

1. Einleitung und Zielsetzung

Synthetisch hergestellte einzelsträngige Oligonukleotide, so genannte Aptamere, besitzen die Fähigkeit, ihr Zielmolekül mit einer hohen Affinität und Spezifität zu binden. Diese Fähigkeit erhalten sie aufgrund des *in vitro* Herstellungsverfahrens, genannt SELEX, bei dem die Aptamere aus einer großen Bibliothek aus Oligonukleotiden anhand ihrer Affinität zum Zielmolekül ausgesucht und vervielfältigt werden [1]. Die Affinität entsteht aufgrund der dreidimensionalen Struktur, die von der Basenabfolge des Oligonukleotids bestimmt wird. Die Bindung des Aptamers wird von hydrophobischen und elektrostatischen Interaktionen, Wasserstoffbrückenbindungen und sterischen Effekten bestimmt [2] und ist für das Zielprotein hochspezifisch. Aus diesem Grund können sie als Alternative zu Antikörpern mit diversen Vorteilen in der Herstellung und Anwendung betrachtet werden, siehe Kapitel 2.4 Aptamere. Bisher werden Aptamere in der medizinischen Diagnostik und Therapie, oder als biologisch aktiver Teil von Biosensoren verwendet [3].

Mit der Immobilisierung dieser spezifischen Erkennungsstrukturen auf superparamagnetischen Partikeln ergeben sich aussichtsreiche Anwendungen im Downstream Processing, siehe Kapitel 2.4.2 Anwendung von Aptameren, die in dieser Arbeit untersucht werden. Im Bereich der Aufarbeitung können die Aptamerpartikel Zielmoleküle aus komplexen Fermentationsmedien abtrennen. Dazu werden die Partikel in aufgeschlossenen Zellen verteilt und binden dort die gewünschten Zielmoleküle. Bei extrazellulären Produkten würde dieser Verfahrensschritt entfallen. Anschließend werden die Partikel magnetisch separiert und die übrigen Zellen bzw. Bestandteile des Lysats entfernt. Durch die Zugabe eines Elutionspuffers wird das Zielmolekül von den Partikeln gewaschen und die Partikel einer neuen Separation zugeführt, siehe Abb. 1.

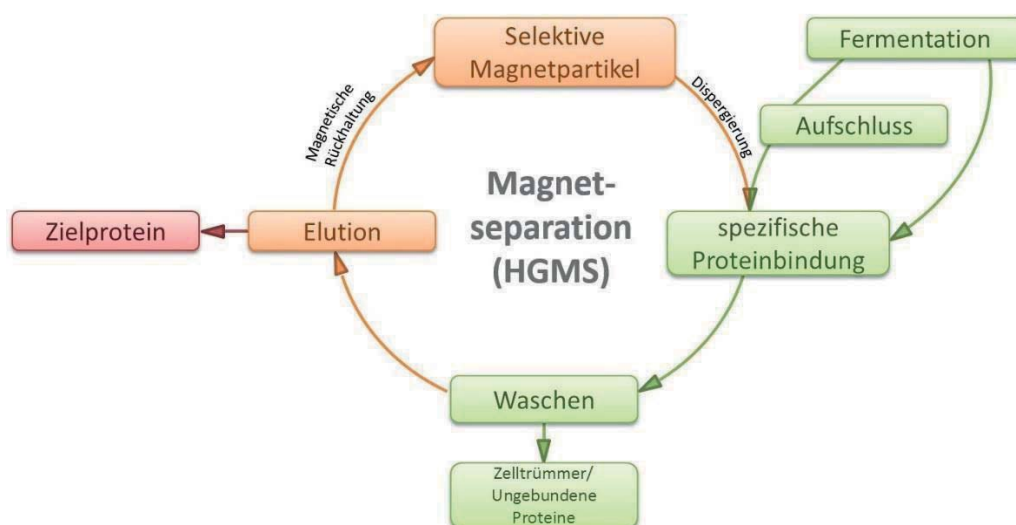


Abb. 1: Verwendung der Aptamerpartikel im Zelllysats zur wiederholten Abtrennung von Zielproteinen.



Der Vorteil der Magnetpartikel gegenüber bisherigen Methoden der Proteinaufarbeitung ist, dass die Aptamerpartikel direkt in der Biomasse verwendet und somit der entsprechende Separationsschritt eingespart werden kann. Ein weiterer Vorteil bildet die mögliche Renaturierung von Aptameren durch Anlegen der für jedes Aptamer spezifischen Schmelztemperatur. Zudem kann die Regeneration der Aptamerpartikel, genau wie bei Protein A oder Antikörpern, die bei Affinitätsaufarbeitungen häufig verwendet werden, innerhalb von Minuten erfolgen. Zusammenfassend können Aptamerpartikel eine langfristige und wirtschaftliche Lösung bieten.

Da die Immobilisierung der Aptamere bisher nicht reversibel ist, werden zwei verschiedene Aptamere an die Partikel gebunden. Zunächst werden kurze Oligonukleotide als Linker, so genannte „Spacer“, kovalent an die Magnetpartikel gebunden. An diese folgt anschließend die Hybridisierung des Zielmolekül bindenden Aptamers. Es besteht damit die Möglichkeit, das Zielmolekül über die Dehybridisierung des Aptamers vom Linker zu lösen. Zusätzlich ist es möglich, die Magnetpartikel je nach Aufreinigung, mit einem neuen, spezifischen Aptamer zu modifizieren. Es entsteht ein Magnetpartikel mit spezifischer Bindungseigenschaft, die nach Bedarf dem Zielmolekül angepasst werden kann. Dazu wird die Bindung zwischen Oligolinker und langem Aptamer durch Hitzeeinwirkung denaturiert und das Aptamer entfernt. Die Oligolinker verbleiben auf den Partikeln und können mit einer dem neuen Zielmolekül angepassten Aptamerstruktur hybridisiert werden. Anschaulich wird dies in Kapitel 2.4.3 Auswahl der verwendeten Aptamere.

In dieser Arbeit wird die Bindung von Oligolinkern und Aptameren auf magnetischen Partikeln realisiert. Dazu werden zunächst die Partikelgrößenverteilungen der verwendeten Partikel untersucht. Anhand der Größe können die mögliche Oberflächensaturierung der Partikel und die zur Saturierung notwendigen Einsatzmengen an Oligonukleotid und Aptamer abgeschätzt werden. Die Geschwindigkeit der Bindungsreaktion wird mit Hilfe der Aufnahme der Isothermen über die Bindungsdauer beobachtet, um den Zeitpunkt der optimalen Beladung zu ermitteln. Die Oligolinker enthalten eine terminale Erkennungsstruktur, die zur Bildung kovalenter Bindungen mit den chemisch aktivierten Magnetpartikeln verwendet wird. Zur Optimierung der Bildungskapazität werden der pH-Wert und die Konzentration des Oligolinkers während der Bindung variiert und anschließend Aptamer an die Partikel hybridisiert. Die Ergebnisse der Versuche sind in Kapitel 4.2 Aptamerpartikel dargestellt.

Nach der Optimierung der Aptamerpartikel werden diese auf ihre Wiederverwendbarkeit und Langzeitstabilität untersucht, um mögliche Vorteile der Partikel gegenüber konkurrierenden Methoden abzuschätzen. Die Partikel werden in gemischten Proteinmedien untersucht, um die Spezifität der Partikel und die unspezifische Adsorption an die Partikel zu untersuchen. Diese sind entscheidend für den Separationserfolg und damit für die Funktion der Partikel. Abschließend erfolgt ein Vergleich der Ergebnisse mit Modellsystemen, mit zurzeit

angewandten Methoden der Proteinaufreinigung, die in Konkurrenz zu den Aptamerpartikel stehen. Es werden mit Iminodiessigsäure (IDA)-funktionalisierte Magnetpartikel betrachtet, die die Histidin-Endungen (His₆-Tags) von entsprechend modifizierten Proteinen binden und damit als direkter Vergleich für die ebenfalls His₆-Tags bindenden Aptamerpartikel dienen. Zudem wird die spezifische Bindung von Protein A, Antikörper und Antigen im Vergleich dargestellt. Der abschließende Vergleich der verschiedenen Partikel wird in Kapitel 4.2.10 Vergleich der Modellsysteme mit den Aptamerpartikeln erläutert.

Als Modellproteine für die Immobilisierung werden zwei mit His₆-Tag modifizierte Proteine verwendet. Das fluorimetrisch aktive GFPmut2 wird aufgrund seiner Möglichkeit zur Detektion und Visualisierung verwendet, um die Bindung an Partikel zu quantifizieren und optisch nachzuweisen. Für die enzymatischen Untersuchungen werden Laccase und die Cytochrom P450 Monooxygenase verwendet, die aussichtsreiche biotechnologische Anwendungen verspricht, wie in Kapitel 2.4.2 Anwendung von Aptameren aufgeführt wird.

Im Rahmen der Arbeit wird zudem die Planung und Konstruktion eines für die Laboranwendung konzipierten magnetischen Separators durchgeführt. Der Separator wird nach dem Vorbild eines bestehenden größeren Separators entworfen und auf die Anwendung mit geringen Partikelmengen und die Erzeugung geringer Partikelverluste ausgelegt. Nach der Aufnahme verschiedener Durchbruchkurven des Separators wird die Verteilung der Partikel im Filter simuliert, die wichtigsten Filterkenndaten berechnet und mit dem Vorbild verglichen. In anschließenden Versuchen mit Laccase-Immobilisaten wird die Anwendbarkeit des Miniatur-Separators erprobt. Diese Versuche sind in Kapitel 4.3 Hochgradienten-Magnetseparation dargestellt.



2. Theoretische Grundlagen

2.1 Magnetpartikel

In den folgenden zwei Unterkapiteln werden zunächst die physikalischen Grundlagen der Magnetseparation erläutert und anschließend die Auswirkungen der Kräfte auf die Eigenschaften magnetischer Partikel dargestellt. In den weiteren Abschnitten wird auf die Abtrennung der Partikel mit dem HGMS-Verfahren (Hochgradienten-Magnetseparation) eingegangen und die Messmethoden für die Partikelgrößen aufgezeigt, die für die magnetischen Eigenschaften der Partikel von Bedeutung sind.

2.1.1 Magnetische Kenngrößen

2.1.1.1 Magnetische Flussdichte

Um einen stromdurchflossenen Leiter bildet sich ein Magnetfeld, dessen Feldlinien senkrecht zu dem Leiter verlaufen. Verläuft der Leiter durch ein weiteres Magnetfeld, kommt es zu einer Überlagerung der Felder. Das superpositionierte Feld übt auf den Stromleiter eine senkrecht zur Stromrichtung und den Feldlinien des Magnetfeldes stehende Kraft aus. Die magnetische Flussdichte B ist wie folgt definiert:

$$B = \frac{F}{I \cdot L} \quad (\text{Gl. 1})$$

Entsprechend der Einflussfaktoren Leiterlänge L , Strom I und Kraft F variiert die magnetische Flussdichte. Sie ist ein Vektor, der in Richtung des Magnetfeldes verläuft und senkrecht zur Strom- und Krafrichtung steht. Das magnetische Feld wird damit durch seine auf den stromdurchflossenen Leiter ausübende Wirkung beschrieben. Die Einheit der magnetischen Flussdichte wird folgendermaßen dargestellt:

$$[B] = \frac{\text{N}}{\text{A} \cdot \text{m}} = \frac{\text{V} \cdot \text{s}}{\text{m}^2} = \frac{\text{kg}}{\text{A} \cdot \text{s}^2} \equiv \text{T} \quad (\text{Gl. 2})$$

2.1.1.2 Magnetische Feldstärke und Permeabilität

Ein magnetisches Feld entsteht aufgrund einer magnetischen Feldstärke H . Innerhalb einer stromdurchflossenen Spule ist der Betrag mit der Länge L der Spule und der Anzahl der Windungen n folgendermaßen definiert:

$$H = n \cdot \frac{I}{L} \quad (\text{Gl. 3})$$

Die Richtung der magnetischen Feldstärke H entspricht derjenigen der magnetischen Flussdichte und besitzt die Einheit $A \cdot m^{-1}$. Durch die magnetische Feldkonstante μ_0 und die Permeabilitätszahl μ_r besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der magnetischen Flussdichte und der magnetischen Feldstärke, siehe (Gl. 4). Die Permeabilitätszahl ist ein Maß für die Durchlässigkeit der in der Spule befindlichen Materie für magnetische Felder.

$$B = \mu_0 \cdot \mu_r \cdot H \quad (\text{Gl. 4})$$

2.1.1.3 Polarisation und Suszeptibilität

Wird eine Substanz in ein magnetisches Feld eingebracht, verändert sich die magnetische Flussdichte innerhalb der Materie vom Ausgangswert B_{Vakuum} auf den neuen Wert B_{Materie} . Die Änderung der magnetischen Induktion ΔB wird magnetische Polarisation J genannt, siehe (Gl. 5)

$$J = B_{\text{Materie}} - \mu_0 \cdot H \quad (\text{Gl. 5})$$

Die Polarisation ist bei allen Stoffen, mit Ausnahme ferro- bzw. ferrimagnetischer Substanzen, proportional zu der von ihr hervorgerufenen Feldstärke.

$$J = \kappa \cdot \mu_0 \cdot H \quad (\text{Gl. 6})$$

Hierbei ist die magnetische Suszeptibilität κ der Proportionalitätsfaktor.

$$\kappa = \mu_r - 1 \quad (\text{Gl. 7})$$

Anhand der Permeabilitätszahl μ_r werden Stoffe mit konstanter Suszeptibilität in zwei Gruppen eingeteilt. Stoffe mit $\mu_r > 1$ bzw. $\kappa > 0$ heißen paramagnetisch und verstärken das Magnetfeld. Stoffe mit $\mu_r < 1$ bzw. $\kappa < 0$ werden als diamagnetisch bezeichnet und schwächen das Magnetfeld. Bei ferro- und ferrimagnetischen Stoffen ist die magnetische Polarisation J nicht proportional zur Feldstärke H , sondern strebt bei großen Feldstärken einem Maximalwert entgegen. Damit ist die Permeabilitätszahl μ_r eine Funktion der Feldstärke H .



2.1.1.4 Magnetisierung

Anstatt der Polarisierung J wird in der Technik der Einfluss eines Magnetfeldes auf ferro- bzw. ferrimagnetische Substanzen mit Hilfe der Magnetisierung M beschrieben. Gemessen wird die Magnetisierung in der Einheit $A \cdot m^{-1}$.

$$M = \Delta H = H_{Materie} - H_{Vakuum} \quad (\text{Gl. 8})$$

Der Maximalwert der Polarisierung bzw. Magnetisierung bei ferro- und ferrimagnetischen Stoffen wird Sättigungspolarisation J_S oder Sättigungsmagnetisierung M_S genannt. Der Wert wird durch eine vollständige Ausrichtung der magnetischen Dipole unter der magnetischen Kraftwirkung des Magnetfeldes erreicht. Mit zunehmender Magnetisierung wächst die Feldstärke bis zu einer vollständigen Ausrichtung aller Dipole [4].

2.1.2 Magnetische Partikel und ihre Eigenschaften

Für die Verfahrenstechnik relevante magnetische Partikel können aus Metallen (Fe, Co, Ni), Metalloxiden (FeO, Fe₂O₃ (Maghemit), Fe₃O₄ (Magnetit)), Legierungen (FePt, FePt₃) sowie Ferriten (CoFe₂O₄, MnFe₂O₄) bestehen [5]. Die Vorteile gegenüber nicht magnetischen Partikeln bestehen in der hohen Abtrenneffizienz von bis zu 99 %, der damit verbundenen Wiederverwendbarkeit der Partikel, sowie der einfacheren Prozesskontrolle durch angelegte Magnetfelder. Magnetische Partikel können porös oder unporös synthetisiert werden. Nicht poröse Partikel neigen nicht zum Fouling, wie andere in der Chromatographie eingesetzte Materialien und lassen sich deshalb leichter reinigen und wiederverwenden. Zudem können bei der Verwendung von Enzymen diese direkt an der Oberfläche gebunden werden, wodurch eine Reaktionsverlangsamung durch Porendiffusion vermieden wird [5]. Anhand der Oberflächenbeschichtung lassen sich Dispergierbarkeit und Biokompatibilität in verschiedenen Medien erreichen [6]. Nanoskalige Partikel besitzen zusätzlich eine große spezifische Oberfläche.

Magnetische Nanopartikel weisen zudem von makroskopischen Körpern abweichende Eigenschaften auf. Werden magnetisierbare Partikel von einer Größe über 20 nm magnetisch separiert, verbleibt nach dem Entfernen der Magnete eine Restmagnetisierung (Remanenz) weshalb es zur Agglomeration der Partikel kommt. Dieser Effekt beruht auf der parallelen Ausrichtung der magnetischen Momente über größere Kristallbereiche, den Weißschen Bezirken mit einer Größe von 0,001 - 0,1 nm³. Es entstehen Domänen magnetischer Spins mit gleicher Orientierung. Bei Partikeln mit einem Durchmesser kleiner als 20 nm tritt aufgrund der geringen Größe paramagnetisches Verhalten auf. Beim Anlegen eines äußeren Magnetfeldes richten sich diese Partikel zum Magnetfeld aus, beim Entfernen des äußeren Feldes kehren sie in den ungeordneten Zustand zurück [5]. Hierbei verbleibt keine Remanenz

und es tritt deshalb keine Partikelaggregation wie bei ferromagnetischen Permanentmagneten auf. Beim Vergleich von Magnetisierungskurven ferromagnetischer und superparamagnetischer Partikel kann dieser Effekt betrachtet werden (siehe Abb. 2).

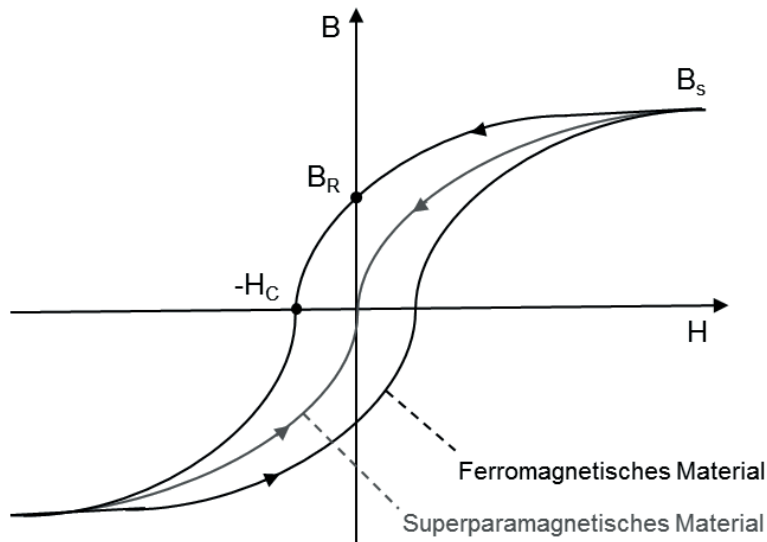


Abb. 2: Magnetisierungskurve ferromagnetischer und superparamagnetischer Materialien vom Ausgangszustand der magnetischen Sättigung [7].

Bei der Verringerung der Feldstärke, ausgehend von einem gesättigten Bereich bis auf den Wert Null, verbleibt bei ferromagnetischen Partikeln eine Remanenz J_R , d. h. die Partikel besitzen weiterhin eine Polarisierung. Erst wenn eine dem ursprünglichen Feld entgegengesetzte Kraft H_C , die Koerzitivfeldstärke, auf die Partikel einwirkt, wird die Magnetisierung auf den Nullwert abgesenkt. Bei superparamagnetischen Magnetpartikeln verbleibt keine Remanenz nach Entfernen des Magnetfeldes. Der Vorgang wird auch Relaxation der Magnetisierung genannt und ist durch die Brownsche Molekularbewegung begünstigt. Dieser Effekt beruht auf der Unterschreitung des kritischen Volumens, ab dem die Multidomänenstruktur nicht mehr energetisch günstig ist. Die einzelnen Spins dieser Partikel ordnen sich in einer einzelnen ferromagnetischen Domäne an. Die Magnetisierung solcher kleiner Partikel kann durch thermische Energie zwischen verschiedenen Richtungen fluktuieren. Dieses Verhalten wird als Superparamagnetismus bezeichnet [8]. Abb. 3 zeigt die Domänen ferromagnetischer Partikel bestehend aus mehreren Domänen und superparamagnetischer Partikel aus je einer Domäne [4, 9].

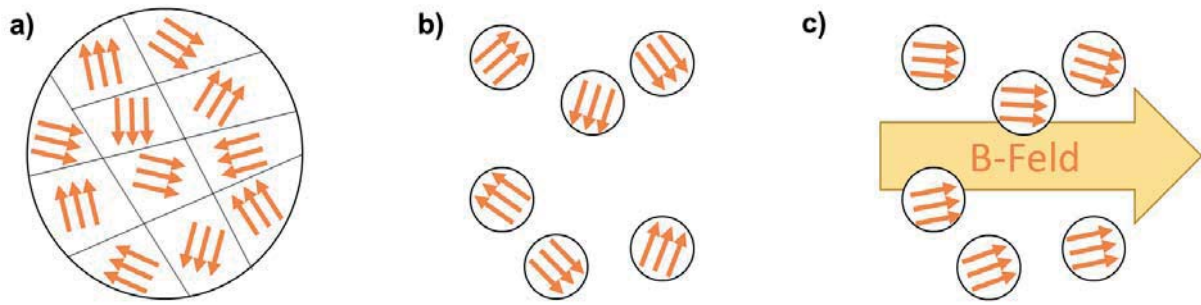


Abb. 3: Schematische Darstellung magnetischer Domänen in a) ferromagnetischen Partikeln bestehend aus mehreren Domänen und b) superparamagnetischen Partikeln bestehend aus jeweils einer Domäne. Beim Anlegen eines Magnetfeldes richten sich die superparamagnetischen Partikel aus, siehe c), verlieren diese Ausrichtung jedoch nach Entfernen des Magnetfeldes wieder [9, 10].

Allerdings besitzen magnetische Partikel aus reinem Magnetit nur eine geringe Sorptionskapazität, neigen aufgrund von van-der-Waals-Kräften zur Agglomeration und eignen sich deshalb in dieser Form nicht als Adsorptionsmittel [11]. Zudem neigt der Werkstoff zur Oxidation, was einen Verlust der Magnetisierbarkeit bedeutet. In den letzten Jahrzehnten wurden deshalb neue Partikel entwickelt, die superparamagnetische Eigenschaften besitzen, aber zudem hohe Bindungskapazitäten erreichen können und gleichzeitig eine Schutzschicht gegenüber Umwelteinflüssen besitzen. Diese Partikel bestehen aus magnetischen Nanopartikeln, meist bestehend aus Magnetit, verteilt in einer sie umhüllenden Matrix aus Polymer. Auf der Matrixoberfläche können funktionelle Gruppen bzw. Liganden für spezifische Anwendungen angebracht werden (siehe Abb. 4). Die funktionellen Gruppen befinden sich auf der Oberfläche, um mit ihrer Umgebung zu interagieren und z. B. eine selektive Aufreinigung von Zielmolekülen zu erreichen.

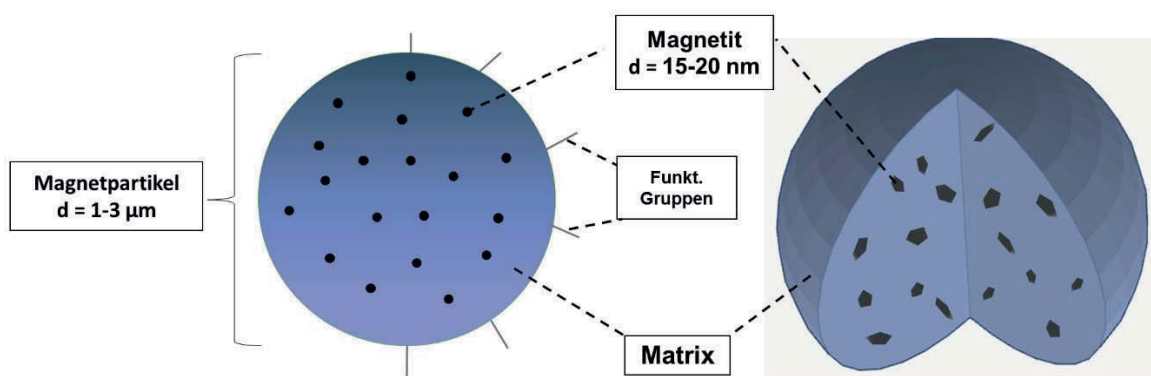


Abb. 4: Schematische Darstellungen von superparamagnetischen Makropartikeln bestehend aus 15-20 nm großen Magnetit-Nanopartikeln in einer sie umgebenden Matrix. Auf der Oberfläche der Matrix befinden sich funktionellen Gruppen wie COOH, NH₂ oder Liganden.

2.1.3 Anwendungsbereiche magnetischer Partikel

Die Anwendung von Magnetpartikeln reicht bis Mitte der 1970er Jahre zurück, als Enzyme auf Magnetpartikel immobilisiert und für die Separation von Biomolekülen eingesetzt wurden [12]. Biotechnologische Hauptanwendungsgebiete sind in der Bioanalytik sowie der Biomedizin zu finden. Als Beispiel können die Isolierung und Aufreinigung von Proteinen [13, 14], die Immobilisierung von Enzymen [13, 14] und der Einsatz in der medizinischen Diagnostik [13] genannt werden.

Ein Vorteil bei der Separation von Biomolekülen liegt in der Selektivität und dem Einsparen von Abtrennungsschritten, da das Zielmolekül direkt aus der Biosuspension, z. B. aus Blut, Fermentationsmedium oder Wasser aufgenommen und damit abgetrennt wird [15]. Die Abtrennung ist im Vergleich zu anderen Separationsmethoden schneller, schonender und weniger aufwendig. Zusätzlich lassen sich Waschschriffe und Pufferwechsel einfach realisieren [14].

In der Medizin werden Magnetpartikel sowohl für die Diagnose als auch zur Therapie eingesetzt. Bei der Hyperthermie, der Wärmebehandlung bei Krebs, wird ein Fluid mit 15 nm großen superparamagnetischen Partikeln mittels einer Kanüle in das Tumorgewebe eingebracht. Die Partikel binden dort aufgrund spezifischer Antikörper an die schädlichen Zellen und können durch Einwirken verschiedener Energiequellen, bspw. einem Magnetfeld, eine Temperaturerhöhung im Gewebe erzeugen. Die Erwärmung führt zum Zelltod des Tumorgewebes, wobei umliegendes Gewebe weitgehend geschont werden kann [16, 17]. Des Weiteren werden superparamagnetische Eisenoxid-Partikel (SPIO) als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt. Die magnetischen Eigenschaften der Partikel beeinflussen die Signalstärke in der MRT, da sie die T_1 - und T_2 -Relaxationszeit verkürzen, also die Zeit, bis ein longitudinales (T_1) oder ein transversales (T_2) Signal detektiert wird. Dies ist für die Bildgebung der MRT bedeutend. Mittlerweile können mit dieser Methode Körperbereiche im Millimeterbereich dargestellt werden [18, 19]. Dadurch wird die Beobachtung und Veränderung krankhafter Gewebe oder Organe ermöglicht. In kontroverser Diskussion steht dabei die Unbedenklichkeit der Magnetpartikel. Zum einen sollen sie über den physiologischen Eisenstoffwechsel langsam wieder ausgeschieden werden [20], zum anderen sind die Risiken der Nanotechnologie noch nicht hinreichend erforscht. Eine weitere Anwendung für die chemische Analyse mit Magnetpartikeln bilden Enzym linked Immunosorbent Assay (ELISA) für verschiedene umweltbelastende Stoffe, z. B. Herbizide wie Cyanazin oder Atrazin [21, 22].

2.1.4 Hochgradienten Magnetseparation

Die Hochgradient-Magnetseparation (HGMS) stellt eine Alternative zu konventionellen Methoden der Proteinaufarbeitung wie Filtration und Chromatographie dar und dient zudem als Prozessintensivierung der Verfahrensschritte Zentrifugation, Chromatographie und Fällung. Mit Hilfe der HGMS können klassische Methoden der Fest-Flüssig-Trennung wie bspw. Sedimentation oder Tiefenfiltration ersetzt werden. Bei der Abtrennung schwach magnetischer Partikel und der Verwendung sehr hoher Feldgradienten wurde der Begriff der Hochgradienten-Magnetseparation von Pfister 1979 geprägt [23]. Das Grundprinzip der HGMS ist in Abb. 5 dargestellt.

Eine mit einer magnetisierbaren Abscheidematrix gefüllte Filterkammer wird in den Einflussbereich eines Magnetfelds gebracht. Die in der Abbildung durch einen Drahtquerschnitt dargestellte Abtrennmatrix, die aus Stahlwolle, Drähten oder perforierten Scheiben bestehen kann, bündelt das außen vorliegende Magnetfeld und schafft für ferro- und paramagnetische Partikel Bereiche mit starker Anziehungskraft. Nachdem sich die Partikel an die Abtrennmatrix angelagert haben, wird die partikelfreie Suspension aus der Filterkammer ausgespült. Anschließend kann ein neuer Abtrennzyklus erfolgen [4].

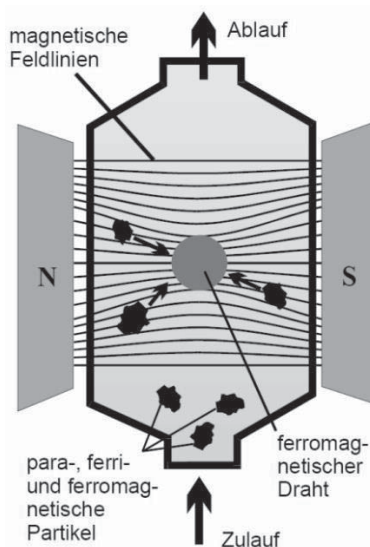


Abb. 5: Prinzip der Hochgradienten-Magnetseparation nach Franzreb [4].

Für bisherige Anwendungen im Maßstab 1 - 5 L wurde der Hochgradienten-Magnetfilter Steinert HGF-10 verwendet. Bei diesem wird ein Permanentmagnet im Inneren eines Hufeisenmagneten ausgerichtet, damit die Magnetkräfte auf eine Trennkammer im Joch des Hufeisenmagneten wirken. Aufgrund der hohen Gradienten an den Drähten entstehen starke Magnetkräfte an den Gittern [24]. Zur besseren Ablösung der Partikel von den Gittern während des Spülvorgangs kann der Filter an seiner Halterung pneumatisch oder mechanisch geklopft werden. Der Aufbau des HGF-10 ist in Abb. 6 dargestellt.