58
3780	226800	3193284	3282677	3230463	1,60	104,07	58,00	1,00

Anhang C 6.:BSA 50 mM Acetatpuffer pH 5,5

Volumen Reaktor: 25 mL

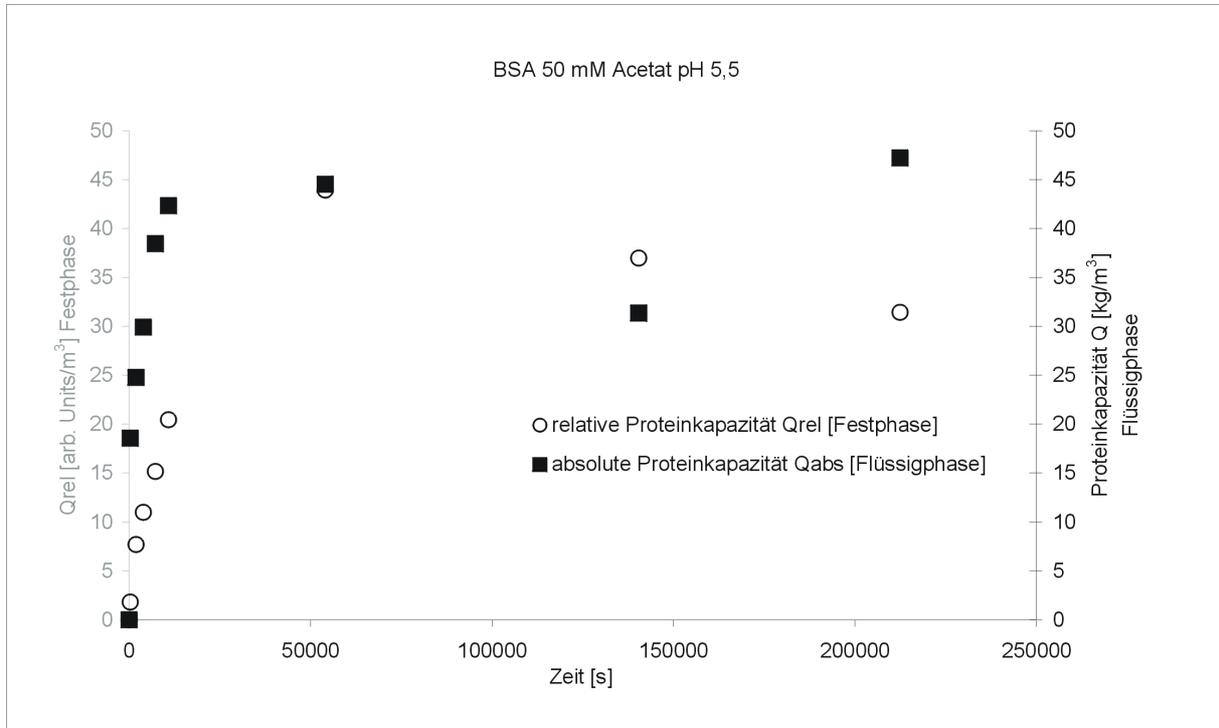
 c_i : 2,21 kg/m³ V_{Gel} : 0,22 mL

Abbildung C6: : Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel BSA 50 mM Acetat pH 5,5

Tabelle C6: Experimentelle Daten (BSA 50 mM Acetat pH 5,5)

Zeit		Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Qabs (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Qrel (Festphase) [mg/ml]	F(t) Qrel/Qrel ^{eq}
[Min]	[s]	I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	3901053	3837237	3860974	2,21	0,00	0,00	-
5	300	3595861	3607402	3593460	2,05	18,58	1,80	0,05
32	1920	3493218	3531731	3504303	2,00	24,77	7,71	0,21
66	3960	3426416	3449821	3429947	1,95	29,93	11,00	0,30
120	7200	3292577	3337682	3306958	1,88	38,47	15,15	0,41
180	10800	3251776	3266567	3251000	1,85	42,36	20,46	0,55
900	54000	3219590	3235821	3219534	1,83	44,54	43,92	1,19
2340	140400	3394280	3440621	3409279	1,94	31,37	37,00	1,00
3540	212400	3178484	3199627	3180884	1,81	47,23	31,43	0,85

Anhang C 7.: mIgG 50 mM Acetatpuffer pH 4,5

Volumen Reaktor: 23 mL

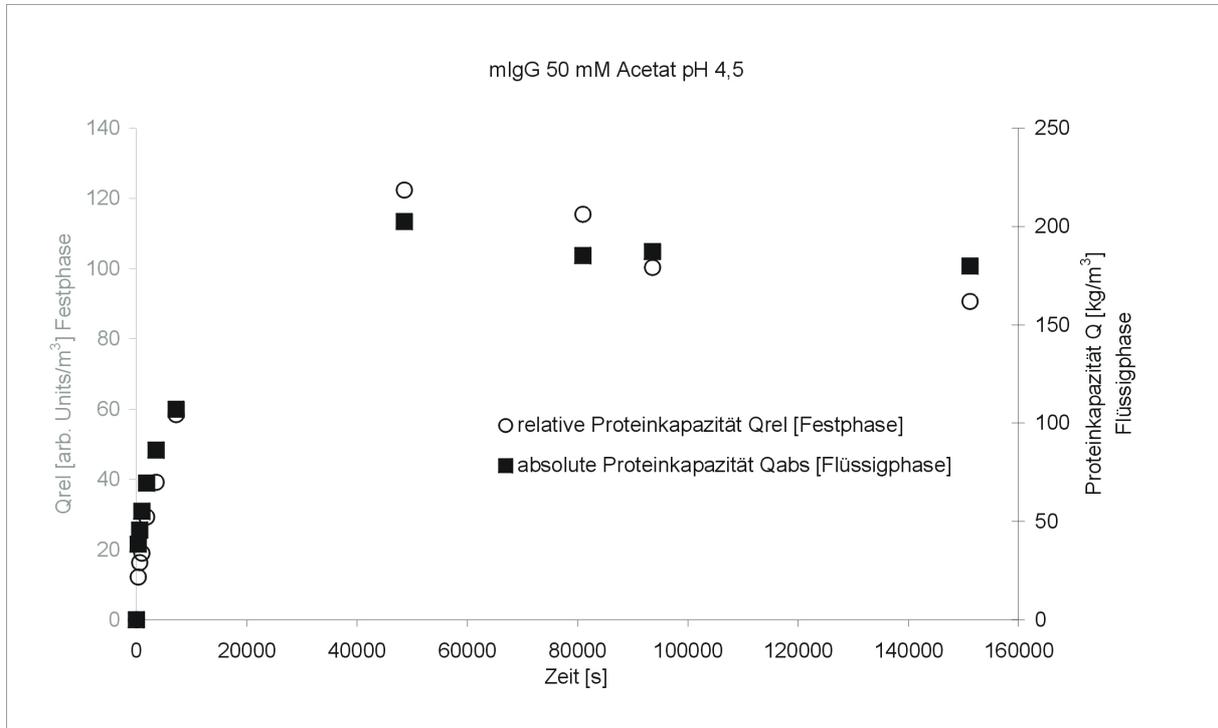
 c_i : 3,81 kg/m³ V_{Gel} : 0,23 mL

Abbildung C7: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (mIgG 50 mM Acetat pH 4,5)

Tabelle C7: Experimentelle Daten (mIgG 50 mM Acetat pH 4,5)

Zeit [Min]	Zeit [s]	Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Q_{abs} (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Q_{rel} (Festphase) [mg/ml]	F(t) Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}
		I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	218130	221527	218534	3,81	0,00	0,00	0,00
5	300	193547	200257	195607,5	3,37	38,38	12,20	0,10
10	600	190522	194556	191244,5	3,29	45,68	16,25	0,13
16	960	183805	189935	185575,5	3,19	55,17	18,93	0,15
31	1860	176123	180555	177044,5	3,05	69,45	29,23	0,24
60	3600	167144	169518	167036,5	2,87	86,20	39,16	0,32
120	7200	155487	156346	154622	2,65	106,98	58,37	0,48
810	48600	98216	99549	97588	1,65	202,45	122,34	1,00
1350	81000	108845	109555	107905,5	1,84	185,18	115,48	0,94
1560	93600	107187	108650	106624	1,81	187,33	100,38	0,82
2520	151200	110380	114319	111055	1,89	179,91	90,61	0,74
240	14400	138951	143541	139951,5	2,40	131,54	93,87	0,77

Anhang C 8.:mlgG-Cy5 50 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 20 mL

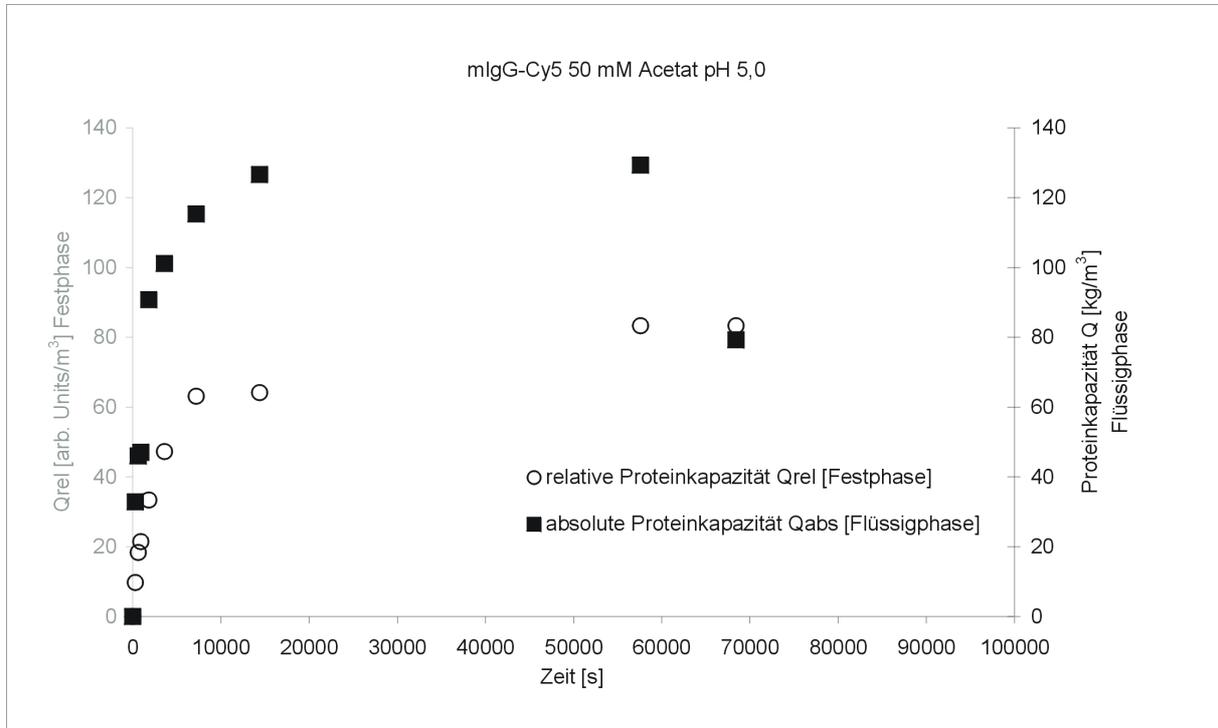
 c_i : 2,55 kg/m³ V_{Gel} : 0,20 mL

Abbildung C8: Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel (mlgG-Cy5 50 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle C8: Experimentelle Daten (mlgG-Cy5 50 mM Acetat pH 5,0)

Zeit [Min]	Zeit [s]	Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Qabs (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Qrel (Festphase) [mg/ml]	F(t) Qrel/Qrel ^{eq}
		I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	163167	163089	161631,5	2,55	0,00	0,00	0,00
5	300	143900	146860	143883,5	2,50	32,80	9,71	0,12
10	600	137206	139298	136755,5	2,38	45,97	18,35	0,22
15	900	135353	139955	136157,5	2,37	47,08	21,48	0,26
30	1800	111730	116256	112496,5	1,97	90,80	33,35	0,40
60	3600	108673	108111	106895,5	1,87	101,15	47,30	0,57
120	7200	100226	101188	99210,5	1,74	115,35	63,06	0,76
240	14400	93754	95485	93123	1,64	126,60	64,19	0,77
960	57600	93247	93043	91648,5	1,62	129,33	83,36	1,00
1140	68400	121502	119009	118759	2,07	79,23	83,36	1,00

Anhang C 9.: mlgG-Oregon 50 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 23 mL

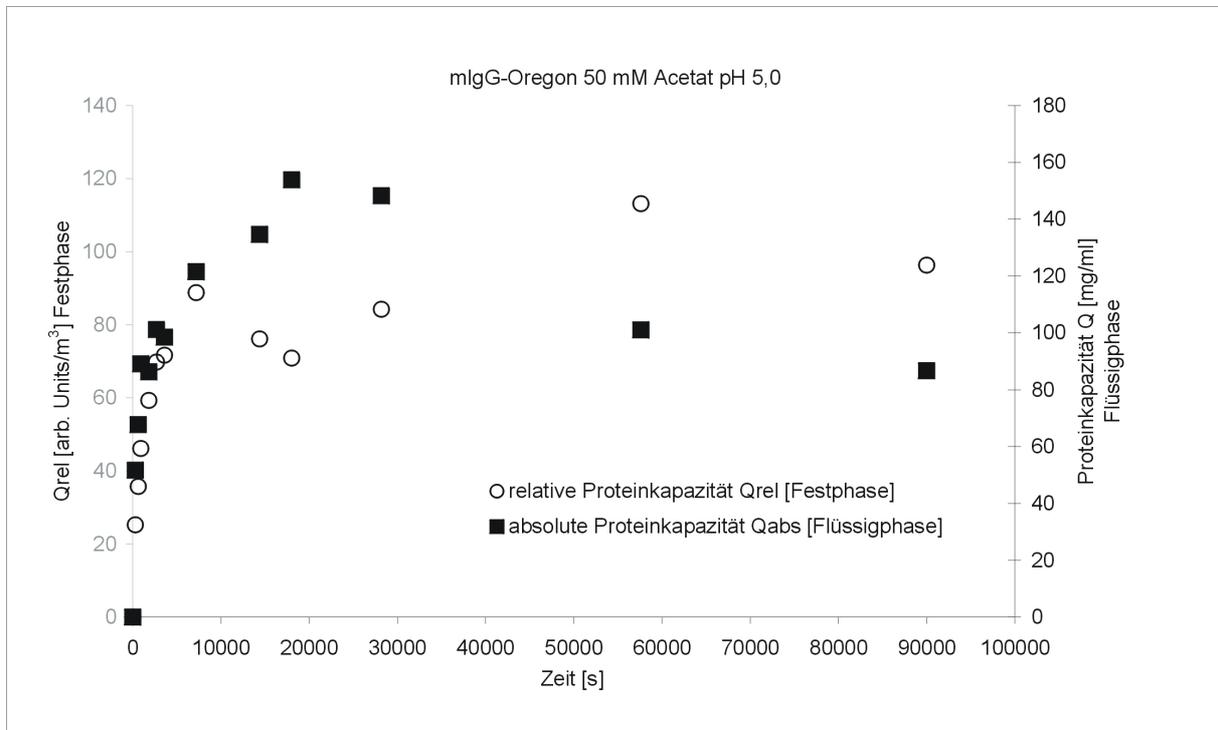
 c_i : 3,05 kg/m³ V_{Gel} : 0,20 mLAbbildung C9: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (mlgG-Oregon 50 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle C9: Experimentelle Daten (mlgG-Oregon 50 mM Acetat pH 5,0)

Zeit [Min]	Zeit [s]	Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Q_{abs} (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Q_{rel} (Festphase) [mg/ml]	F(t) $Q_{\text{rel}}/Q_{\text{rel}}^{\text{eq}}$
		I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	3264602	3221246	3239977	3,05	0,00	0,00	0,00
5	300	2773945	2771813	2769932	2,58	51,70	25,29	0,26
10	600	2637399	2617888	2624697	2,44	67,68	35,76	0,37
15	900	2518242	2347542	2429945	2,24	89,10	46,18	0,48
30	1800	2466043	2451632	2455891	2,27	86,25	59,26	0,62
45	2700	2397421	2249221	2320374	2,13	101,16	69,80	0,72
60	3600	2351992	2342212	2344155	2,16	98,54	71,70	0,74
120	7200	2208949	2066228	2134642	1,95	121,59	88,78	0,92
240	14400	2014736	2022654	2015748	1,83	134,67	76,11	0,79
300	18000	1852636	1835372	1841057	1,65	153,88	70,85	0,74
470	28200	1895690	1894600	1892198	1,71	148,26	84,27	0,87
960	57600	2342992	2305508	2321303	2,13	101,05	113,14	1,17
1500	90000	2478013	2432223	2452171	2,27	86,66	96,34	1,00

Anhang C 10.: mlgG 100 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 22 mL

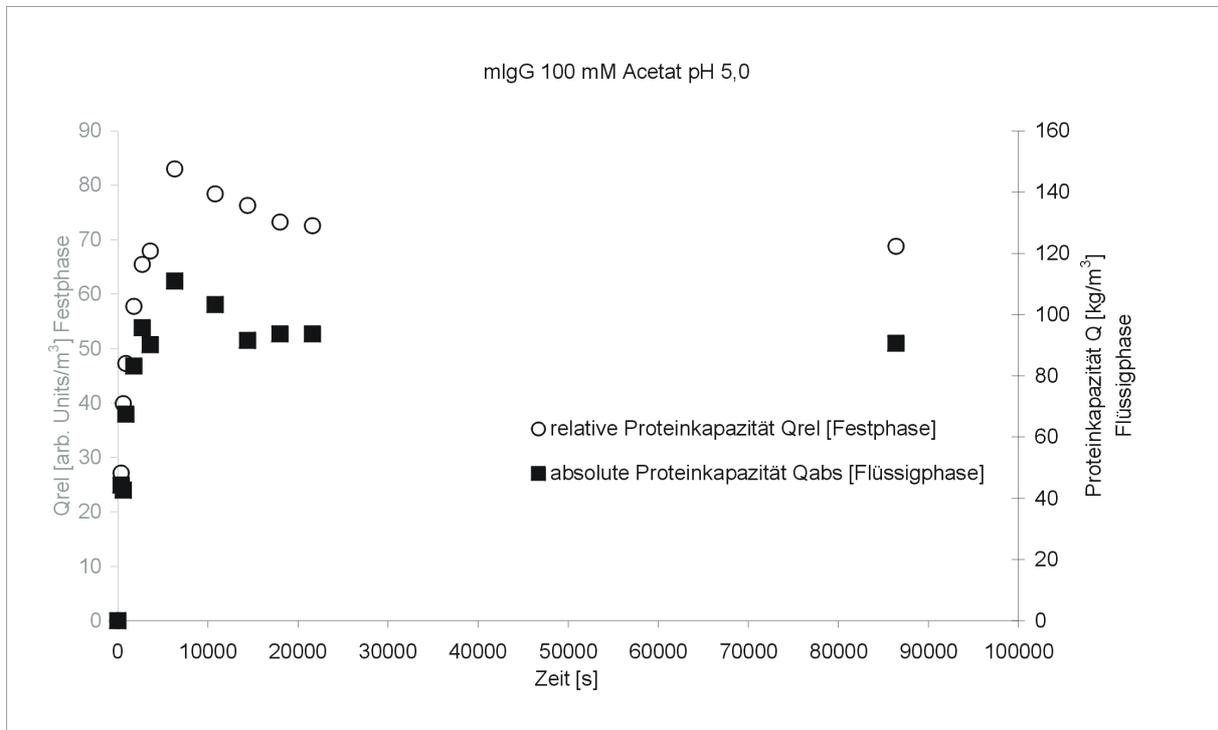
 c_i : 3,62 kg/m³ V_{Gel} : 0,25 mL

Abbildung C10: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (mlgG 100 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle C10: Experimentelle Daten (mlgG 100 mM Acetat pH 5,0)

Zeit [Min]	Zeit [s]	Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Q_{abs} (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Q_{rel} (Festphase) [mg/ml]	F(t) Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}
		I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	216758	224577	220177	3,62	0,00	0,00	0,00
6	360	187783	190575	188688,5	3,12	44,34	27,13	0,33
10	600	189635	191170	189912	3,14	42,61	39,89	0,48
15	900	171661	173865	172272,5	2,85	67,45	47,29	0,57
30	1800	161212	161981	161106	2,68	83,17	57,79	0,70
45	2700	151239	154204	152231	2,53	95,67	65,47	0,79
60	3600	157825	155385	156114,5	2,60	90,20	67,93	0,82
105	6300	141362	142283	141332	2,36	111,01	83,01	1,00
180	10800	145560	148996	146787,5	2,45	103,33	78,45	0,95
240	14400	154375	156875	155134,5	2,58	91,58	76,34	0,92
300	18000	152255	155927	153600,5	2,56	93,74	73,25	0,88
360	21600	151967	156216	153601	2,56	93,74	72,55	0,87
1440	86400	154221	158435	155837,5	2,59	90,59	68,82	0,83

Anhang C 11.: mlgG 150 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 22 mL

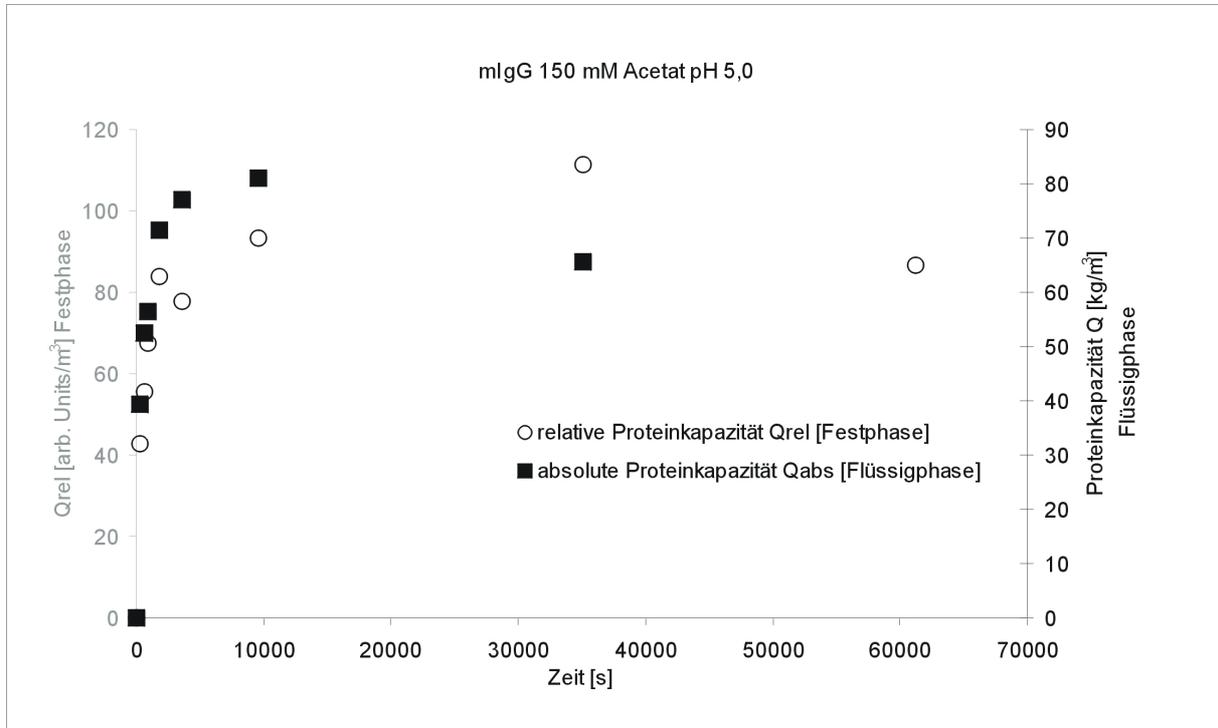
 c_i : 3,55 kg/m³ V_{Gel} : 0,32 mL

Abbildung C11: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (mlgG 150 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle C11: Experimentelle Daten (mlgG 150 mM Acetat pH 5,0)

Zeit [Min]	Zeit [s]	Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Q_{abs} (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Q_{rel} (Festphase) [mg/ml]	$F(t)$ Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}
		I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	236928	238591	236543,5	3,55	0,00	0,00	0,00
5	300	196947	200432	197473,5	2,97	39,38	42,88	0,46
10	600	183586	187826	184490	2,78	52,47	55,52	0,60
15	900	180293	183126	180493,5	2,72	56,50	67,48	0,72
30	1800	163791	169874	165616,5	2,50	71,50	83,84	0,90
60	3600	159566	162884	160009	2,41	77,15	77,91	0,84
160	9600	157673	157261	156251	2,36	80,94	93,23	1,00

Anhang C 12.: mlgG 50 mM Acetatpuffer pH 5,5

Volumen Reaktor: 22 mL

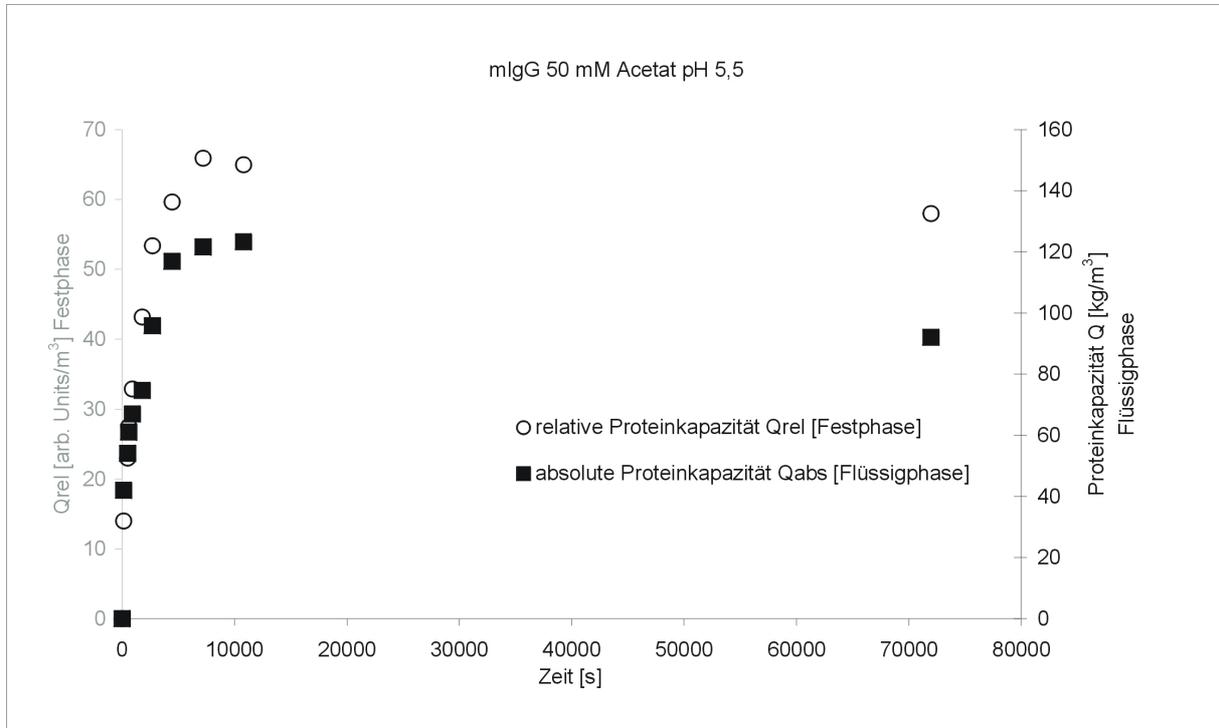
 c_i : 2,23 kg/m³ V_{Gel} : 0,17 mL

Abbildung C12: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (mlgG 50 mM Acetat pH 5,5)

Tabelle C12: Experimentelle Daten (mlgG 50 mM Acetat pH 5,5)

Zeit [Min]	Zeit [s]	Fluoreszenzintensität Flüssigphase			Konz. [kg/m ³]	Kapazität Q_{abs} (Flüssigphase) [kg/m ³]	Kapazität Q_{rel} (Festphase) [mg/ml]	$F(t)$ Q_{rel}/Q_{rel}^{eq}
		I1 [cps]	I2 [cps]	Mittelwert [cps]				
0	0	117705	119661	117390,5	2,20	0,00	0,00	0,00
2	120	99887	102195	99748,5	1,88	42,05	13,96	0,21
8	480	93593	98383	94695,5	1,79	54,09	22,98	0,35
10	600	91878	94293	91793	1,73	61,01	27,51	0,42
15	900	87308	93864	89293,5	1,69	66,96	32,88	0,51
30	1800	82859	91879	86076,5	1,63	74,63	43,20	0,66
45	2700	78101	78846	77181	1,47	95,83	53,40	0,82
74	4440	71657	67628	68350	1,31	116,88	59,67	0,92
120	7200	66582	68718	66357,5	1,27	121,63	65,90	1,01
180	10800	66042	67888	65672,5	1,26	123,26	64,97	1,00
1200	72000	81257	78815	78743,5	1,50	92,11	58,00	0,89

Anhang D: Experimentelle Daten und Micromath Scientist Programm zur Bestimmung der Einkomponentenisothermenparameter

Anhang D 1.: BSA pH 4,5

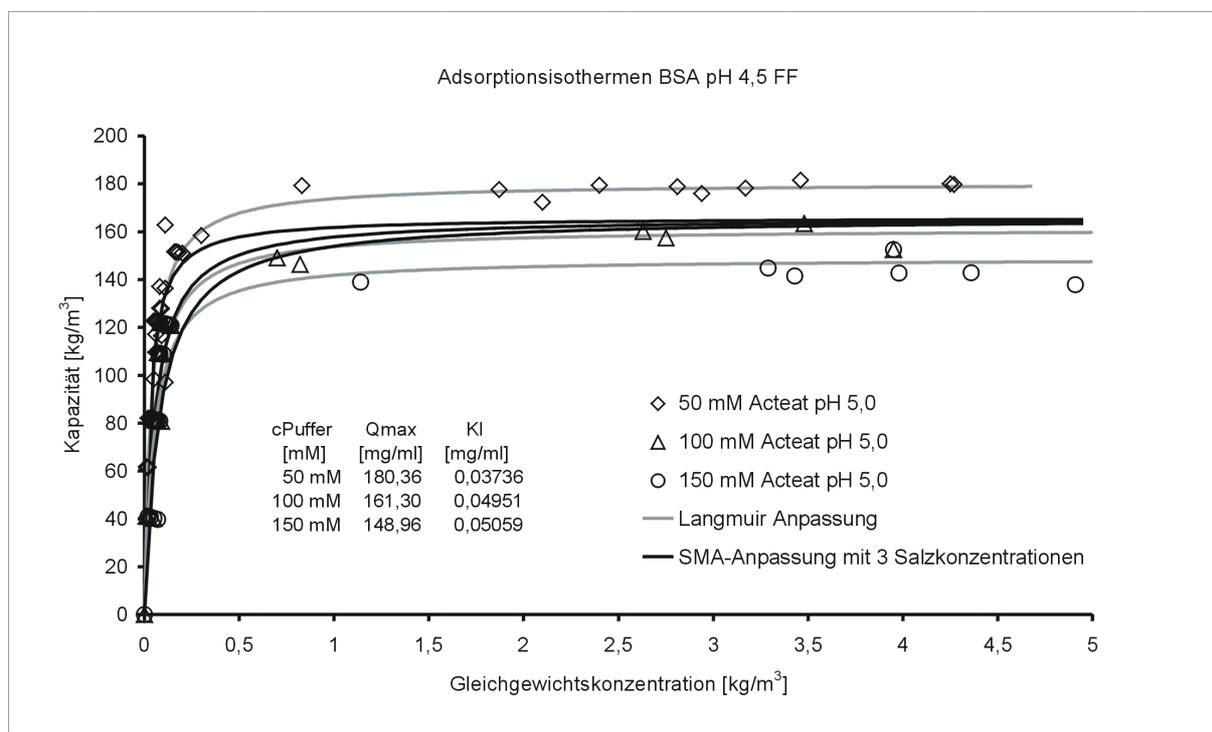


Abbildung D1: Isothermenverläufe BSA pH 4,5

Tabelle D1: Experimentelle Daten (BSA pH 4,5)

c ^{eq} [kg/m ³]	50 mM		100 mM		150 mM		150 mM		
	Q (exp). [kg/m ³]	c ^{eq} [kg/m ³]	Q (exp). [kg/m ³]	c ^{eq} [kg/m ³]	Q (exp). [kg/m ³]	c ^{eq} [kg/m ³]	Q (exp). [kg/m ³]	c ^{eq} [kg/m ³]	
0	0	0,08	122,2	0,05	40,2	0,05	40,2	4,36	142,9
0,02	40,9	0,08	128,1	0,06	81,4	0,07	81,2	3,43	141,5
0,02	61,6	0,08	137,1	0,09	109	0,1	108,7	3,98	142,7
0,03	82,1	0,18	151,3	0,09	122	0,13	121,1	3,95	152,5
0,07	109,4	0,06	122,5	0,09	80,7	0,07	39,7	4,91	137,9
0,09	116,5	0,2	151	0,08	109,2	0,08	80,9		
0,13	121,1	0,06	109,6	0,14	120,8	0,1	108,7		
0,11	136,4	0,02	82,1	0,01	41,1	0,14	120,8		
0,16	151,7	0,05	122,8	0,06	81,4	0,02	40,9		
0,02	61,5	0,11	162,8	0,07	109,4	0,06	81,4		
0,07	122,3	0,83	179,3	0,08	122,2	0,08	109,2		
0,17	151,7	1,87	177,7	0,02	40,9	0,11	121,5		
0,08	109,1	2,4	179,4	0,05	81,6	0,03	40,6		
0,02	40,9	2,81	178,9	0,07	109,4	0,06	81,4		
0,02	61,6	3,17	178,3	0,1	121,8	0,08	109,2		
0,11	97	4,27	179,7	0,07	81,2	0,12	121,3		
0,07	109,4	0,09	121,9	0,7	149,1	0,05	81,5		
0,06	117,2	2,94	175,9	2,75	157,3	1,14	138,9		
4,25	180,1	2,1	172,4	3,48	163,4	3,29	144,8		

Anhang D 2.:BSA pH 5,0

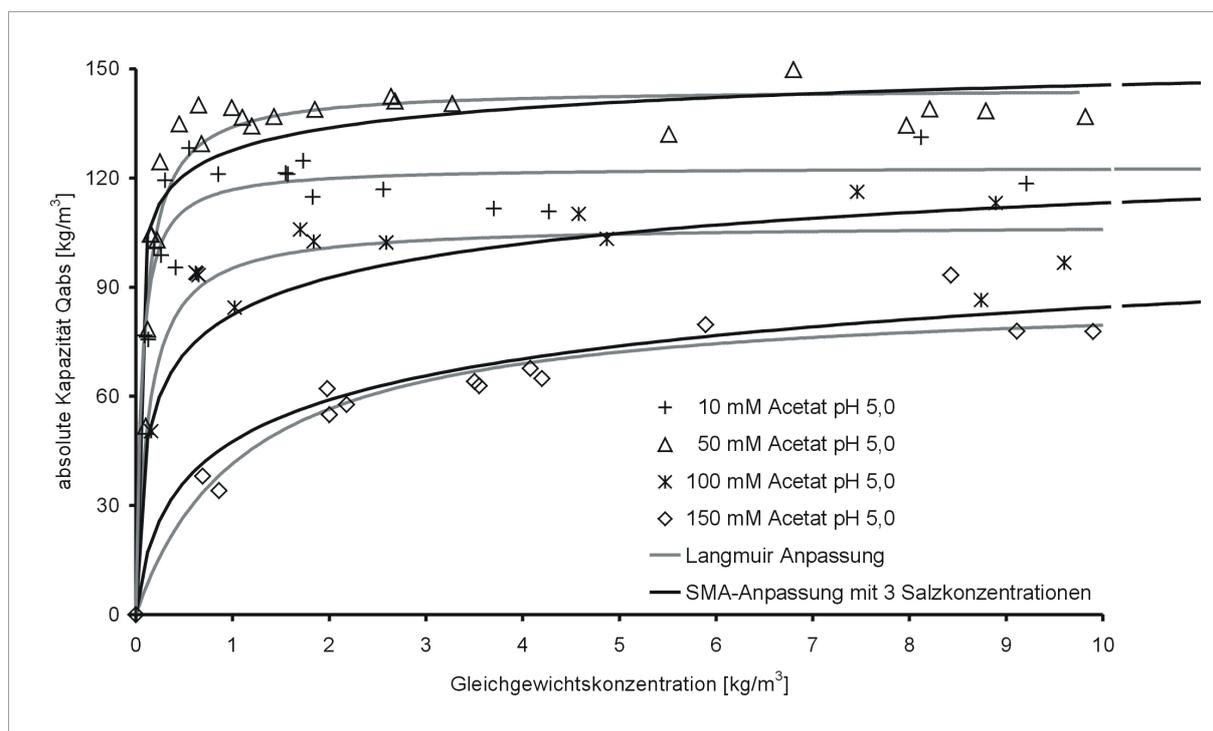


Abbildung D2: Isothermenverläufe BSA pH 5,0

Tabelle D2: Experimentelle Daten (BSA pH 5,0)

10 mM		50mM		50mM/100 mM		100mM/150 mM		150 mM	
c^{eq} [kg/m ³]	Q (exp.) [kg/m ³]	c^{eq} [kg/m ³]	Q (exp.) [kg/m ³]	c^{eq} [kg/m ³]	Q (exp.) [kg/m ³]	c^{eq} [kg/m ³]	Q (exp.) [kg/m ³]	c^{eq} [kg/m ³]	Q (exp.) [kg/m ³]
0	0	0	0	50mM	50mM	0,65	93,3	1,98	62,1
0,09	76,7	0,1	51,8	5,51	132	4,87	103,3	5,89	79,7
0,19	100,7	0,12	78,4	6,8	149,8	7,46	116,2	8,43	93,3
0,3	119,4	0,16	104,6	7,97	134,5	9,6	96,7	9,11	77,9
0,55	128,2	0,25	124,5	8,21	139	1,02	84,4	9,9	77,8
1,57	121,1	0,45	134,9	8,79	138,5	4,58	110,1	11,12	71,5
1,73	124,8	0,65	140,1	9,82	136,9	8,74	86,5		
2,56	116,9	0,99	139,4	5,51	132	8,89	113,1		
0,13	75,6	1,43	136,9	100mM	100mM	150mM	150mM		
1,83	114,8	1,85	138,9	0	0	0	0		
3,7	111,6	2,68	141,2	0,1	51,8	0,69	38,1		
0,85	121,1	1,2	134,3	0,63	93,7	2	55		
0,26	98,8	2,64	142,4	1,7	105,9	3,55	62,9		
0,41	95,4	0,68	129,4	2,59	102,3	4,2	64,9		
1,55	121,4	0,22	103	0,16	50,4	0,86	34,1		
4,27	110,8	0,15	104,6	0,62	94	2,18	57,8		
8,12	131,2	1,1	136,7	1,84	102,6	3,5	64,1		
9,21	118,5	3,27	140,5	2,59	102,3	4,08	67,7		

Anhang D 3.:BSA pH 5,5

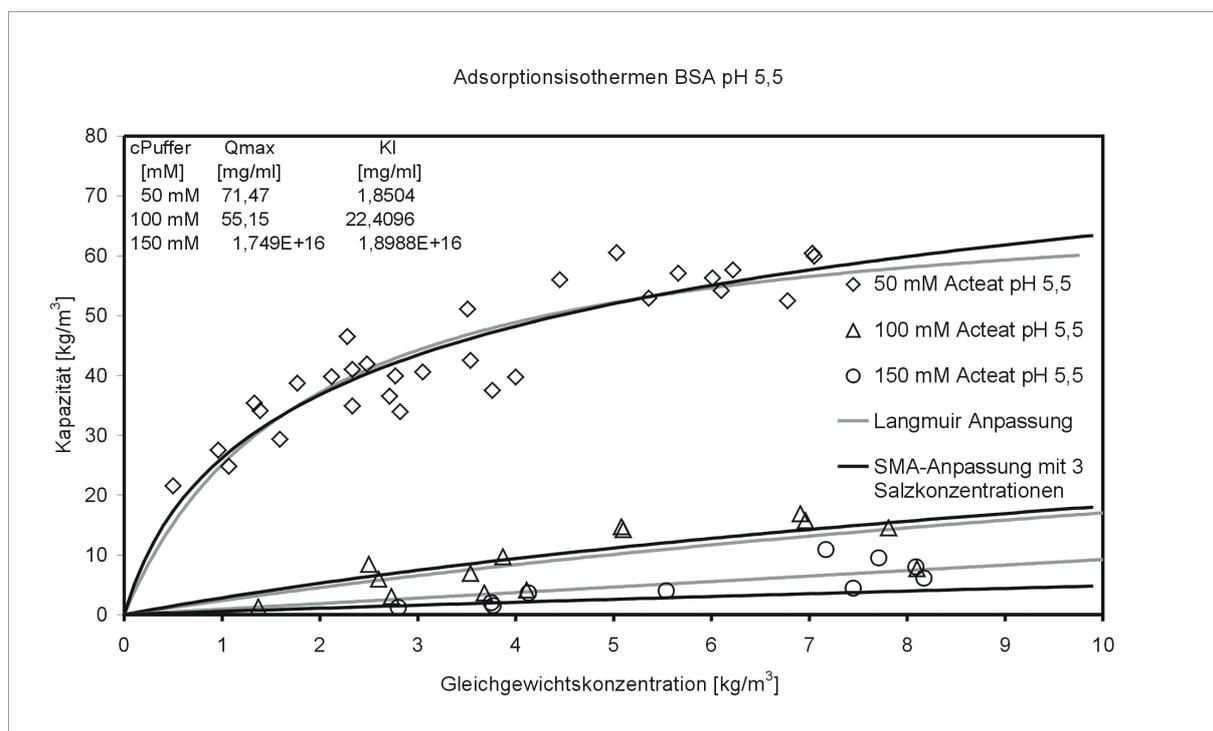


Abbildung D3: Isothermenverläufe BSA pH 5,5

Tabelle D3: Experimentelle Daten (BSA pH 5,5)

50 mM		50mM		100 mM		150 mM	
c^{eq}	Q (exp).						
[kg/m ³]							
0	0	3,51	51,1	0	0	0	0
0,5	21,5	4,45	56	1,35	1,8	3,77	1,5
0,96	27,5	5,03	60,5	2,73	3	4,13	3,6
1,39	34,1	5,66	57,1	3,68	3,6	3,75	2
1,77	38,7	6,01	56,3	3,87	9,7	2,8	1,2
2,12	39,8	6,22	57,6	1,37	1,3	5,54	4
2,33	41	6,78	52,5	3,54	6,9	7,45	4,4
2,48	41,9	7,03	60,4	4,11	4,1	8,17	6,1
2,77	39,9	2,71	36,5	2,5	8,4	7,17	10,9
3,05	40,6	6,1	54,2	5,1	14,2	7,71	9,5
3,54	42,5	7,05	59,9	6,96	15,7	8,09	8
1,07	24,8	5,36	52,9	7,81	14,5		
2,82	33,9	4	39,7	2,6	5,9		
3,76	37,5			5,08	14,7		
2,33	34,9			6,91	16,9		
1,59	29,3			8,1	7,7		
1,33	35,4						
2,28	46,5						

Anhang D 4.:mlgG pH 4,5

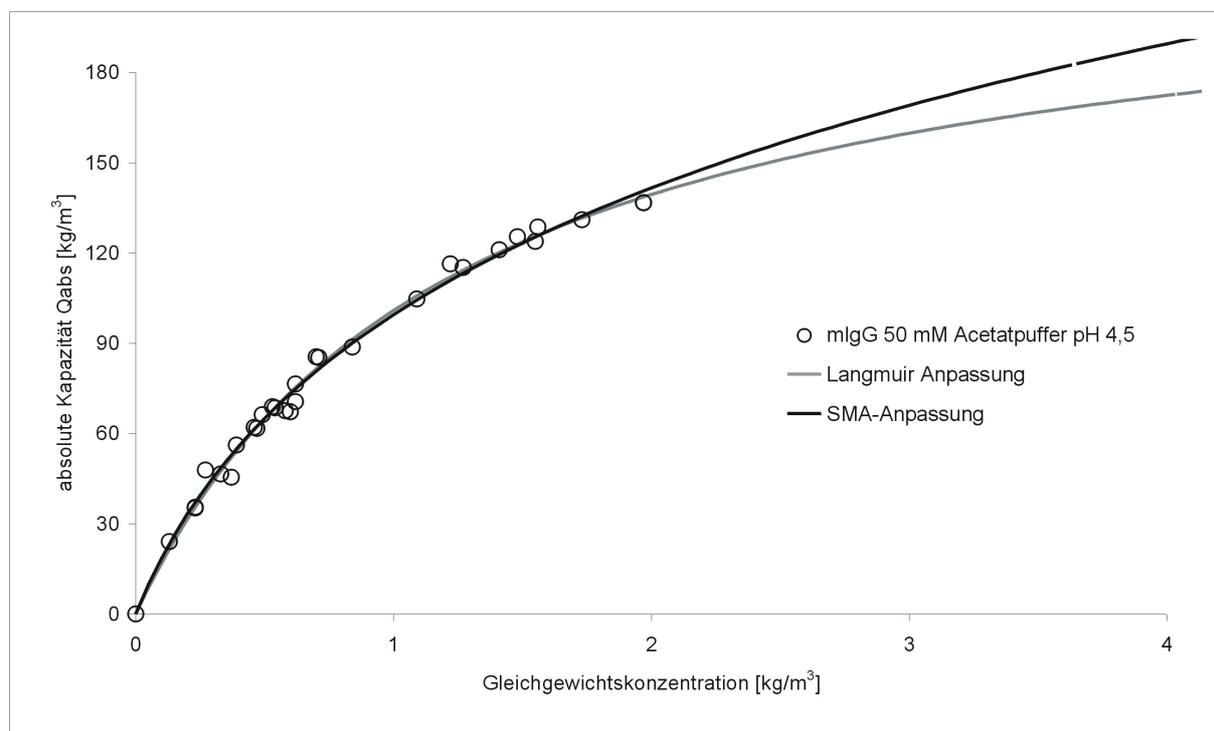


Abbildung D4: Isothermenverlauf mlgG 50 mM Acetat pH 4,5

Tabelle D4: Experimentelle Daten (mlgG 50 mM Acetat pH 4,5)

50 mM		50mM	
c^{eq}	Q (exp.)	c^{eq}	Q (exp.)
[kg/m ³]	[kg/m ³]	[kg/m ³]	[kg/m ³]
0	0	0,37	45,5
0,13	24	0,58	67,6
0,23	35,5	0,84	88,7
0,33	46,5	1,09	104,7
0,39	56,1	1,27	115,2
0,46	62	1,41	121,1
0,49	66,2	1,55	123,8
0,53	68,9	1,56	128,6
0,62	70,6	1,73	131,1
0,62	76,5	1,97	136,7
0,7	85,5	0,6	67,2
0,23	35,2	1,48	125,4
0,54	68,5	1,97	136,7
0,71	85,3	1,22	116,4
0,47	61,7	0,37	45,5
0,27	47,8	0,58	67,6
0,84	88,7		

Anhang D 5.:mlgG pH 5,0

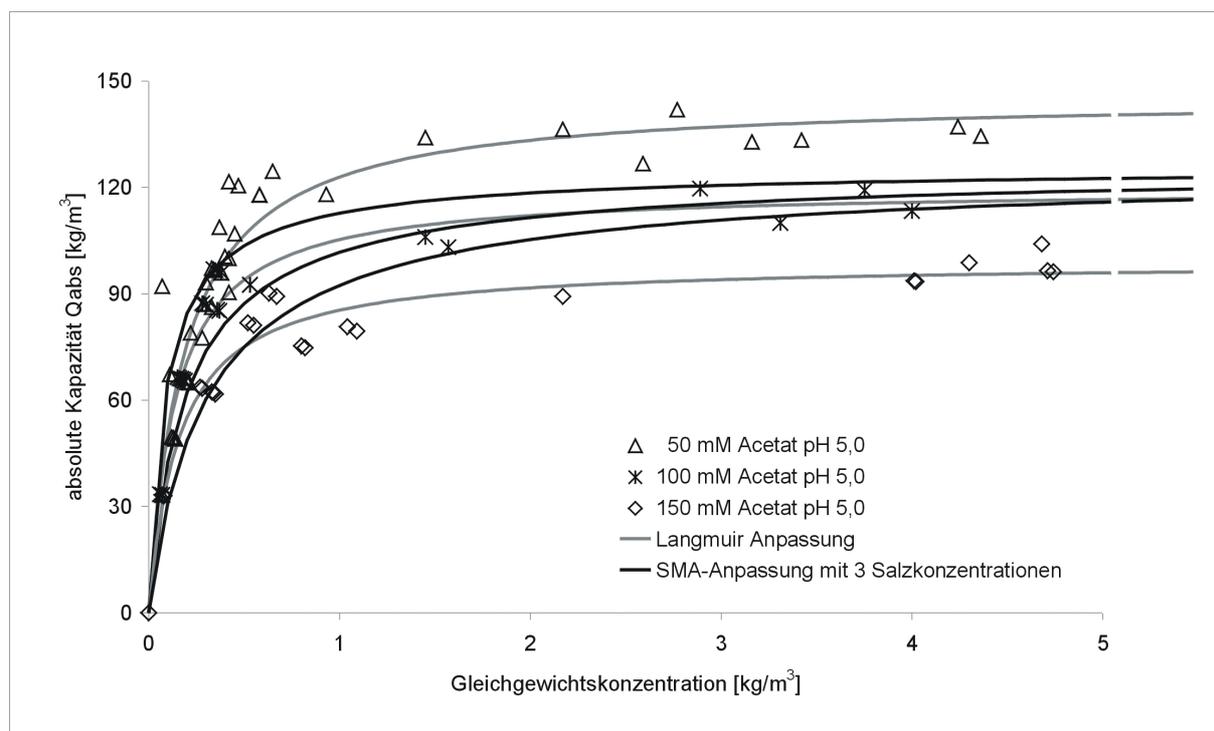


Abbildung D5: Isothermenverläufe mlGg pH 5,0

Tabelle D5: Experimentelle Daten (mlGg pH 5,0)

50 mM		50mM		50mM/100 mM		100mM/150 mM		150 mM	
c^{eq}	Q (exp).								
[kg/m ³]									
0	0	0,3	93,2	50mM	50mM	0,36	85,5	0,07	33,3
0,07	33,3	0,33	97,2	0,38	95,9	0,53	92,5	0,28	63,4
0,13	49,4	0,4	100,5	3,16	132,9	0,07	33,3	0,55	81,1
0,21	65,1	0,37	108,8	4,24	137,1	0,17	66	0,63	90,2
0,28	77,6	0,42	121,6	2,59	126,7	0,37	85,2	0,07	33,3
0,33	86,2	0,14	49,1	0,93	118,1	0,53	92,5	0,27	63,7
0,42	90,4	0,34	96,8	100mM	100mM	0,36	85,5	0,52	81,8
0,42	100	0,47	120,5	0	0	0,53	92,5	0,67	89,3
0,45	106,9	0,29	87	0,05	33,8	0,19	65,5	0,08	33,1
0,58	117,9	0,21	64,9	0,16	66,2	1,45	106	0,34	62,1
0,14	49,1	0,11	67,2	0,3	86,9	3,31	110	0,35	61,7
0,38	95,9	0,35	96,6	0,38	96	4	113,4	2,17	89,3
0,58	118	0,65	124,6	0,06	33,5	0,19	65,4	4,02	93,5
0,07	92,1	1,45	134,1	0,15	66,5	1,57	103,2	4,71	96,5
0,2	65,1	2,17	136,4	0,28	87,3	2,89	119,7	4,01	93,7
0,12	49,6	2,77	141,9	0,34	96,9	3,75	119,2	4,3	98,8
0,22	79	3,42	133,4	0,07	33,3	150 mM	150 mM	4,74	96,2
0,29	87,1	4,36	134,5	0,18	65,8	0	0	4,68	104,1

Anhang D 6.:mIgG pH 5,5

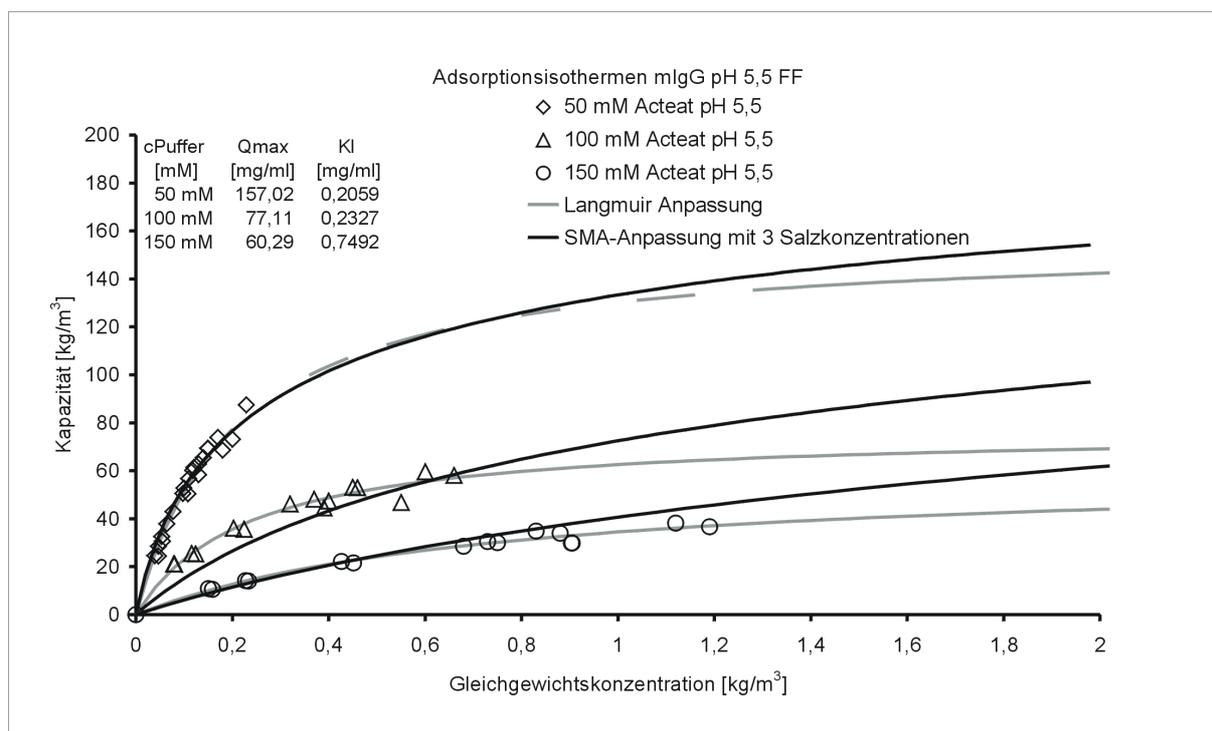


Abbildung D6: Isothermenverläufe mIgG 5,5

Tabelle D6: Experimentelle Daten (mIgG pH 5,5)

50 mM		50mM		100 mM		150 mM	
c^{eq}	Q (exp).						
[kg/m ³]							
0,00	0,00	0,13	58,4	0,00	0,00	0,00	0,00
0,23	87,48	0,11	56,7	0,44	49,33	0,90	29,83
0,15	69,39	0,1	52,8	0,20	36,08	0,45	21,63
0,12	60,12	0,2	73,1	0,12	25,50	0,23	14,21
0,11	50,36	0,13	62,9	0,08	21,11	0,16	10,60
0,08	43,03	0,18	68,7	0,55	46,72	0,91	29,79
0,06	30,68	0,13	58,4	0,22	35,57	0,43	22,21
0,05	28,49	0,11	56,7	0,12	25,30	0,23	14,07
0,05	24,38	0,1	52,8	0,08	21,15	0,15	10,80
0,05	32,58	0,2	73,1	0,6	59,6	1,12	38,2
0,04	24,55			0,46	52,9	0,88	33,9
0,06	37,90			0,37	48,1	0,75	30
0,10	50,59			0,32	46,1	0,68	28,5
0,00	0,00			0,66	58,1	1,19	36,6
0,17	73,9			0,45	53,1	0,83	34,9
0,15	69,4			0,4	47,4	0,73	30,5
0,14	65,5			0,39	44,5		
0,12	61,4						

Anhang D 7.:Scientist Programm zur Anpassung experimenteller Daten an das „Steric Mass Action“ Adsorptionsmodell

```
// MicroMath Scientist Model File
// Steric mass action Modell mit einer impliziten Gleichung
IndVars: c, csalt0
DepVars: q, Qsalt
Params: K, gama, z
//
Qtot=Lambda/(1-0.36)
Mw=                                     "Molekulargewicht des Proteins in kDa eingeben"
Lambda=200
csalt_buffer=                           "Pufferkonzentration in mM eingeben"
//Equations
Csalt=csalt_buffer+csalt0
TEMP=Csalt+(gama+z)*C/Mw*K*(Qsalt/Csalt)^(z-1)
Qsalt= Qtot*Csalt/(Temp)
Q=((Qtot*C/Mw*K*(Qsalt/Csalt)^(z-1))/Temp)*Mw*(1-0.36)
// constrains
10000>qsalt>0
// parameters
csalt_buffer=35
K=0.1
K>0
z>1
gama=180
gama>0
z=10
***
```

K, gama und z bezeichnen die SMA-Parameter: die Gleichgewichtskonstante K_i , den sterischen Faktor ρ_i und die charakteristische Ladung z_i

Anhang E: Experimentelle Daten zur Zweikomponentenadsorption im Rührreaktor

Anhang E 1.: BSA 1 mlgG 1 50 mM Acetatpuffer pH 4,5

Volumen Reaktor: 25 mL

$c_i(\text{BSA})$: 1,16 kg/m³ $c_i(\text{mlgG})$: 2,51 kg/m³

V_{Gel} : 0,14 mL

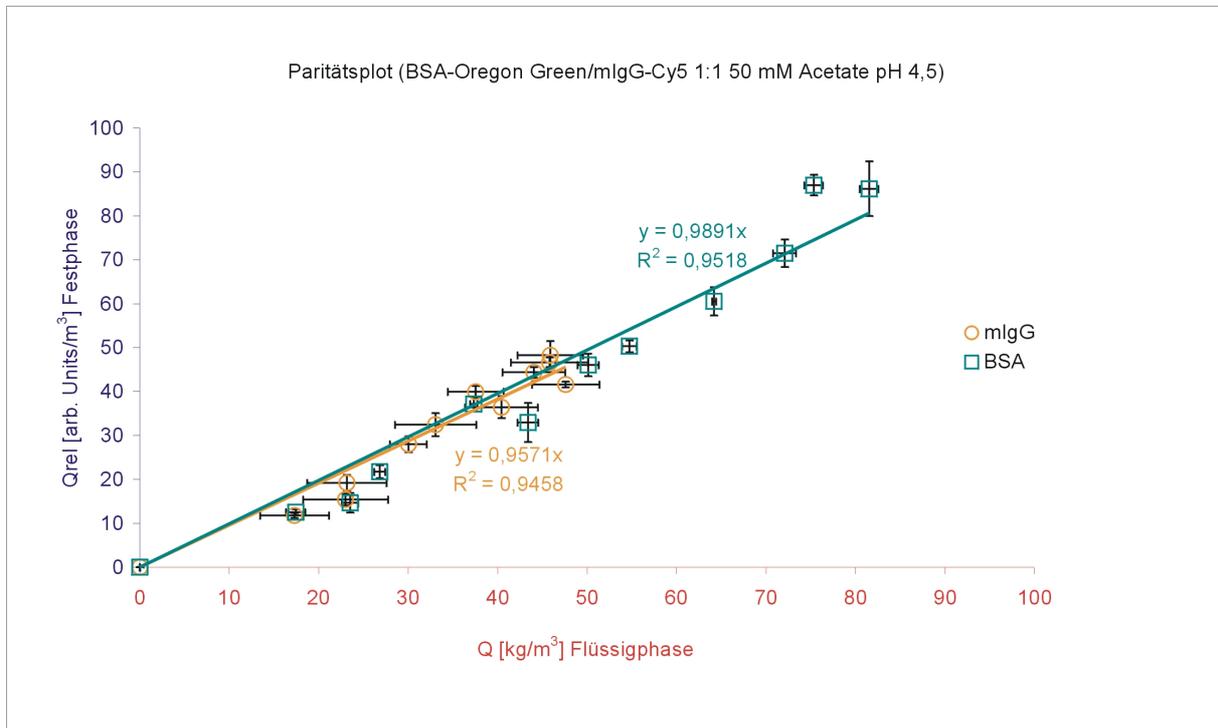


Abbildung E1: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (BSA 1 mlgG 1 50 mM Acetat pH 4,5)

Tabelle E1: Experimentelle Daten (BSA 1 mlgG 1 50 mM Acetat pH 4,5)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Q_{abs} [kg/m ³]	Std.abw. [kg/m ³]	Q_{rel} [arb.units/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Q_{abs} [kg/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Q_{rel} [mg/ml]	Std.abw. [mg/ml]
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	300	17,43	1,08	12,48	0,73	17,28	3,84	11,76	0,58
10	600	23,50	0,91	14,65	2,24	22,99	4,74	15,42	1,36
15	900	26,82	0,62	21,73	1,46	23,14	4,43	19,22	1,80
30	1800	37,33	0,41	37,19	1,62	30,02	2,06	27,99	1,79
45	2700	43,38	1,17	32,95	4,47	33,07	4,55	32,47	2,63
60	3600	50,13	1,17	46,02	2,57	40,42	4,08	36,45	2,51
90	5400	54,72	0,82	50,29	1,35	37,54	3,12	39,92	1,38
143	8580	64,20	0,23	60,57	3,21	44,06	3,52	44,36	1,16
195	11700	72,07	1,29	71,51	3,10	45,80	4,33	46,64	1,12
290	17400	75,34	1,04	87,01	2,37	47,60	3,78	41,61	0,69
377	22620	81,53	1,03	86,20	6,20	45,88	3,67	48,29	3,20
1980	118800	92,95	0,67	119,87	7,38	28,88	2,79	40,25	1,57

Anhang E 2.: BSA 4 mlgG 1 50 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

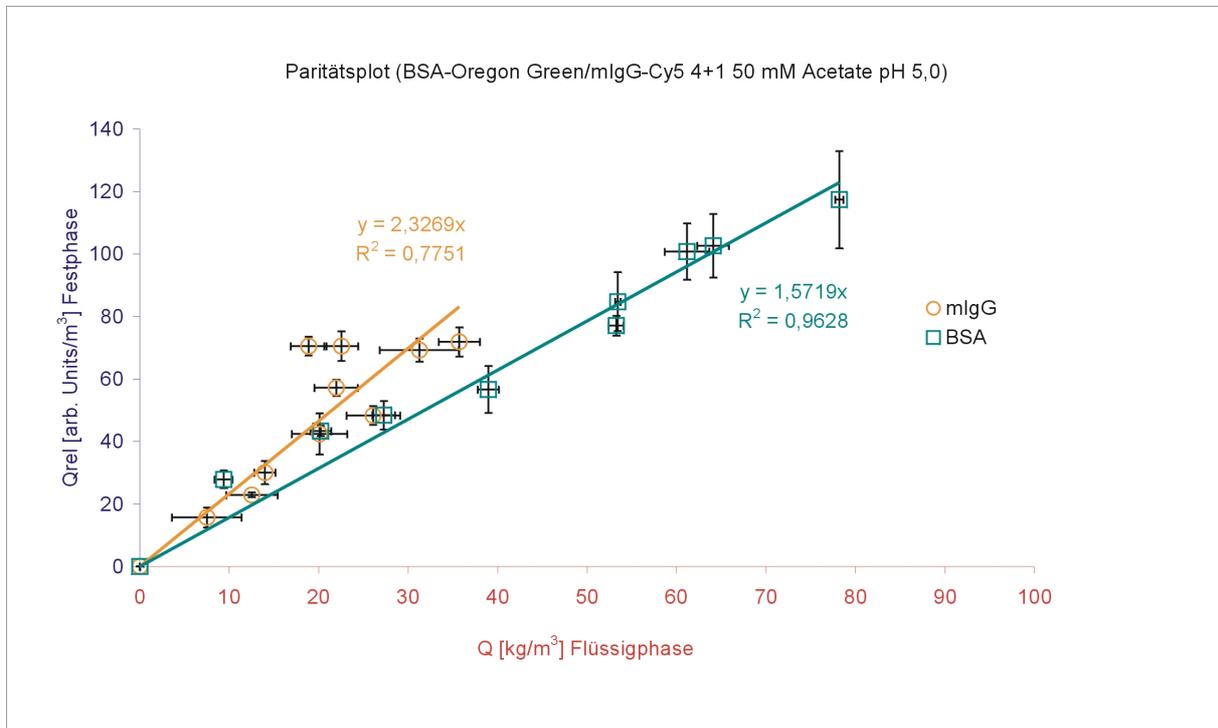
 $c_i(\text{BSA}): 2,46 \text{ kg/m}^3$ $c_i(\text{mlgG}): 1,37 \text{ kg/m}^3$ $V_{\text{Gel}}: 0,14 \text{ mL}$ 

Abbildung E2: Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel (BSA 4 mlgG 1 50 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle E2: Experimentelle Daten (BSA 4 mlgG 1 50 mM Acetat pH 5,0)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Qabs [kg/m ³]	Std.abw. [kg/m ³]	Qrel [arb.units/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Qabs [kg/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Qrel [mg/ml]	Std.abw. [mg/ml]
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	300	9,36	0,99	27,90	2,86	7,49	3,89	15,67	3,22
10	600	20,22	1,16	43,40	1,72	12,52	2,87	22,93	0,75
15	900	27,27	1,26	48,44	4,56	13,97	1,20	30,08	3,74
30	1800	38,96	1,19	56,64	7,49	20,10	3,09	42,47	6,59
45	2700	53,44	0,31	84,79	9,42	26,10	3,01	48,33	3,03
60	3600	53,24	0,82	77,06	3,18	21,95	2,43	57,17	2,56
90	5400	61,16	2,50	100,80	8,99	18,85	2,00	70,51	3,05
120	7200	64,08	1,77	102,68	10,17	22,52	1,90	70,51	4,74
180	10800	78,20	0,46	117,42	15,57	31,25	4,42	69,25	3,75
780	46800	121,84	1,68	145,85	12,76	35,71	2,29	71,87	4,71

Anhang E 3.: BSA 1 mlgG 1 50 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

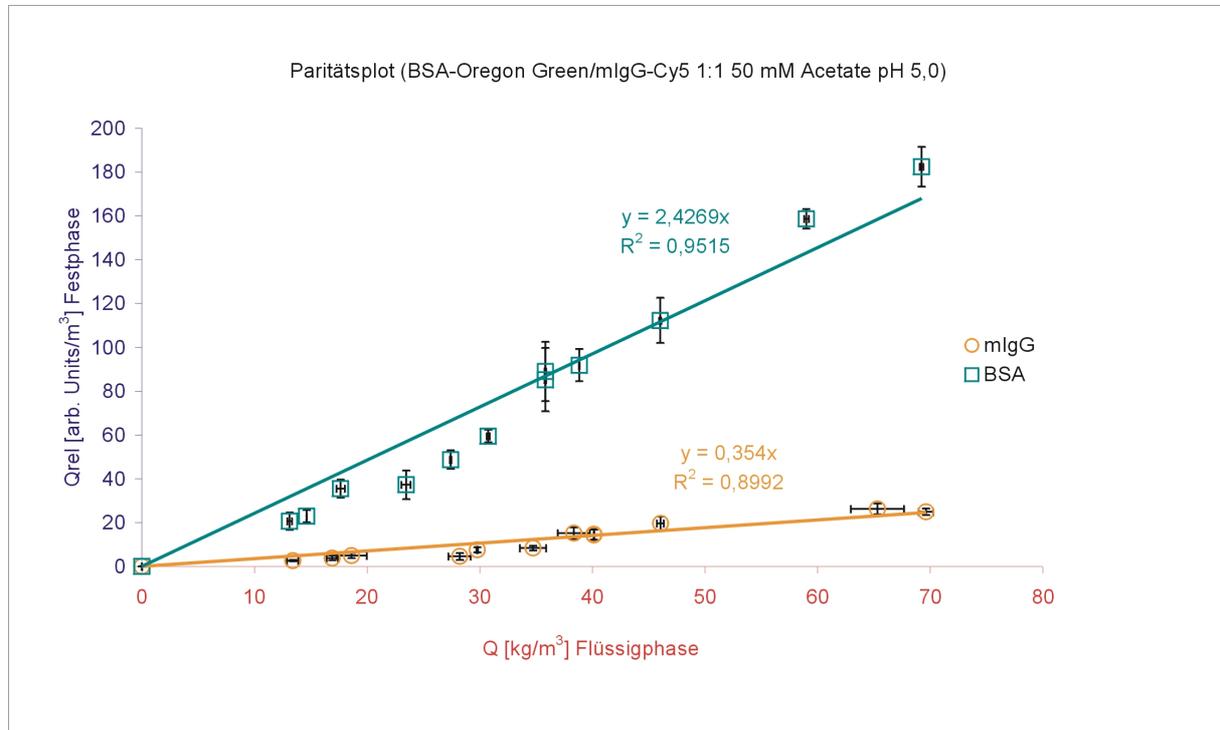
 $c_i(\text{BSA}): 1,16 \text{ kg/m}^3$ $c_i(\text{mlgG}): 2,51 \text{ kg/m}^3$ $V_{\text{Gel}}: 0,14 \text{ mL}$ Abbildung E3: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (BSA 1 mlgG 1 50 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle E3: Experimentelle Daten (BSA 1 mlgG 1 50 mM Acetat pH 5,0)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Q_{abs} [kg/m ³]	Std.abw. [kg/m ³]	Q_{rel} [arb.units/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Q_{abs} [kg/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Q_{rel} [mg/ml]	Std.abw. [mg/ml]
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	300	17,43	1,08	12,48	0,73	17,28	3,84	11,76	0,58
10	600	23,50	0,91	14,65	2,24	22,99	4,74	15,42	1,36
15	900	26,82	0,62	21,73	1,46	23,14	4,43	19,22	1,80
30	1800	37,33	0,41	37,19	1,62	30,02	2,06	27,99	1,79
45	2700	43,38	1,17	32,95	4,47	33,07	4,55	32,47	2,63
60	3600	50,13	1,17	46,02	2,57	40,42	4,08	36,45	2,51
90	5400	54,72	0,82	50,29	1,35	37,54	3,12	39,92	1,38
143	8580	64,20	0,23	60,57	3,21	44,06	3,52	44,36	1,16
195	11700	72,07	1,29	71,51	3,10	45,80	4,33	46,64	1,12
290	17400	75,34	1,04	87,01	2,37	47,60	3,78	41,61	0,69
377	22620	81,53	1,03	86,20	6,20	45,88	3,67	48,29	3,20
1980	118800	92,95	0,67	119,87	7,38	28,88	2,79	40,25	1,57

Anhang E 4.: BSA 1 mlgG 4 50 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

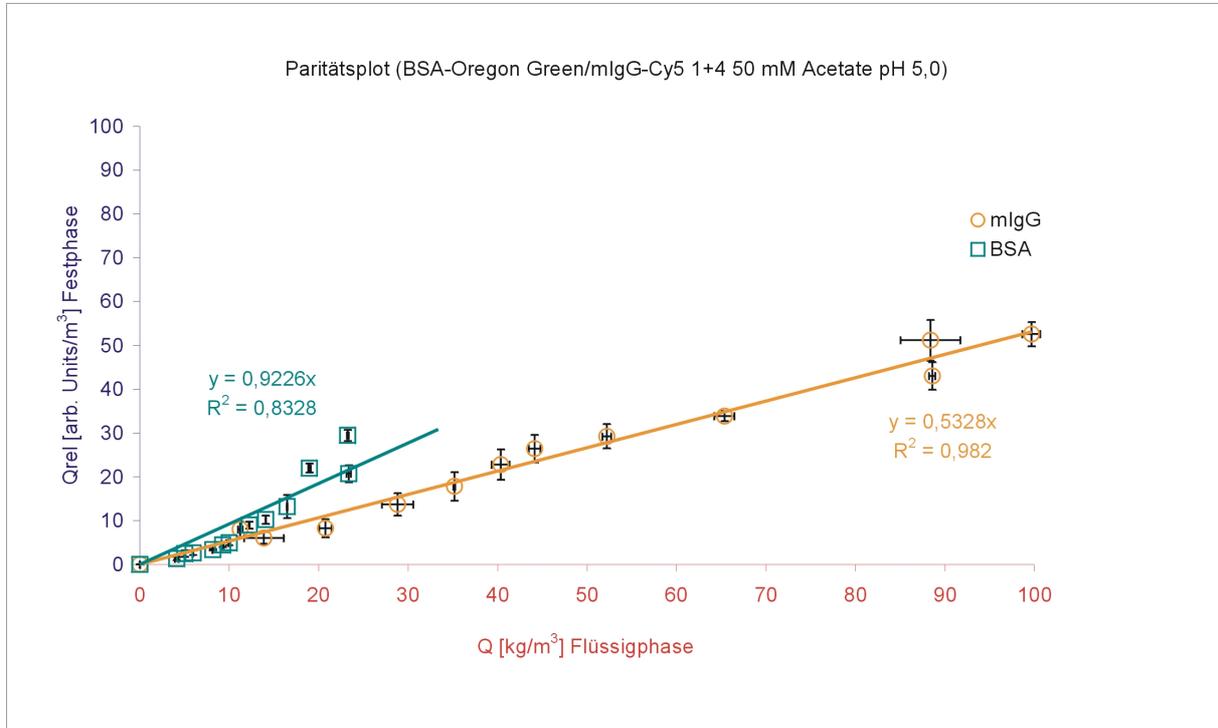
 $c_i(\text{BSA}): 0,41 \text{ kg/m}^3$ $c_i(\text{mlgG}): 3,55 \text{ kg/m}^3$ $V_{\text{Gel}}: 0,14 \text{ mL}$ 

Abbildung E4: Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel (BSA 1 mlgG 4 50 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle E4: Experimentelle Daten (BSA 1 mlgG 4 50 mM Acetat pH 5,0)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Qabs [kg/m ³]	Std.abw. [kg/m ³]	Qrel [arb.units/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Qabs [kg/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Qrel [mg/ml]	Std.abw. [mg/ml]
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	300	4,11	0,20	1,35	0,35	13,87	2,22	6,06	1,39
10	600	5,01	0,08	2,50	0,74	11,21	0,26	7,99	1,78
15	900	5,94	0,02	2,67	0,54	20,74	0,69	8,27	2,03
30	1800	8,13	0,01	3,38	0,20	28,80	1,75	13,72	2,56
45	2700	9,26	0,10	4,48	0,54	35,15	0,10	17,81	3,26
60	3600	10,00	0,12	4,97	0,59	40,33	0,99	22,80	3,45
90	5400	12,22	0,05	8,97	0,78	44,13	0,64	26,44	3,12
130	7800	14,08	0,03	10,20	0,98	52,19	0,48	29,26	2,77
200	12000	16,47	0,03	13,19	2,64	65,35	1,12	33,87	1,15
400	24000	18,96	0,13	21,99	1,02	88,58	0,35	43,02	3,12
1080	64800	23,35	0,25	20,69	1,97	99,66	1,02	52,56	2,75
1440	86400	23,24	0,09	29,44	1,31	88,39	3,33	51,16	4,67

Anhang E 5.: BSA 1 mlgG 1 100 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

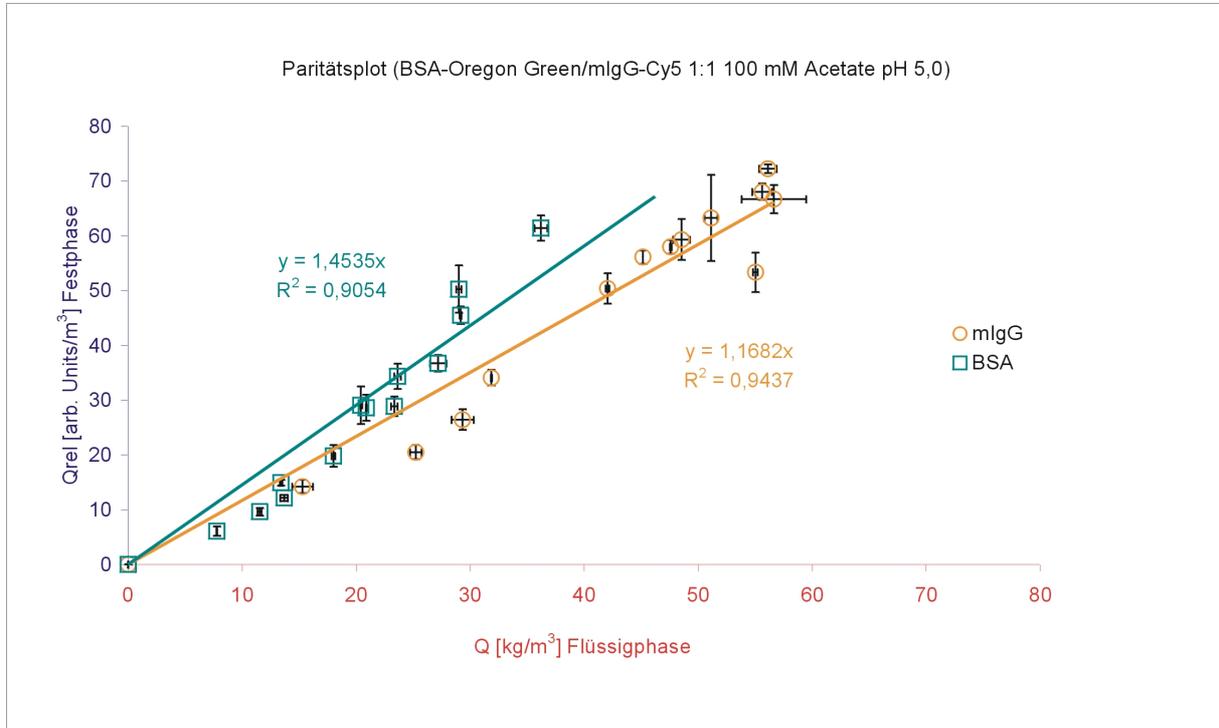
 $c_i(\text{BSA}): 1,19 \text{ kg/m}^3$ $c_i(\text{mlgG}): 2,61 \text{ kg/m}^3$ $V_{\text{Gel}}: 0,2 \text{ mL}$ 

Abbildung E5: Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel (BSA 1 mlgG 1 100 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle E5: Experimentelle Daten (BSA 1 mlgG 1 100 mM Acetat pH 5,0)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Qabs [kg/m ³]	Std.abw. [kg/m ³]	Qrel [arb.units/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Qabs [kg/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Qrel [mg/ml]	Std.abw. [mg/ml]
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5	150	7,76	0,03	6,06	0,87	15,30	0,91	14,23	1,21
5	300	11,53	0,17	9,63	0,69	25,23	0,52	20,49	1,28
10	600	13,68	0,33	12,14	0,58	29,34	0,99	26,45	1,90
15	900	13,41	0,12	14,95	0,54	31,86	0,06	34,12	1,41
30	1800	17,99	0,16	19,83	1,98	42,06	0,16	50,40	2,77
45	2700	20,89	0,06	28,62	2,37	47,59	0,09	58,01	1,24
60	3600	20,39	0,14	29,07	3,44	48,53	0,73	59,34	3,72
81	4860	23,34	0,28	28,85	1,78	56,12	0,77	72,28	0,82
132	7920	23,63	0,30	34,36	2,31	55,61	0,86	68,06	1,47
180	10800	27,18	0,72	36,71	1,52	56,64	2,82	66,71	2,56
280	16800	29,01	0,22	50,30	4,34	55,02	0,21	53,36	3,59
375	22500	29,15	0,08	45,50	1,60	51,14	0,57	63,30	7,87
900	54000	36,20	0,56	61,43	2,31	45,15	0,78	56,12	1,25

Anhang E 6.: BSA 1 mlgG 1 150 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

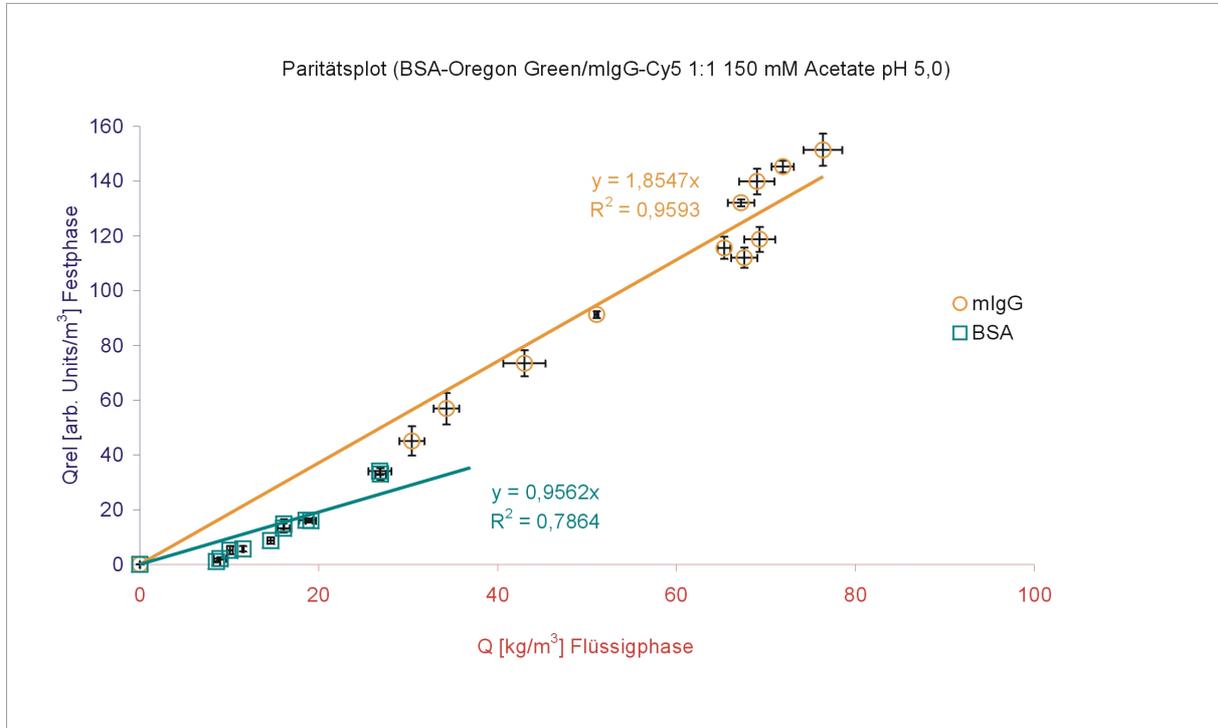
 $c_i(\text{BSA}): 1,19 \text{ kg/m}^3$ $c_i(\text{mlgG}): 2,61 \text{ kg/m}^3$ $V_{\text{Gel}}: 0,2 \text{ mL}$ 

Abbildung E6: Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel (BSA 1 mlgG 1 150 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle E6: Experimentelle Daten (BSA 1 mlgG 1 150 mM Acetat pH 5,0)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Qabs	Std.abw.	Qrel	Std.abw.	Qabs	Std.abw.	Qrel	Std.abw.
		$[\text{kg/m}^3]$	$[\text{kg/m}^3]$	$[\text{arb.units/m}^3]$	$[\text{mg/ml}]$	$[\text{kg/m}^3]$	$[\text{mg/ml}]$	$[\text{mg/ml}]$	$[\text{mg/ml}]$
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5	150	8,58	0,40	1,02	0,21	30,41	1,41	45,11	5,38
5	300	8,96	0,70	2,13	0,48	34,27	1,44	56,91	5,75
10	600	10,07	0,32	5,21	1,54	42,98	2,35	73,48	4,78
15	900	11,53	0,08	5,73	1,03	51,04	0,23	91,25	1,25
30	1800	14,63	0,35	8,75	1,21	65,31	0,72	115,67	3,97
45	2700	16,07	0,65	13,26	1,63	68,97	1,99	139,87	4,69
60	3600	16,11	0,01	14,74	1,80	71,87	1,24	145,39	2,11
120	7200	19,11	0,57	16,02	0,75	67,21	1,50	132,07	1,20
255	15300	18,57	0,75	16,05	0,67	69,28	1,74	118,73	4,59
660	39600	26,91	0,57	32,97	2,24	76,36	2,17	151,47	5,87
930	55800	26,83	1,29	34,08	1,42	67,57	1,46	112,08	3,70

Anhang E 7.: BSA 1 mlgG 1 150 mM Acetatpuffer pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

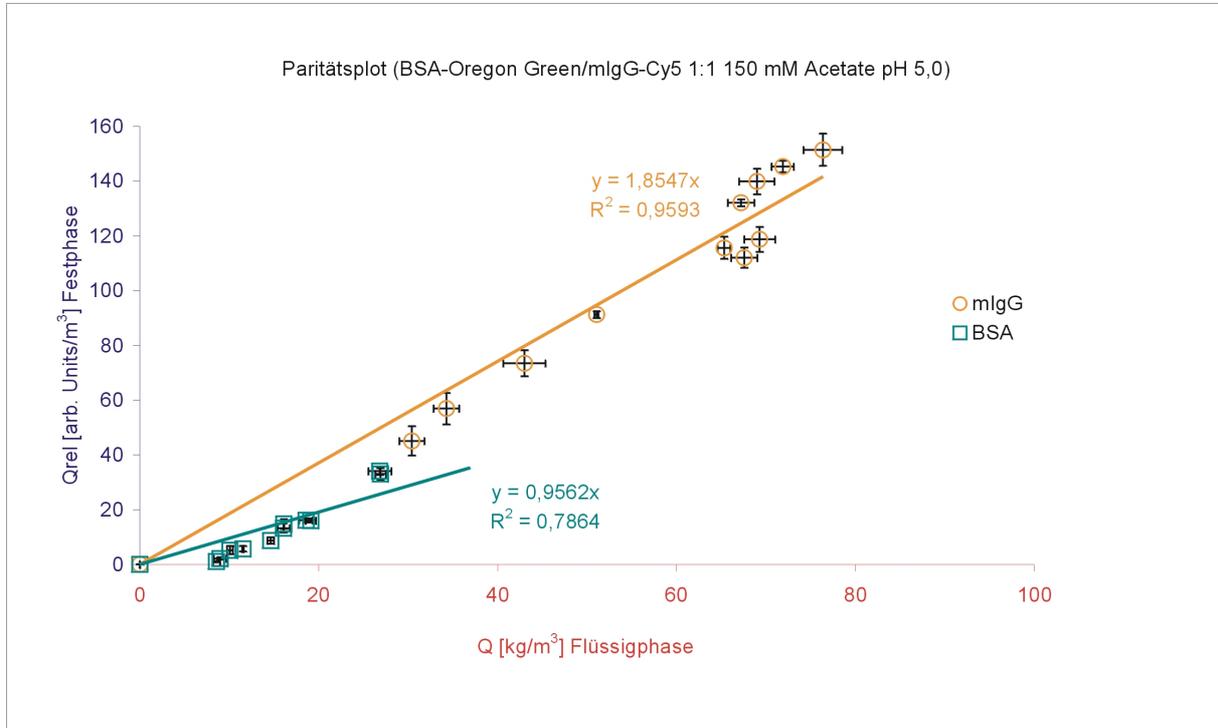
 $c_i(\text{BSA}): 1,15 \text{ kg/m}^3$ $c_i(\text{mlgG}): 2,46 \text{ kg/m}^3$ $V_{\text{Gel}}: 0,2 \text{ mL}$ Abbildung E7: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (BSA 1 mlgG 1 150 mM Acetat pH 5,0)

Tabelle E7: Experimentelle Daten (BSA 1 mlgG 1 150 mM Acetat pH 5,0)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Q_{abs} [kg/m^3]	Std.abw. [kg/m^3]	Q_{rel} [arb.units/ m^3]	Std.abw. [mg/ml]	Q_{abs} [kg/m^3]	Std.abw. [mg/ml]	Q_{rel} [mg/ml]	Std.abw. [mg/ml]
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5	150	8,58	0,40	1,02	0,21	30,41	1,41	45,11	5,38
5	300	8,96	0,70	2,13	0,48	34,27	1,44	56,91	5,75
10	600	10,07	0,32	5,21	1,54	42,98	2,35	73,48	4,78
15	900	11,53	0,08	5,73	1,03	51,04	0,23	91,25	1,25
30	1800	14,63	0,35	8,75	1,21	65,31	0,72	115,67	3,97
45	2700	16,07	0,65	13,26	1,63	68,97	1,99	139,87	4,69
60	3600	16,11	0,01	14,74	1,80	71,87	1,24	145,39	2,11
120	7200	19,11	0,57	16,02	0,75	67,21	1,50	132,07	1,20
255	15300	18,57	0,75	16,05	0,67	69,28	1,74	118,73	4,59
660	39600	26,91	0,57	32,97	2,24	76,36	2,17	151,47	5,87
930	55800	26,83	1,29	34,08	1,42	67,57	1,46	112,08	3,70

Anhang E 8.: BSA 1 mlgG 1 50 mM Acetatpuffer pH 5,5

Volumen Reaktor: 25 mL

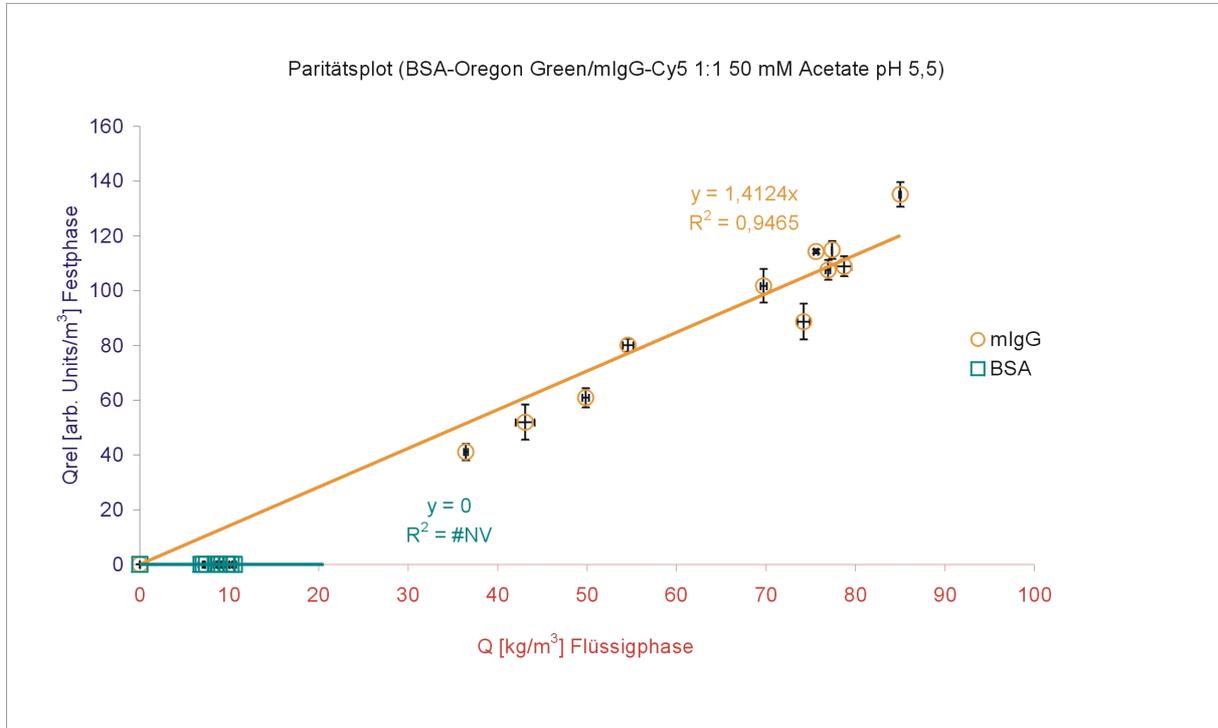
 $c_i(\text{BSA}): 1,08 \text{ kg/m}^3$ $c_i(\text{mlgG}): 2,29 \text{ kg/m}^3$ $V_{\text{Gel}}: 0,2 \text{ mL}$ 

Abbildung E8: Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel (BSA 1 mlgG 1 50 mM Acetat pH 5,5)

Tabelle E8: Experimentelle Daten (BSA 1 mlgG 1 50 mM Acetat pH 5,5)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Qabs [kg/m ³]	Std.abw. [kg/m ³]	Qrel [arb.units/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Qabs [kg/m ³]	Std.abw. [mg/ml]	Qrel [mg/ml]	Std.abw. [mg/ml]
0	0	0,00	0,00	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5	150	8,85	0,26	-	-	36,44	0,22	41,05	3,01
5	300	8,42	0,15	-	-	43,09	1,07	51,99	6,46
10	600	8,56	0,29	-	-	49,83	0,37	60,85	3,45
15	900	7,11	0,10	-	-	54,58	0,60	80,10	2,41
30	1800	9,79	0,17	-	-	69,74	0,34	101,80	6,13
45	2700	10,54	0,21	-	-	76,92	0,25	107,59	3,61
60	3600	7,48	0,17	-	-	75,60	0,24	114,34	0,69
120	7200	6,87	0,29	-	-	77,37	0,02	114,94	3,23
240	14400	9,68	0,36	-	-	78,71	0,83	108,92	3,60
660	39600	10,17	0,15	-	-	84,99	0,09	135,16	4,44
930	55800	8,86	0,33	-	-	74,22	0,70	88,71	6,52
0	0	0,00	0,00	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5	150	8,85	0,26	-	-	36,44	0,22	41,05	3,01

Anhang E 9.: BSA mlgG Hybridomaüberstand pH 4,5

Volumen Reaktor: 25 mL

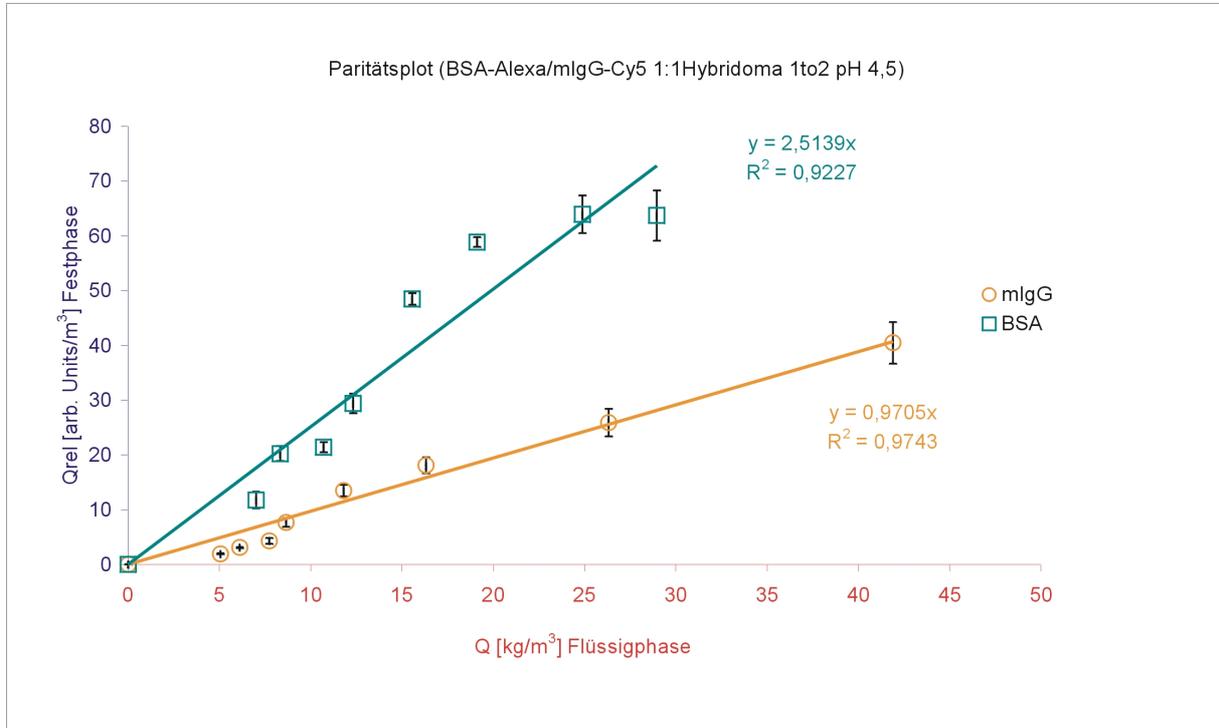
 $c_i(\text{BSA}): 150 \mu\text{g/mL}$ $c_i(\text{mlgG}): 150 \mu\text{g/mL}$ $V_{\text{Gel}}: 0,063 \text{ mL}$ 

Abbildung E9: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (BSA mlgG Hybridomaüberstand pH 4,5)

Tabelle E9: Experimentelle Daten (BSA mlgG Hybridomaüberstand pH 4,5)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Q_{abs} [kg/m^3]	Std.abw. [kg/m^3]	Q_{rel} [arb.units/ m^3]	Std.abw. [mg/ml]	Q_{abs} [kg/m^3]	Std.abw. [mg/ml]	Q_{rel} [mg/ml]	Std.abw. [mg/ml]
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	300	7,00	0,00	11,76	1,50	5,05	0,00	1,93	0,10
10	600	8,33	0,00	20,24	1,33	6,11	0,00	3,08	0,09
15	900	10,70	0,00	21,40	0,91	7,72	0,00	4,31	0,52
30	1800	12,32	0,00	29,37	1,78	8,64	0,00	7,67	0,81
60	3600	15,55	0,00	48,48	1,07	11,81	0,00	13,47	1,03
120	7200	19,11	0,00	58,88	0,90	16,32	0,00	18,12	1,46
580	34800	24,88	0,00	63,93	3,42	26,32	0,00	25,91	2,50
1020	61200	28,96	0,00	63,75	4,59	41,90	0,00	40,49	3,79

Anhang E 10.: BSA mlgG Hybridomaüberstand pH 5,0

Volumen Reaktor: 25 mL

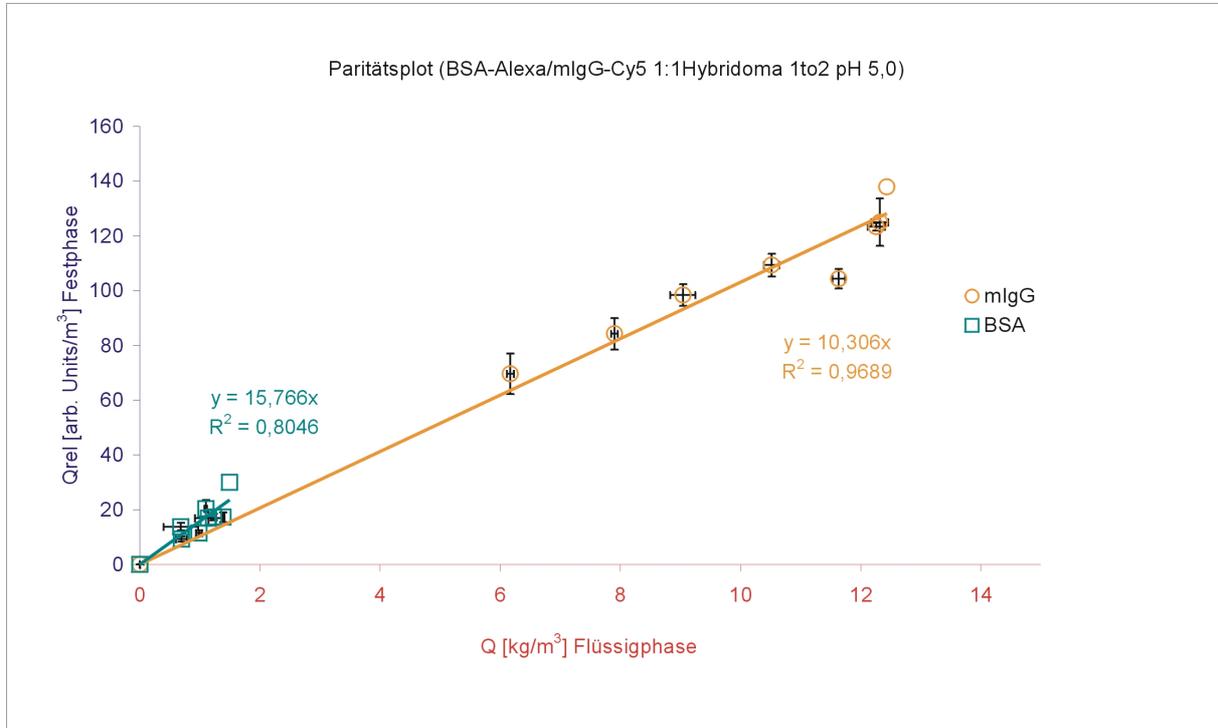
 $c_i(\text{BSA}): 150 \mu\text{g/mL}$ $c_i(\text{mlgG}): 150 \mu\text{g/mL}$ $V_{\text{Gel}}: 0,25 \text{ mL}$ 

Abbildung E10: Kapazitätsverläufe der absoluten Qabs und relativen Kapazität Qrel (BSA mlgG Hybridomaüberstand pH 5,0)

Tabelle E10: Experimentelle Daten (BSA mlgG Hybridomaüberstand pH 5,0)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Qabs	Std.abw.	Qrel	Std.abw.	Qabs	Std.abw.	Qrel	Std.abw.
		[kg/m ³]	[kg/m ³]	[arb.units/m ³]	[mg/ml]	[kg/m ³]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	300	0,69	0,09	9,26	0,95	6,17	0,06	69,67	7,40
10	600	0,98	0,05	11,47	0,97	7,90	0,06	84,25	5,72
15	900	0,68	0,29	13,79	1,38	9,04	0,21	98,45	3,95
30	1800	1,14	0,23	16,93	2,85	10,52	0,13	109,38	4,15
45	2700	1,22	0,04	17,32	1,18	11,63	0,11	104,37	3,56
90	5400	1,39	0,02	17,26	1,79	12,26	0,14	123,36	1,42
300	18000	1,10	0,02	20,36	3,18	12,32	0,14	125,05	8,63
900	54000	1,49	0,19	30,01	2,58	12,43	0,31	137,97	19,64

Anhang E 11.: BSA mlgG Hybridomaüberstand pH 5,5

Volumen Reaktor: 25 mL

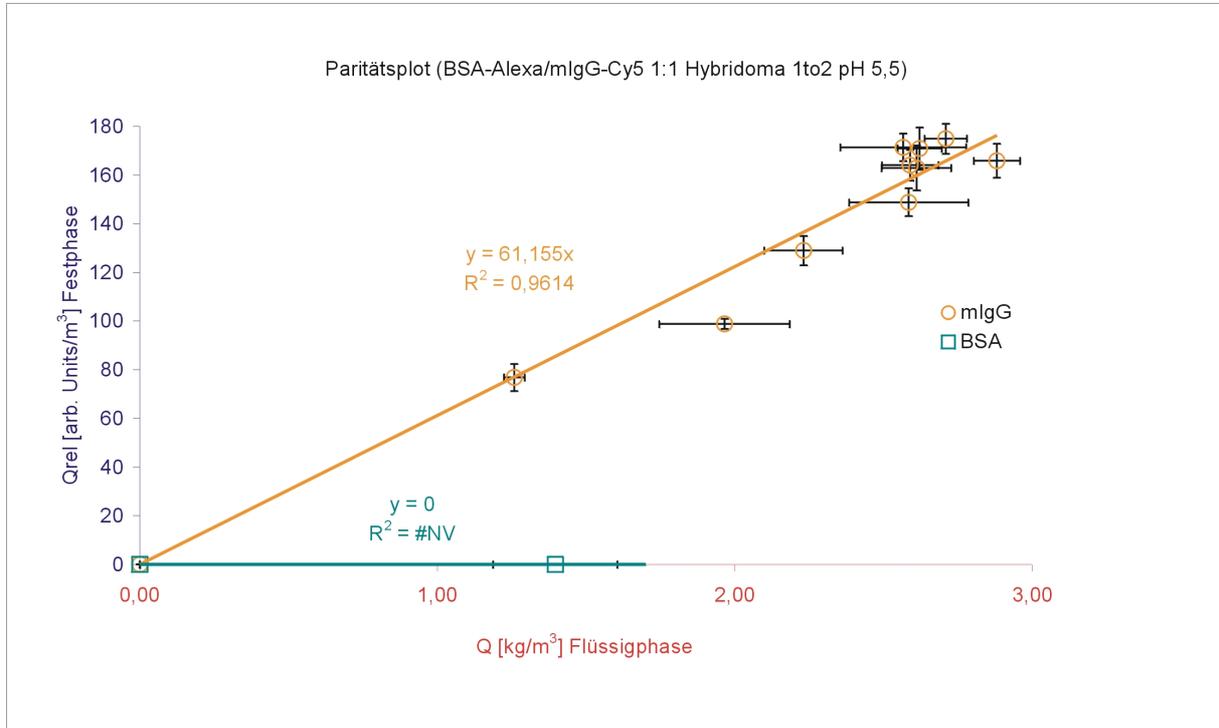
 $c_i(\text{BSA}): 150 \mu\text{g/mL}$ $c_i(\text{mlgG}): 150 \mu\text{g/mL}$ $V_{\text{Gel}}: 0,25 \text{ mL}$ 

Abbildung E11: Kapazitätsverläufe der absoluten Q_{abs} und relativen Kapazität Q_{rel} (BSA mlgG Hybridomaüberstand pH 5,5)

Tabelle E11: Experimentelle Daten (BSA mlgG Hybridomaüberstand pH 5,5)

Zeit		BSA				mlgG			
[Min]	[s]	Q_{abs} [kg/m^3]	Std.abw. [kg/m^3]	Q_{rel} [arb.units/ m^3]	Std.abw. [mg/ml]	Q_{abs} [kg/m^3]	Std.abw. [mg/ml]	Q_{rel} [mg/ml]	Std.abw. [mg/ml]
0	0	0,00	0,00	-	-	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5	150	1,40	0,21	-	-	1,26	0,03	76,80	5,61
5	300	1,60	0,31	-	-	1,97	0,22	98,82	2,13
10	600	1,41	0,06	-	-	2,23	0,13	128,96	5,97
15	900	1,49	0,06	-	-	2,59	0,20	148,81	5,74
30	1800	1,27	0,01	-	-	2,57	0,21	171,40	5,63
45	2700	1,41	0,09	-	-	2,62	0,07	170,92	8,71
60	3600	1,22	0,07	-	-	2,61	0,12	162,90	9,26
180	10800	1,57	0,08	-	-	2,59	0,10	164,04	6,27
900	54000	1,43	0,10	-	-	2,71	0,07	174,91	6,16
1200	72000	1,70	0,26	-	-	2,88	0,08	165,89	7,03

Anhang F: Experimentelle Daten und Micromath Scientist-Programm zur Bestimmung der Zweikomponentenisothermenparameter

Anhang F 1.: pH 4,5

Tabelle F1: Experimentelle Daten pH 4,5

MULTI KOMPONENTENISOTHERME BSA UND mIgG

pH: 4,5
 BSA cProtein = 4,97 mg/mL
 mIgG cProtein = 4,7 mg/mL
 csalt = 500 mM Acetat
 Systemvolumen = 800 uL

BSA	BSA		QBSA	mIgG	mIgG		QmIgG
ci	cps	ceq		ci	cps	ceq	
0,00	831	0,00	0,00	0,00	601	0,00	0,00
0,00	1153	0,00	-0,11	4,70	38295	0,42	97,78
1,07	9581	0,04	23,54	3,69	27887	0,31	77,30
1,60	11721	0,05	35,57	3,18	22643	0,25	67,07
2,14	13376	0,05	47,65	2,68	18027	0,20	56,65
2,57	12981	0,05	57,53	2,27	13165	0,15	48,58
2,86	28102	0,11	62,79	2,00	12927	0,14	42,34
3,04	13746	0,06	68,24	1,82	11208	0,12	38,87
3,16	14328	0,06	70,87	1,71	11716	0,13	36,21
3,26	14383	0,06	73,14	1,62	9912	0,11	34,51
3,39	14955	0,06	76,02	1,50	8847	0,10	32,00
3,61	13265	0,05	81,21	1,29	6879	0,08	27,74
1,81		0,00	41,26	0,65			
1,60	13705	0,06	35,38	3,18	22670	0,25	67,06
3,16	14565	0,06	70,84	1,71	9997	0,11	36,64
3,61	14826	0,06	81,06	1,29	8137	0,09	27,42
2,86	13439	0,05	64,14	2,00	13154	0,15	42,28
2,14	2189	0,01	48,68	2,68	17215	0,19	56,86
100 mM							
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmIgG
1,07	9833	0,04	23,55	3,22	20878	0,24	68,05
2,14	8602	0,03	48,12	2,21	10843	0,13	47,58
2,86	8945	0,03	64,58	1,53	7168	0,08	32,96
3,16	7667	0,03	71,50	1,24	4796	0,06	27,15
1,07	6682	0,03	23,83	3,22	19540	0,23	68,41
2,14	8398	0,03	48,14	2,21	10781	0,13	47,60
2,86	8609	0,03	64,61	1,53	6677	0,08	33,09
3,16	8266	0,03	71,45	1,24	4716	0,05	27,17
150 mM							
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmIgG
1,07	10373	0,04	23,50	2,75	19764	0,23	57,61
2,14	8525	0,03	48,12	1,74	9070	0,11	37,31
2,86	6588	0,03	64,79	1,06	4487	0,05	22,93
3,16	6481	0,03	71,61	0,77	3493	0,04	16,75
3,16	8001	0,03	71,47	0,77	5536	0,06	16,21
3,26	6238	0,02	73,91	0,68	2956	0,03	14,74

Anhang F 1.: pH 4,5

Tabelle F2: Experimentelle Daten pH 4,5

MULTI KOMPONENTENISOTHERME BSA UND mlgG							
pH:	4.5						
	BSA		cProtein =	11,5	mg/mL		
	mlgG		cProtein =	8,24	mg/mL		
csalt =	500	mM	Acetat				
Systemvolumen =			800	uL			
BSA	BSA			mlgG	mlgG		
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmlgG
0,00	2797	0,00	0,00	0,00	1231	0,00	0,00
0,00	7622	0,07	-1,52	8,24	27252	1,09	163,45
1,24	28676	0,25	22,55	7,35	38733	1,55	132,69
1,86	37409	0,33	34,97	6,91	43095	1,72	118,56
2,48	46606	0,41	47,33	6,46	41265	1,65	110,06
2,98	57168	0,50	56,69	6,10	45262	1,81	98,19
3,32	61181	0,53	63,76	5,86	46385	1,85	91,52
3,55	66676	0,58	67,78	5,70	49463	1,98	85,04
3,71	70073	0,61	70,89	5,58	49578	1,98	82,22
3,89	66958	0,59	75,52	5,45	41410	1,66	86,81
4,16	73739	0,64	80,31	5,26	43257	1,73	80,72
4,65	90667	0,79	88,24	4,91	48036	1,92	68,25
1,86	37017	0,32	35,04	6,91	42043	1,68	119,52
3,71	66398	0,58	71,62	5,58	44358	1,77	86,99
4,65	92095	0,81	87,95	4,91	47538	1,90	68,71
3,32	59793	0,52	64,04	5,86	44013	1,76	93,69
2,48	46084	0,40	47,44	6,46	41489	1,66	109,85
0,00	9996	0,09	-2,00	8,24	28951	1,16	161,89
2,47	46439	0,41	47,24	6,47	39123	1,56	112,11
3,71	60398	0,53	72,73	5,58	39860	1,59	91,17
4,95	92949	0,81	94,55	4,69	44303	1,77	66,82
5,94	158488	1,39	104,21	3,98	48533	1,94	46,64
6,62	203606	1,78	110,60	3,50	46944	1,88	37,06
7,04	234599	2,05	113,95	3,20	45505	1,82	31,53
7,31	240479	2,10	118,98	3,00	41552	1,66	30,70
7,54	289812	2,53	114,40	2,84	42426	1,70	26,12
7,84	280384	2,45	123,07	2,63	38345	1,53	24,99
8,34	314966	2,75	127,80	2,26	33460	1,34	21,11
3,71	84111	0,74	67,99	5,58	48330	1,93	83,43
7,31	261712	2,29	114,74	3,00	42237	1,69	30,07
8,34	325070	2,84	125,78	2,26	32871	1,31	21,65
6,62	216748	1,89	107,97	3,50	48126	1,92	35,98
4,95	138504	1,21	85,44	4,69	50196	2,01	61,43

Anhang F 1.: pH 4,5

Tabelle F3: Experimentelle Daten pH 4,5

100 mM							
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmIgG
1,24	24934	0,22	23,30	6,53	28824	1,15	122,91
2,48	43129	0,38	48,03	5,64	32688	1,31	99,06
3,32	55836	0,49	64,83	5,03	37245	1,49	81,04
3,71	62615	0,55	72,38	4,75	38287	1,53	73,70
1,24	23207	0,20	23,64	6,53	33075	1,32	119,03
2,48	43047	0,38	48,04	5,64	33718	1,35	98,12
3,32	56287	0,49	64,74	5,03	37968	1,52	80,38
3,71	60744	0,53	72,75	4,75	39524	1,58	72,57
2,47	46275	0,40	47,27	5,64	38238	1,53	94,08
4,95	95622	0,84	94,01	3,87	45768	1,83	46,64
6,62	182462	1,60	114,82	2,67	41872	1,67	22,86
7,31	216901	1,90	123,69	2,18	35160	1,41	17,70
2,47	46872	0,41	47,15	5,64	34817	1,39	97,21
4,95	91732	0,80	94,79	3,87	45427	1,82	46,96
6,62	180489	1,58	115,22	2,67	41912	1,68	22,82
7,31	214571	1,88	124,16	2,18	32566	1,30	20,07
150 mM							
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmIgG
1,24	21955	0,19	23,89	5,71	24329	0,97	108,18
2,48	41113	0,36	48,43	4,82	30038	1,20	82,64
3,32	57060	0,50	64,58	4,21	32152	1,29	66,86
3,71	72698	0,64	70,36	3,93	33141	1,32	59,57
1,24	38285	0,33	20,63	5,71	24948	1,00	107,62
2,48	42829	0,37	48,09	4,82	29334	1,17	83,29
3,32	51634	0,45	65,67	4,21	31572	1,26	67,39
3,71	57249	0,50	73,45	3,93	34740	1,39	58,11
2,47	54710	0,48	45,58	4,82	33223	1,33	79,83
4,95	92064	0,80	94,72	3,05	39949	1,60	33,13
6,62	192718	1,68	112,77	1,85	29936	1,20	14,93
7,31	216536	1,89	123,77	1,36	22111	0,88	10,79

Anhang F 2.: pH 5,0

Tabelle F4: Experimentelle Daten pH 5,0

MULTI KOMPONENTENISOTHERME BSA UND mlgG							
pH:	5.0						
	BSA		cProtein =	4,97	mg/mL		
	mlgG		cProtein =	4,74	mg/mL		
csalt =	500	mM	Acetat				
Systemvolumen =			800	uL			
			50mM				
BSA	BSA			mlgG	mlgG		
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmlgG
0	964	0	0	0	835	0	0
0,00	2640	0,01	-0,18	4,74	11919	0,16	104,74
1,07	2241	0,01	24,28	3,72	9420	0,12	82,26
1,60	5063	0,02	36,20	3,21	8976	0,12	70,75
2,14	7022	0,03	48,22	2,70	8172	0,10	59,34
2,57	6708	0,03	58,09	2,29	6839	0,09	50,39
2,86	11192	0,05	64,26	2,01	7405	0,09	43,85
3,04	9141	0,04	68,61	1,84	6751	0,08	40,13
3,16	11716	0,05	71,01	1,73	6836	0,09	37,55
3,26	19296	0,09	72,45	1,63	6148	0,08	35,60
3,39	23120	0,11	74,97	1,51	6737	0,08	32,61
3,61	22968	0,11	80,02	1,30	5264	0,06	28,29
1,60	10749	0,05	35,57	3,21	9681	0,13	70,52
3,16	20740	0,09	70,02	1,73	6105	0,07	37,78
3,61	23453	0,11	79,96	1,30	4825	0,06	28,43
2,86	20052	0,09	63,29	2,01	6948	0,09	44,00
2,14	21027	0,10	46,68	2,70	9775	0,13	58,81
			100 mM				
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmlgG
1,07	42439	0,20	19,77	3,25	16287	0,22	69,19
2,14	76780	0,37	40,46	2,23	11045	0,15	47,57
2,86	123116	0,59	51,87	1,54	8649	0,11	32,62
3,16	144570	0,69	56,32	1,25	7252	0,09	26,58
1,07	48804	0,23	19,07	3,25	16612	0,22	69,09
2,14	100262	0,48	37,88	2,23	13410	0,18	46,80
2,86	138789	0,67	50,15	1,54	10088	0,13	32,15
3,16	191369	0,92	51,18	1,25	11611	0,15	25,16
			150 mM				
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmlgG
1,07	126556	0,61	10,53	2,77	30239	0,42	53,83
2,14	227814	1,09	23,88	1,75	15702	0,21	35,22
2,86	308876	1,48	31,48	1,06	10658	0,14	21,13
3,16	334942	1,61	35,43	0,78	7129	0,09	15,78
2,86	132147	0,63	50,88	1,06	26649	0,37	15,93
3,04	231504	1,11	44,10	0,89	18466	0,25	14,66
3,16	306325	1,47	38,57	0,78	10311	0,13	14,75
3,26	342040	1,64	36,93	0,68	7633	0,10	13,45

Anhang F 2.: pH 5,0

Tabelle F5: Experimentelle Daten pH 5,0

MULTI KOMPONENTENISOTHERME BSA UND mlgG							
pH:	5.0		cProtein =	8,21	mg/mL		
	BSA		cProtein =	6,09	mg/mL		
	mlgG		Acetat				
csalt =	500	mM	800	uL			
Systemvolumen =			50 mM				
BSA	BSA			mlgG	mlgG		
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmlgG
0,00	1451	0,00	0,00	0,00	1231	0,00	0,00
0,00	2624	0,02	-0,36	6,09	10728	0,45	128,92
0,88	18911	0,11	17,58	5,43	13223	0,55	111,55
1,33	32956	0,20	25,75	5,11	17838	0,75	99,63
1,77	36300	0,22	35,43	4,78	15647	0,66	94,20
2,13	53338	0,32	41,27	4,51	20748	0,87	83,24
2,37	48882	0,29	47,51	4,33	16399	0,69	83,24
2,53	67791	0,41	48,55	4,21	18048	0,76	78,95
2,65	61059	0,37	52,18	4,12	17774	0,75	77,21
2,78	72508	0,44	53,47	4,03	16095	0,67	76,69
2,97	82771	0,50	56,44	3,89	16804	0,70	72,76
3,32	81969	0,49	64,62	3,63	17228	0,72	66,36
1,33	47777	0,29	23,71	5,11	18240	0,76	99,24
2,65	75449	0,46	50,20	4,12	18204	0,76	76,80
3,32	81832	0,49	64,64	3,63	22196	0,93	61,60
2,37	56192	0,34	46,50	4,33	18408	0,77	81,32
1,77	58229	0,35	32,41	4,78	17275	0,72	92,64
0,00	10358	0,06	-1,43	6,09	19739	0,83	120,28
1,77	42024	0,25	34,55	4,78	21848	0,92	88,33
2,65	71336	0,43	50,70	4,13	18907	0,79	76,17
3,53	86880	0,52	68,78	3,47	19308	0,81	60,79
4,24	107922	0,65	82,12	2,94	16956	0,71	50,99
4,73	134282	0,81	89,48	2,59	18254	0,77	41,59
5,02	157413	0,95	93,11	2,36	19151	0,80	35,67
5,22	199996	1,21	91,67	2,22	20095	0,84	31,48
5,38	196460	1,19	95,92	2,10	21314	0,89	27,52
5,59	220657	1,33	97,43	1,94	18070	0,76	27,04
5,96	220377	1,33	105,78	1,67	16099	0,68	22,76
2,65	83530	0,50	49,02	4,13	19541	0,82	75,56
5,22	167138	1,01	96,20	2,22	18221	0,76	33,28
5,96	238735	1,44	103,25	1,67	15196	0,64	23,63
4,73	156351	0,94	86,44	2,59	19948	0,84	39,96
3,53	101616	0,61	66,74	3,47	20474	0,86	59,67

Anhang F 2.: pH 5,0

Tabelle F6: Experimentelle Daten pH 5,0

100 mM							
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmIgG
0,88	48634	0,29	13,48	4,83	25747	1,08	85,62
1,77	102791	0,62	26,26	4,17	25289	1,06	71,04
2,37	147797	0,89	33,86	3,72	24150	1,01	61,89
2,65	173519	1,05	36,68	3,51	25364	1,06	56,01
0,88	56384	0,34	12,41	4,83	28138	1,18	83,33
1,77	114756	0,69	24,61	4,17	26564	1,11	69,82
2,37	154738	0,93	32,91	3,72	26684	1,12	59,46
2,65	189475	1,14	34,47	3,51	28352	1,19	53,15
1,77	114980	0,69	24,49	4,17	27503	1,15	68,99
3,53	258159	1,56	45,16	2,86	25018	1,05	41,40
4,73	377187	2,28	55,99	1,98	20384	0,85	25,63
5,22	424412	2,56	60,72	1,61	17096	0,72	20,44
1,77	165918	1,00	17,47	4,17	27870	1,17	68,64
3,53	291899	1,76	40,50	2,86	24852	1,04	41,55
4,73	415300	2,51	50,73	1,98	19814	0,83	26,17
5,22	467176	2,82	54,82	1,61	16448	0,69	21,06
150 mM							
ci	cps	ceq	QBSA	ci	cps	ceq	QmIgG
0,88	103303	0,62	5,94	4,22	30032	1,26	67,60
1,77	192159	1,16	13,94	3,56	24754	1,04	57,63
2,37	270678	1,63	16,92	3,11	22331	0,94	49,72
2,65	302130	1,82	18,94	2,91	20033	0,84	47,20
0,88	107119	0,65	5,42	4,22	30642	1,29	67,01
1,77	211945	1,28	11,21	3,56	27521	1,15	54,98
2,37	269915	1,63	17,02	3,11	22529	0,94	49,53
2,65	292228	1,76	20,30	2,91	20573	0,86	46,68
1,77	238561	1,44	7,45	3,56	24963	1,05	57,50
3,53	401257	2,42	25,42	2,25	14934	0,63	37,14
4,73	546202	3,30	32,68	1,37	8873	0,37	22,74
5,22	596392	3,60	37,00	1,00	6638	0,28	16,54
1,77	246019	1,48	6,53		24416		
3,53	401559	2,42	25,31		13899		
5,22	517431	3,12	47,89		8222		
5,38	474880	2,87	57,52		4692		

Anhang F 3.: pH 5,5

Tabelle F7: Experimentelle Daten pH 5,5

MULTI KOMPONENTENISOTHERME BSA UND mIgG							
pH:	5,5		cProtein =	5,04	mg/mL		
	BSA		cProtein =	2,73	mg/mL		
csalt =	500	mM	Acetat				
Systemvolumen =			800	uL			
				Csalt =	0	mM	
			50 mM				
BSA	BSA		QBSA	mIgG	mIgG	c	QmIgG
	cps	c			cps		
0,00	3719	0,00	0,00	0,00	835	0,00	0,00
0,00	19958	0,09	-2,12	2,73	30062	0,24	56,93
1,08	170994	0,80	6,58	2,14	25786	0,20	44,32
1,63	241852	1,13	11,44	1,85	22914	0,18	38,14
2,17	317097	1,48	15,84	1,56	18250	0,14	32,29
2,61	388467	1,81	18,23	1,32	16323	0,13	27,25
2,90	432432	2,01	20,30	1,16	13522	0,10	24,11
3,08	441263	2,05	23,55	1,06	12111	0,09	22,11
3,20	493897	2,30	20,67	1,00	12202	0,09	20,62
3,30	522428	2,43	19,94	0,94	11501	0,09	19,50
3,43	559385	2,60	18,99	0,87	11287	0,09	17,93
3,66	595232	2,77	20,28	0,75	9980	0,07	15,41
1,63	285367	1,33	6,81	1,85	24697	0,20	37,81
3,20	525652	2,45	17,29	1,00	12960	0,10	20,48
3,66	593910	2,76	20,42	0,75	9302	0,07	15,54
2,90	478683	2,23	15,38	1,16	14478	0,11	23,94
2,17	370090	1,72	10,21	1,56	20671	0,16	31,84
			100 mM				
			QBSA				QmIgG
1,08	224290	1,04	0,91	1,87	56749	0,46	32,29
2,16	434046	2,02	3,40	1,28	39999	0,32	21,98
2,90	573696	2,67	5,28	0,89	27361	0,22	15,29
3,20	634796	2,95	5,68	0,72	21834	0,17	12,58
1,08	233282	1,09	-0,05	1,87	68858	0,56	30,02
2,16	437799	2,04	3,01	1,28	42511	0,34	21,51
2,90	578219	2,69	4,79	0,89	28406	0,23	15,09
3,20	641245	2,98	4,99	0,72	21802	0,17	12,59
			150 mM				
			QBSA				QmIgG
1,083635	241371	1,12	-0,91	1,60	99770	0,81	18,00
2,168917	460585	2,14	0,58	1,01	61757	0,50	11,67
2,900667	617959	2,88	0,57	0,61	38999	0,31	6,87
3,202668	662277	3,08	2,76	0,45	26977	0,21	5,38
2,900667	323727	1,51	31,87	0,61	97806	0,79	-4,13
3,083687	463473	2,16	21,18	0,51	64296	0,52	-0,13
3,202668	611912	2,85	8,11	0,45	40523	0,32	2,85

Anhang F 4.:Scientist Programm zur Anpassung experimenteller Daten an das „Steric Mass Action“ Adsorptionsmodell

```
// MicroMath Scientist Model File
// Steric mass action model with one implicit equation
IndVars: c3, c2,csalt
DepVars: qsalt, q3, q2
Params: K12, K13, gama3, gama2, z3, z2
//
Qtot1=qtot/(1-.36)
qtot=214
Mw3=66.430                                „Molekulargewicht von BSA“
Mw2=147.000                                „Molekulargewicht von mlG“
//Equations
TEMP=csalt+ (gama2+z2)*C2/Mw2*K12*(Qsalt/Csalt)^(z2-1)+(gama3+z3)*C3/Mw3*K13*(Qsalt/Csalt)^(z3-1)
Qsalt= Qtot*csalt/(Temp)
Q2=(Qtot*C2/Mw2*K12*(Qsalt/Csalt)^(z2-1))/Temp*Mw2*(1-0.36)
Q3=(Qtot*C3/Mw3*K13*(Qsalt/Csalt)^(z3-1))/Temp*Mw3*(1-0.36)
// constrains
10000>qsalt>0
K13>0
K12>0
Z2>0
Z3>0
gama2>0
gama3>0
// parameters
K13=185.43
K12=69.49
gama2=50
gama3=78
z2=2
z3=2
***
```

K, gama und z bezeichnen die SMA-Parameter: die Gleichgewichtskonstante K_i , den sterischen Faktor ρ_i und die charakteristische Ladung z_i

Die Indizes 12 beziehen sich auf die Adsorption des Antikörpers

Die Indizes 13 beziehen sich auf die Adsorption von BSA

Anhang G: Multicoloranalyse der Proteinadsorption an SP-Sepharose FF 1.: BSA 50 mM Acetatpuffer pH 4,5

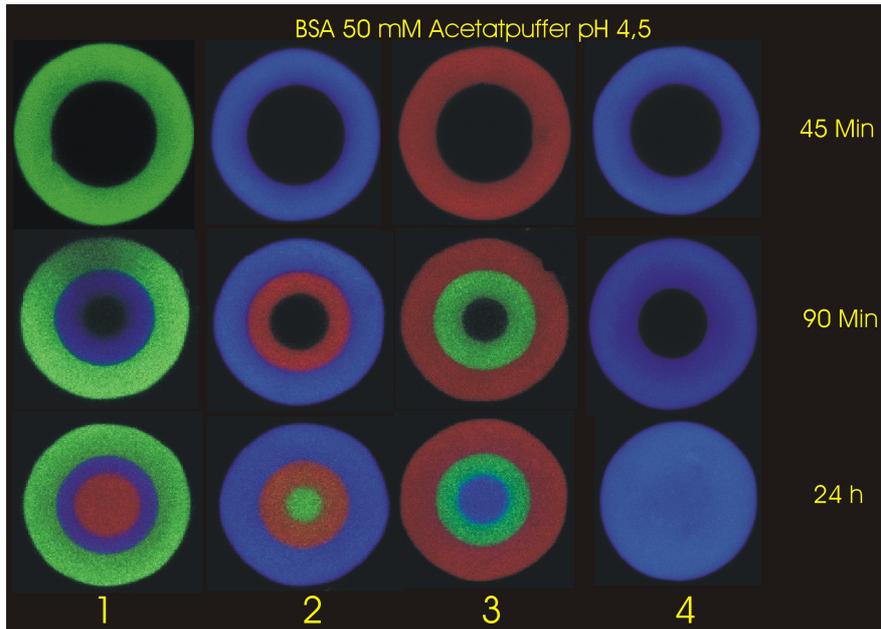


Abbildung G1: Konfokalbilder der Multicoloranalyse BSA 50 mM Acetat pH 4,5

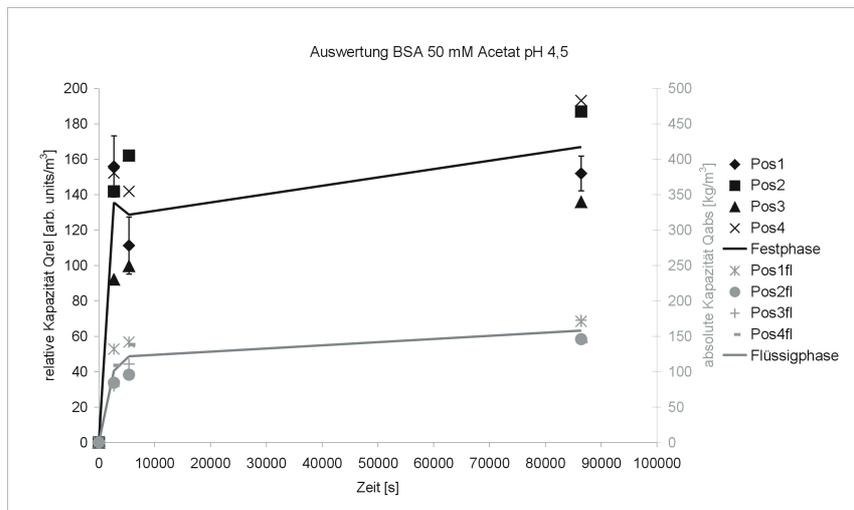


Abbildung G2: Verlauf der relativen – und absoluten Kapazitäten im Experiment

Tabelle G1: Ermittelte relative und absolute Kapazitäten

Festphase relative Kapazitäten Q_{rel} [arb. units/m ²] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Q_{rel} Pos1	Q_{rel} Pos2	Q_{rel} Pos3	Q_{rel} Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
45	2700	155,95	141,79	91,99	152,24	135,49
90	5400	111,21	162,07	99,65	141,90	128,71
1440	86400	151,97	186,98	135,80	193,07	166,95
Flüssigphase absolute Kapazitäten Q_{abs} [kg/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Q_{abs} Pos1	Q_{abs} Pos2	Q_{abs} Pos3	Q_{abs} Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
45	2700	132,05	84,24	79,31	108,85	101,11
90	5400	141,81	95,60	110,78	138,06	121,56
1440	86400	170,99	145,65	172,35	142,43	157,85

Anhang G 2.:BSA 50 mM Acetatpuffer pH 5,0

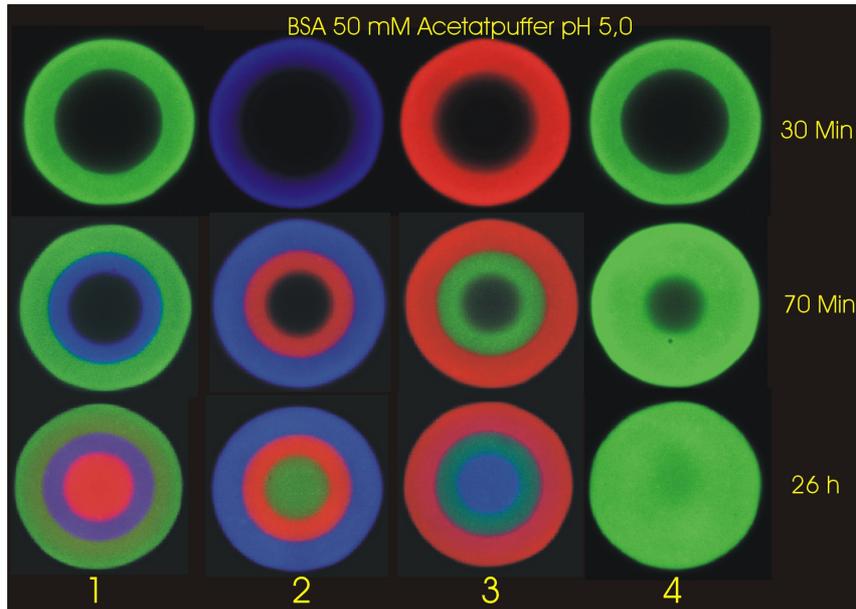


Abbildung G3: Konfokalbilder der Multicoloranalyse BSA 50 mM Acetat pH 5,0

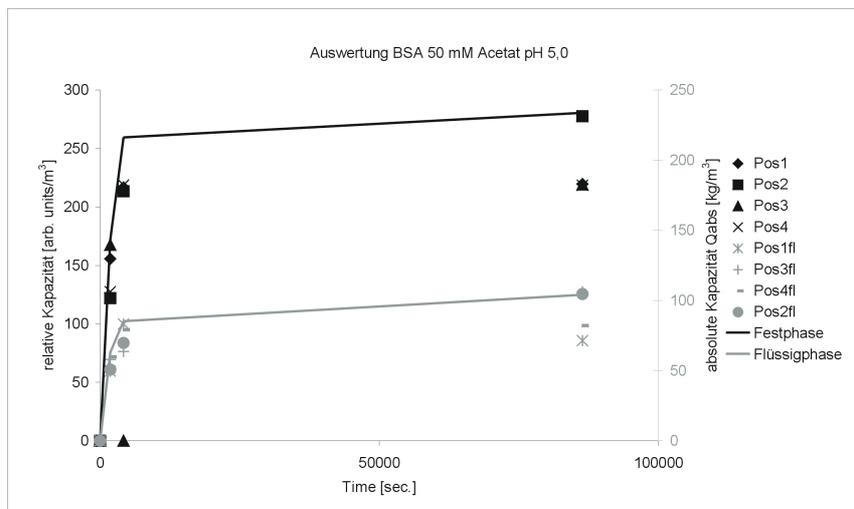


Abbildung G4: Verlauf der relativen – und absoluten Kapazitäten im Experiment

Tabelle G2: Ermittelte relative und absolute Kapazitäten

Festphase relative Kapazitäten Q_{rel} [arb. units/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Qrel Pos1	Qrel Pos2	Qrel Pos3	Qrel Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	1800	155,55	121,95	167,52	127,55	143,14
70	4200	216,65	213,47	-	218,66	216,26
1440	86400	219,61	277,65	219,13	218,44	233,71
Flüssigphase absolute Kapazitäten Q_{abs} [kg/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Qabs Pos1	Qabs Pos2	Qabs Pos3	Qabs Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	1800	59,57	50,77	69,46	71,82	62,90
70	4200	99,82	69,81	76,35	94,90	85,22
1440	86400	85,76	104,53	127,58	98,47	104,09

Anhang G 3.: BSA 150 mM Acetatpuffer pH 5,0

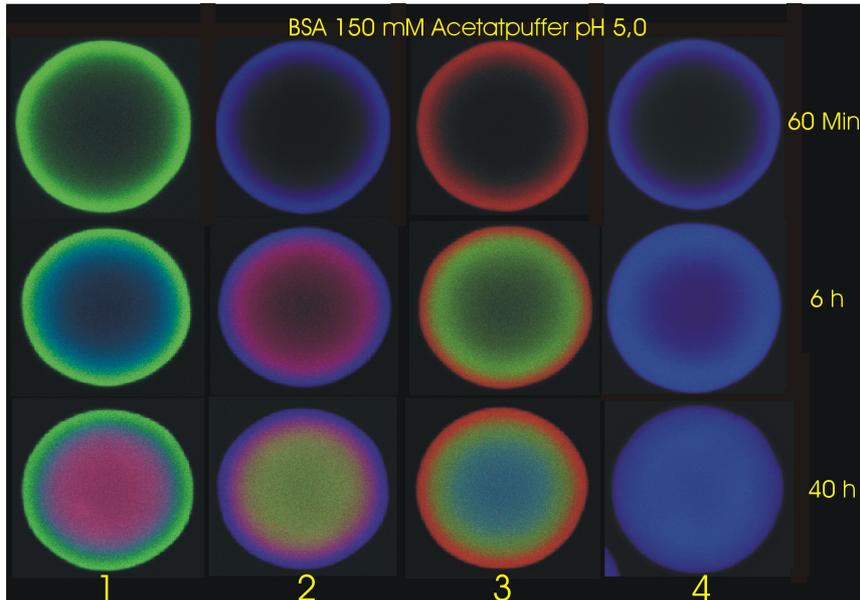


Abbildung G5: Konfokalbilder der Multicoloranalyse BSA 150 mM Acetat pH 5,0

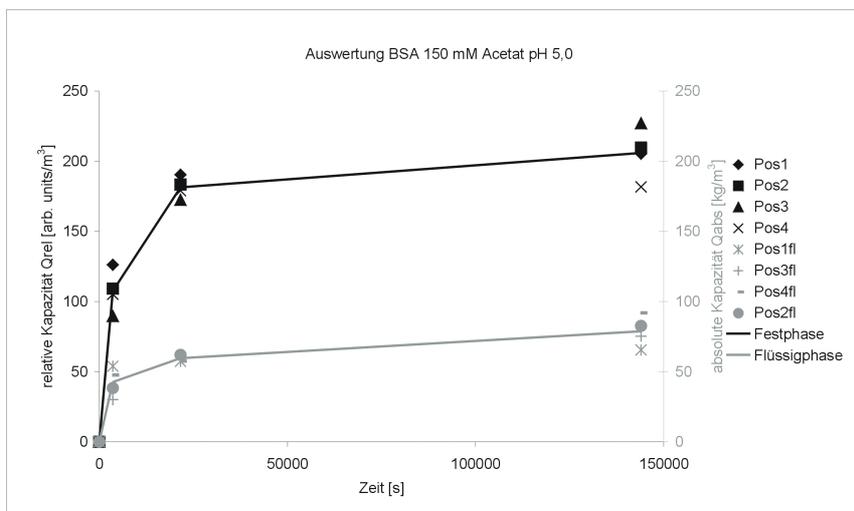


Abbildung G6: Verlauf der relativen – und absoluten Kapazitäten im Experiment

Tabelle G3: Ermittelte relative und absolute Kapazitäten

Festphase relative Kapazitäten Q_{rel} [arb. units/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Q_{rel} Pos1	Q_{rel} Pos2	Q_{rel} Pos3	Q_{rel} Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	3600	126,21	109,31	89,71	105,25	107,62
360	21600	190,50	183,34	172,48	179,04	181,34
2400	144000	205,28	209,85	227,18	181,66	205,99
Flüssigphase absolute Kapazitäten Q_{abs} [kg/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Q_{abs} Pos1	Q_{abs} Pos2	Q_{abs} Pos3	Q_{abs} Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	3600	53,91	38,47	30,08	47,67	42,53
360	21600	57,44	62,06	61,41	57,65	59,64
2400	144000	65,52	82,63	75,30	91,87	78,83

Anhang G 4.: BSA 50 mM Acetatpuffer pH 5,5

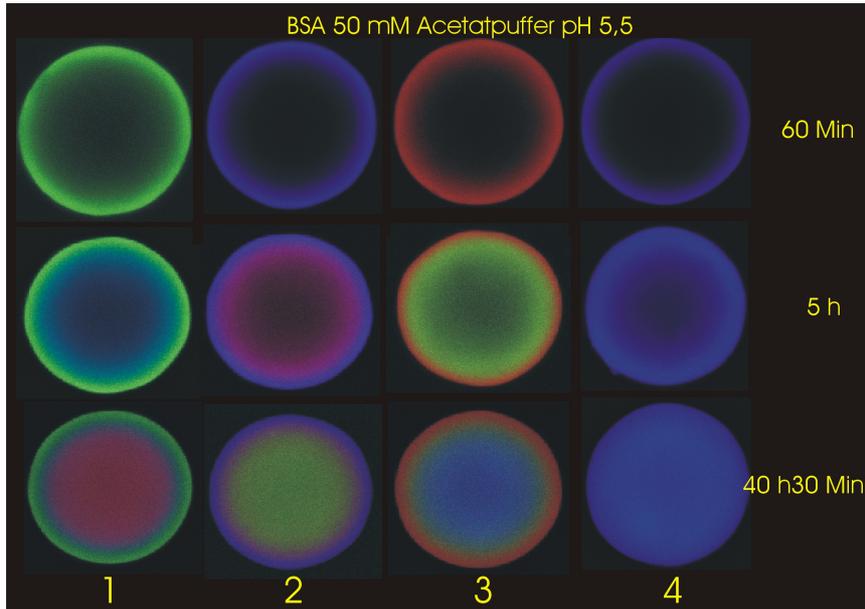


Abbildung G7: Konfokalbilder der Multicoloranalyse BSA 50 mM Acetat pH 5,5

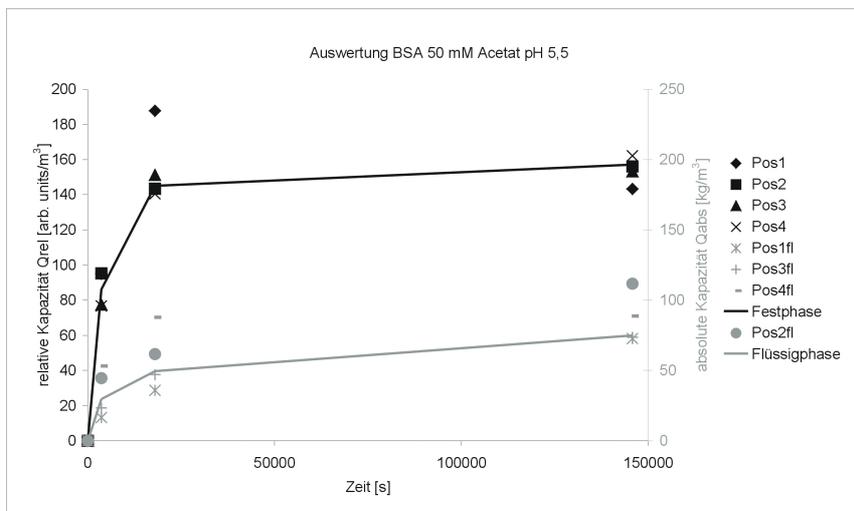


Abbildung G8: Verlauf der relativen – und absoluten Kapazitäten im Experiment

Tabelle G4: Ermittelte relative und absolute Kapazitäten

Festphase relative Kapazitäten Qrel [arb. units/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Qrel Pos1	Qrel Pos2	Qrel Pos3	Qrel Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	3600	94,94	95,30	77,49	76,69	86,10
300	18000	187,78	143,40	151,31	140,45	145,05
2430	145800	143,26	156,17	153,33	162,09	157,19
Flüssigphase absolute Kapazitäten Qabs [kg/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Qabs Pos1	Qabs Pos2	Qabs Pos3	Qabs Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
60	3600	13,23	44,47	18,64	42,51	29,71
300	18000	28,77	61,67	37,76	70,23	49,61
2430	145800	58,15	111,69	58,91	71,04	74,95

Anhang G 5.: mlgG 50 mM Acetatpuffer pH 4,5

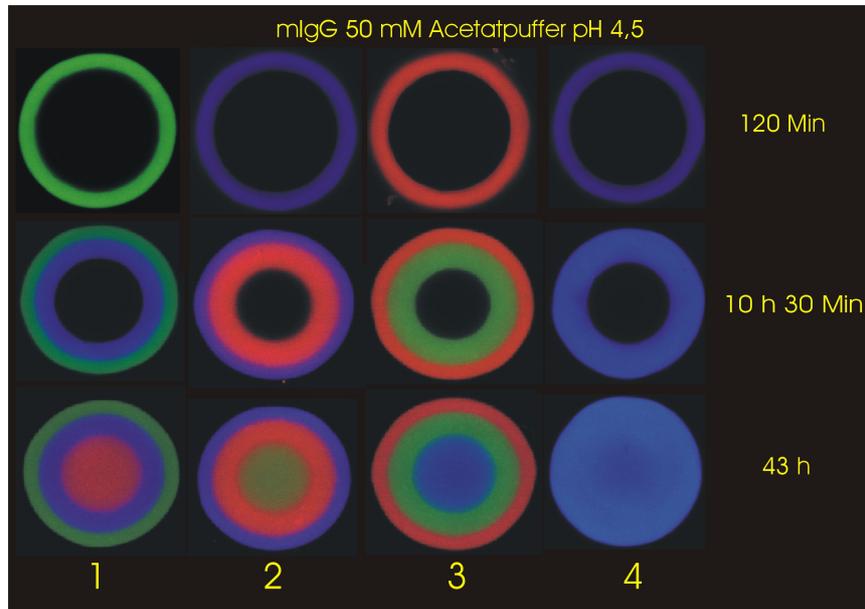


Abbildung G9: Konfokalbilder der Multicoloranalyse mlgG 50 mM Acetat pH 4,5

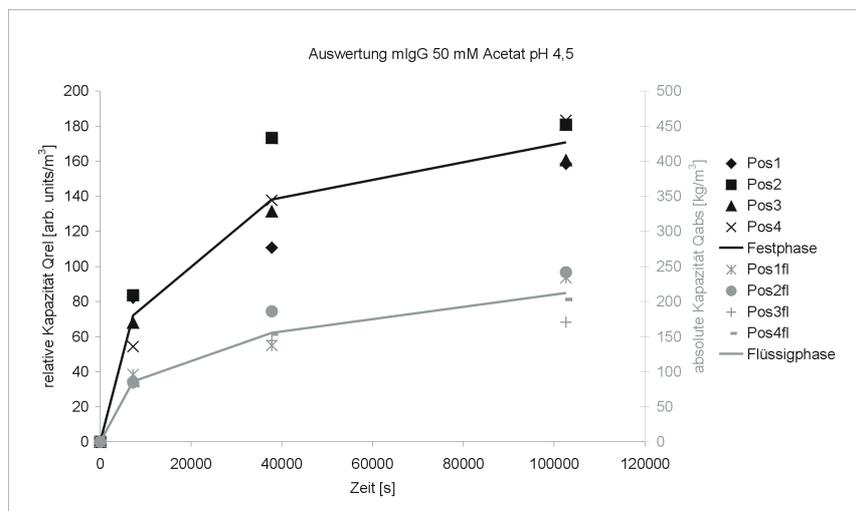


Abbildung G10: Verlauf der relativen – und absoluten Kapazitäten im Experiment

Tabelle G5: Ermittelte relative und absolute Kapazitäten

Festphase relative Kapazitäten Q_{rel} [arb. units/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Q_{rel} Pos1	Q_{rel} Pos2	Q_{rel} Pos3	Q_{rel} Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
120	7200	82,28	83,56	67,84	54,35	72,01
630	37800	110,65	173,27	131,33	137,64	138,22
1710	102600	158,46	180,80	160,64	183,34	170,81
Flüssigphase absolute Kapazitäten Q_{abs} [kg/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Q_{abs} Pos1	Q_{abs} Pos2	Q_{abs} Pos3	Q_{abs} Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
120	7200	95,95	84,98	83,42	79,90	86,06
630	37800	137,36	185,86	144,25	153,69	155,29
1710	102600	233,82	241,74	170,46	202,98	212,25

Anhang G 6.: mlgG 50 mM Acetatpuffer pH 5,0

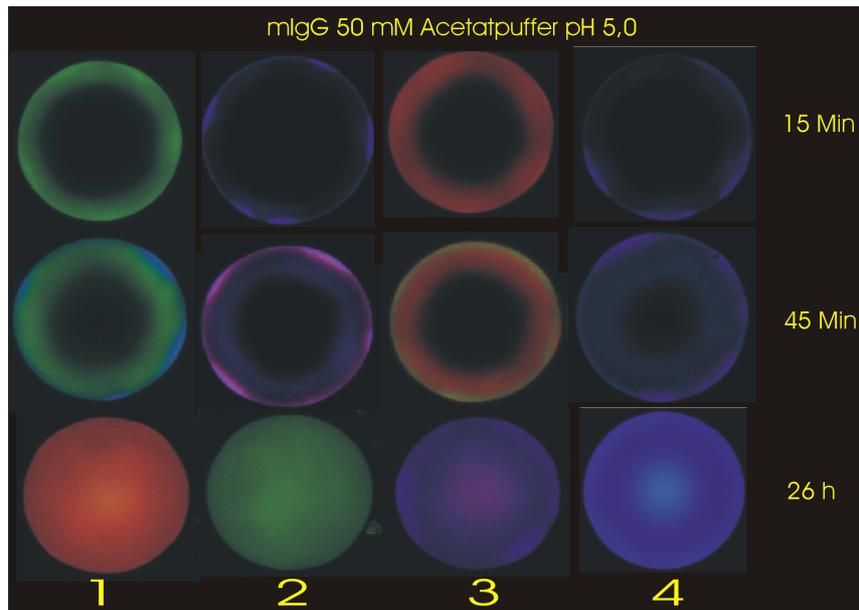


Abbildung G11: Konfokalmikroskopische Bilder der Multicoloranalyse mlgG 50 mM Acetat pH 5,0

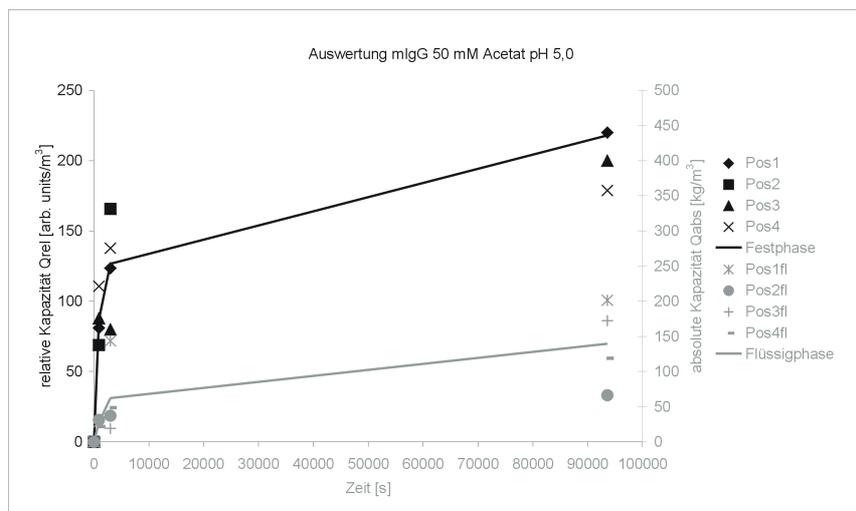


Abbildung G12: Verlauf der relativen – und absoluten Kapazitäten im Experiment

Tabelle G6: Ermittelte relative und absolute Kapazitäten

Festphase relative Kapazitäten Q_{rel} [arb. units/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Q_{rel} Pos1	Q_{rel} Pos2	Q_{rel} Pos3	Q_{rel} Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	900	81,07	68,78	87,87	110,70	87,10
45	2700	123,47	165,66	79,97	137,64	126,68
1560	93600	219,99	272,97	199,89	178,82	217,92
Flüssigphase absolute Kapazitäten Q_{abs} [kg/m ³] der einzelnen Positionen 1-4						
t [min]	t [s]	Q_{abs} Pos1	Q_{abs} Pos2	Q_{abs} Pos3	Q_{abs} Pos4	Mittelwert
0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	900	28,40	31,28	28,51	21,76	27,49
45	2700	143,57	37,29	19,17	48,59	62,15
1560	93600	201,50	66,38	172,17	118,82	139,72

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Oliver Linden
geboren am: 24 August 1968 in Köln
Familienstand: ledig

Schulbildung

08/1975 – 06/1979: Grundschule Sankt Augustin
08/1979 – 06/1988: Rhein-Agger-Sieg Gymnasium in Sankt Augustin,
Abschluss: Abitur

Bundeswehr und Berufsausbildung

10/1988 – 12/1989: Grundwehrdienst beim 2 Panzerbattalion 241 in Koblenz
08/1990 – 07/1992: Ausbildung zum Biologisch-Technischen-Assistenten
BTA an der Rheinischen Akademie e.V., Köln
Abschluss: Staatlich geprüfter BTA

Hochschulausbildung

10/1992 – 11/1997: Studium der Biochemie (Diplom) an der Universität zu
Hannover
10/1994 : Vordiplom
Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Neurologische
Forschung in Köln, Thema: Quantitative Analyse der
Genexpression nach zellulärem Stress
11/1997 : Abschluss: Diplom Biochemiker
04/1998 - 09/2001: Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für
Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Thema: Untersuchungen zum inneren Transport bei der
Proteinadsorption an porösen Medien mittels konfokaler
Laser-Raster-Mikroskopie

Berufliche Tätigkeiten

10/2001 - : Merck & Co., Inc., West Point, PA, USA