

Bericht zum MBFST-Forschungsvorhaben FKZ 2371:

Adsorption von Proteinen an partikulären Trägern

Abstract

Bei der Abtrennung und Aufreinigung rekombinanter Proteine spielt die Ionenaustauschchromatographie eine maßgebliche Rolle. Untersucht wurden an Modellproteinen mit unterschiedlicher Größe und Ladungsverteilung die Adsorptions- und Desorptionsgleichgewichte, wobei speziell die Pufferart systematisch variiert wurde. Dabei ergaben sich unerwartet drastische Effekte auf die Gleichgewichtslage der Adsorption, die für die Optimierung technischer Trennprozesse von erheblicher Bedeutung sind.

Einleitung

Ein wesentliches Aufgabenfeld der heutigen Biotechnologie ist die Produktion von Biokatalysatoren und Therapeutika. Bei diesen Produkten handelt es sich hauptsächlich um Proteine, die mittels rekombinanter Organismen hergestellt werden. Ein biotechnologischer Produktionsprozess umfasst nach erfolgter Fermentation zahlreiche Aufarbeitungsschritte, die abhängig von den jeweiligen Reinheitsanforderungen an das produzierte Protein 40–90% der gesamten Produktionskosten ausmachen.

Bei der Herstellung rekombinanter Proteine kommt somit der Produktisolierung und –aufreinigung eine erhebliche wirtschaftliche Bedeutung zu. Aufarbeitungsrouten sind üblicherweise durch zahlreiche Trenn- und Arbeitsschritte charakterisiert. In allen Aufarbeitungsstrategien für Proteine spielen chromatographische Trennprozesse eine zentrale Rolle, sowohl beim direkten Capture des gewünschten Proteins im expandierten Festbett als auch bei der Feinreinigung unter Ausnutzung seiner Oberflächeneigenschaften (Ladung, Hydrophobizität) oder biospezifischer Wechselwirkungen. Die chromatographische Reinigung soll möglichst selektiv und schonend für das Zielprotein erfolgen, wobei eine hohe Wiederfindung bei möglichst hoher Reinheit angestrebt wird.

Basis der chromatographischen Trennverfahren stellen die reversiblen bzw. durch Änderung der Umgebungsbedingungen variierbaren Adsorptions-/Desorptionsgleichgewichte an geeigneten Trägermaterialien dar. Bei der Proteintrennung werden besonders elektrostatische Wechselwirkungen unter Verwendung von Ionenaustauschern genutzt. Dabei treten außerordentlich komplexe Gleichgewichte auf, die durch konkurrierende Adsorption von Proteinen und Komponenten des Puffersystems um Adsorberplätze hervorgerufen werden, sowie durch Wechselwirkungen zwischen Protein- und Pufferkomponenten.

Die Ionenaustauscherchromatographie wird industriell am häufigsten eingesetzt, was in der flexiblen Einsetzbarkeit der Methode, dem relativ niedrigen Preis und der großen behördlichen Akzeptanz begründet ist. Die auftretenden Sorptionsgleichgewichte unterliegen allerdings einer Vielzahl von Einflussfaktoren, die in proteinspezifische Eigenschaften, Adsorbereigenschaften und einstellbare Prozessparameter (Milieubedingungen) eingeteilt werden können.

Aufgabenstellung

Zu den wichtigsten proteinspezifischen Eigenschaften zählen Proteingröße (Molekulargewicht), Isoelektrischer Punkt (Nettoladung), Oberflächenstruktur und -ladung sowie evtl. auftretende Konformationsänderungen des Proteins. Die Arbeiten beschränken sich auf die Ionenaustauschchromatographie, so dass pI und Oberflächenladung im Vordergrund des Interesses standen, wobei sich zur Darstellung der Oberflächenladung dreidimensionale Strukturen errechnen lassen (Molecular Modelling). Bei den einstellbaren Prozessparametern wurden vornehmlich pH-Wert, Temperatur sowie speziell Art und Ionenstärke des Sorptionspuffers zu nennen. Für die Adsorptionsexperimente war die Variation der Pufferart vorrangig, da zu diesem Thema publiziertes Fachwissen fehlte.

Untersuchungsumfang

Der Einfluss von Größe und Oberflächeneigenschaften eines Proteins wurde durch Einsatz von drei Modellproteinen mit einem nahezu identischen Isoelektrischen Punkt in einem Anionenaustauschersystem bei pH 7 untersucht. Ein viertes Protein diente zusammen mit einem Kationenaustauscher als Referenz. Die Proteinkonformation ist bei der Ionenaustauschchromatographie als nahezu konstant anzusehen. Die ausgewählten Proteine und die eingesetzten Träger sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Protein	pI	M	Adsorbens
Ovalbumin (OVA)	4,6	45kD	DEAE-Sepharose
Rinderserumalbumin (BSA)	4,7	67kD	DEAE-Sepharose
Katalase (CAT)	5,4	220 kD	DEAE-Sepharose
Lysozym (LYS)	11	14kD	SP-Sepharose

Jedes Protein wurde mit fünf verschiedenen, in der Proteinchemie gebräuchlichen Puffern in identischen Konzentrationen bei konstantem pH-Wert und konstanter Temperatur in Batch-Experimenten untersucht. Bei den Desorptionsexperimenten wurde zusätzlich zu der

Pufferart noch die Ionenstärke des Elutionspuffers, realisiert durch unterschiedliche NaCl-Konzentrationen, variiert.

Somit entstand eine Versuchsmatrix, in der, anders als bei bis dato in der Fachliteratur publizierten Versuchsansätzen, bewusst jeweils nur eine Einflussgröße variiert und für diese eine hohe Datendichte erzeugt wurde. Bei den Adsorptionsversuchen wurden drei Proteine mit fünf Puffern jeweils einzeln kombiniert, bei den Desorptionsversuchen drei Proteine mit fünf Puffern in jeweils fünf verschiedenen Ionenstärken. Das vierte Protein diente mit dem zweiten Ionenaustauscher als Referenzsystem zum stichprobenartigen Vergleich der im Hauptsystem erhaltenen Ergebnisse. Zudem wurden alle erhaltenen Ergebnisse auf die Anwendbarkeit von gängigen Modellen zur Proteinadsorption (Langmuir, Multilayer-Langmuir, Freundlich) untersucht.

Ergebnisse

Die bei den Adsorptionsexperimenten erhaltenen Isothermen unterscheiden sich sowohl in ihrer maximalen Kapazität, in ihrer Affinität in Abhängigkeit vom verwendeten Protein als auch überraschenderweise drastisch vom eingesetzten Puffer (Abb. 1).

Bei Verwendung desselben Proteins und unter Variation der Puffer ergibt sich eine klare Rangfolge der erhaltenen Isothermen in Abhängigkeit von der Ionenstärke des eingesetzten

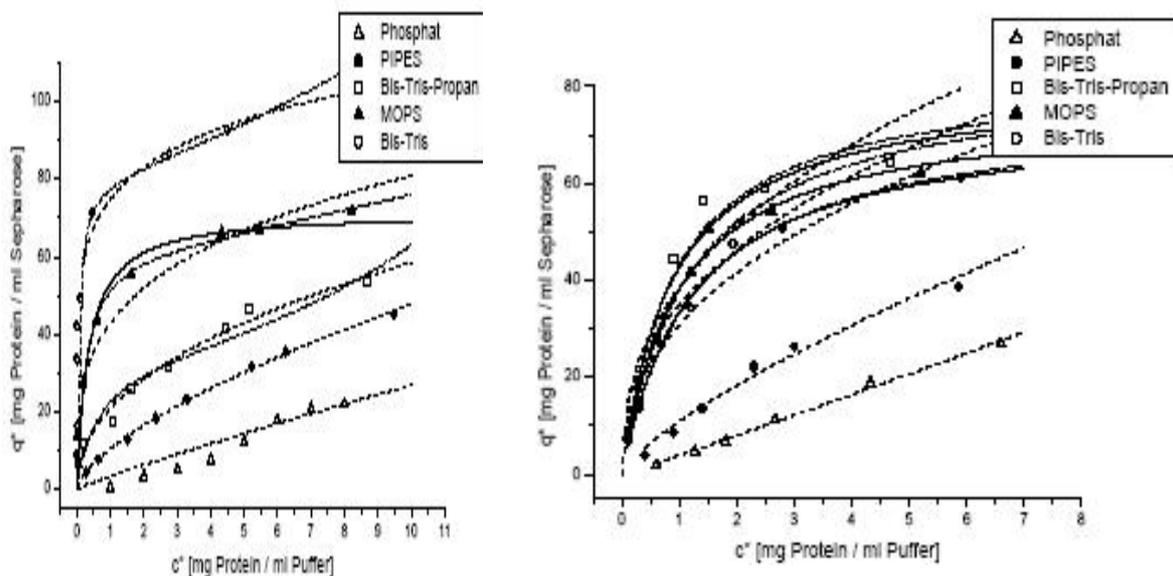


Abb. 1: Adsorptionsisothermen in unterschiedlichen Puffern bei pH7, links: OVA; rechts: CAT

Puffern. Diese kann allerdings nicht vereinfachend als eingesetzte Pufferkonzentration angenommen werden, wie dies in der Fachliteratur vielfach geschehen ist. Vielmehr müssen die Dissoziationsgleichgewichte zwischen ladungsneutralen Puffermolekülen und den

korrespondierenden Ionenspecies entsprechender Valenz berücksichtigt werden, die durch den eingestellten pH-Wert der Pufferlösung vorgegeben sind. Die Isothermen unterscheiden sich bezüglich Maximalkapazität und Affinität um maximal das dreifache, beeinflusst durch Ladungsvorzeichen, Valenz und Konzentration in dieser Reihenfolge. Diese großen quantitativen Unterschiede lassen sich nicht durch konkurrierende Adsorption von Puffermolekülen und Protein erklären, da zum einen die Mengenverhältnisse an Pufferionen in keiner Relation zum beobachteten Effekt stehen und zum anderen durch Leitfähigkeitsmessungen keine signifikanten Änderungen in der Ionenkonzentration festgestellt wurden. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass durch Pufferionen vermittelte Protein-Protein-Interaktionen eine große Rolle spielen.

Die durch den Einsatz desselben Puffers und unterschiedlicher Proteine erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die Oberflächeneigenschaften des Proteins entscheidender für Verlauf und Lage der Adsorptionsisothermen sind als die Proteingröße. Unter Oberflächeneigenschaften ist hier insbesondere das lokale Oberflächenpotential zu verstehen, was an Stellen besonders hoher Potentialdichte zur Ausbildung von gut geeigneten Bindungsplätzen führt, sowie deren räumlicher Anordnung auf der Proteinoberfläche. So können zwei starke Bindungsplätze, die sich auf der Proteinoberfläche gegenüberliegen, einen wesentlich größeren Einfluss auf die Affinität/maximale Kapazität haben, als eine Größendifferenz von über 20 kD. Durch Molecular Modelling ist es möglich, wertvolle Informationen über die Ladungsverteilung an der Proteinoberfläche zu erhalten. Abb. 2 zeigt Ergebnisse solcher Berechnungen für pH 7. Es wird sofort deutlich, dass Ovalbumin (OVA) aufgrund seines hohen negativen Potentials im Vergleich zur Katalase (CAT) mit geringer Ladung (insbes. fast gleichförmig verteilten positiven und negativen Ladungen, s. Abb. 2) trotz seiner hohen Molekularmasse erheblich geringere Adsorptionskapazität am eingesetzten Anionenaustauscher erwarten lässt. Klar erkenntlich ist auch, dass Lysozym aufgrund seines hohen pI-Werts bei pH 7 nur über einen Kationenaustauscher abgetrennt werden kann. Leider sind die Methoden des Molecular Modelling von komplexen Biomolekülen noch nicht so weit fortgeschritten, dass der Einfluss des Puffers auf die Oberflächenladungsdichte sowie Protein-Carrier- und Protein-Protein-Wechselwirkungen erfassbar sind. Trotzdem geben die in Abb. 2 dargestellten Oberflächenladungsdichten, die in Abhängigkeit vom pH-Wert berechenbar sind, wertvolle Hinweise für die Interpretation von Proteinadsorptionsdaten.

Sämtliche Adsorptionsisothermen lassen sich am besten durch das Freundlich-Modell beschreiben, in dem qualitative Unterschiede in den Adsorbereigenschaften in Abhängigkeit von der bereits erfolgten Beladung berücksichtigt sind. Bei Proteinen mittlerer Größe (50-100 kD), deren Durchmesser dem vierten bis fünften Teil des mittleren Porendurchmessers

entspricht, ist der Unterschied der erhaltenen Isothermen in Abhängigkeit vom verwendeten Puffer größer als bei sehr kleinen bzw. sehr großen Proteinen.

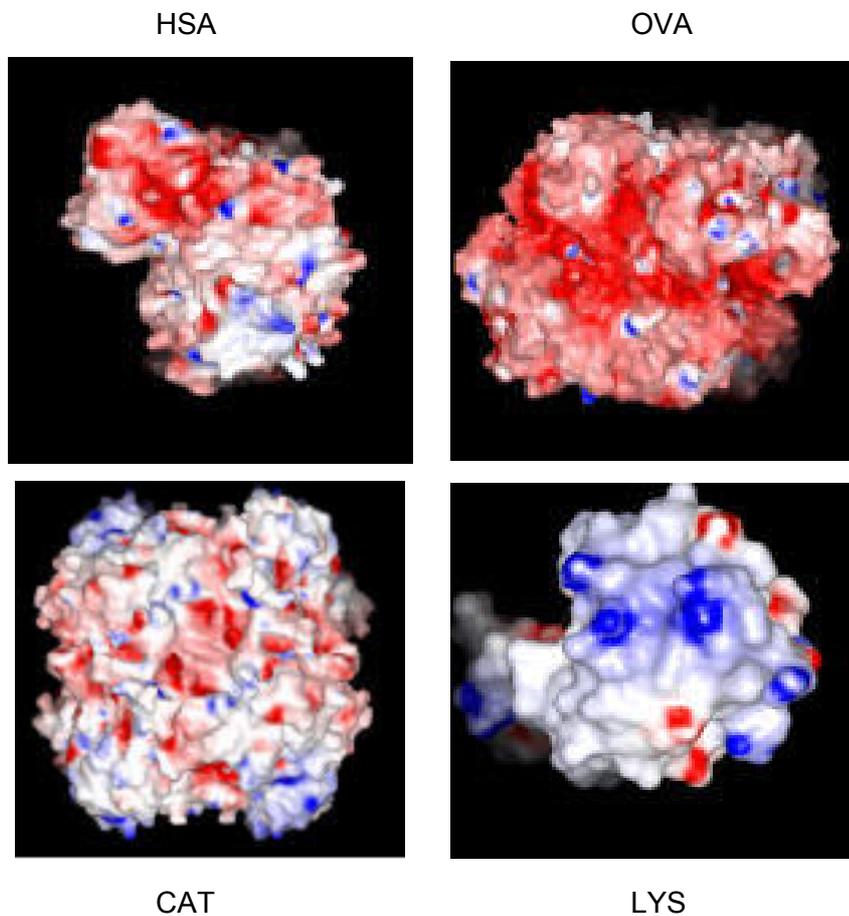


Abb. 2: Oberflächenstruktur und –potential der eingesetzten Proteine.

Rot: negatives Potential, Blau: positives Potential, Weiß: neutral.

Bei den Desorptionsexperimenten ergeben sich sehr ähnlich verlaufende, parallel zur Abszisse verschobene Isothermen, deren Lage von der eingesetzten Salzkonzentration des Elutionspuffers und der Eingangsbeladung abhängig ist (Abb. 3). Somit zeigen die erhaltenen Desorptionsisothermen eine ähnliche Affinität zwischen Protein und stationärer Phase, aber nahezu keine Abhängigkeit von der verwendeten Pufferart. Dies erklärt sich dadurch, dass während des ersten Elutionsschrittes, bedingt durch den plötzlichen Überschuss an Chlorid-Ionen, bereits bis zu 80% der desorbierbaren Proteinmenge eluiert werden. Nach 6 -10 Desorptionsschritten ist keine detektierbare Proteinmenge mehr von der

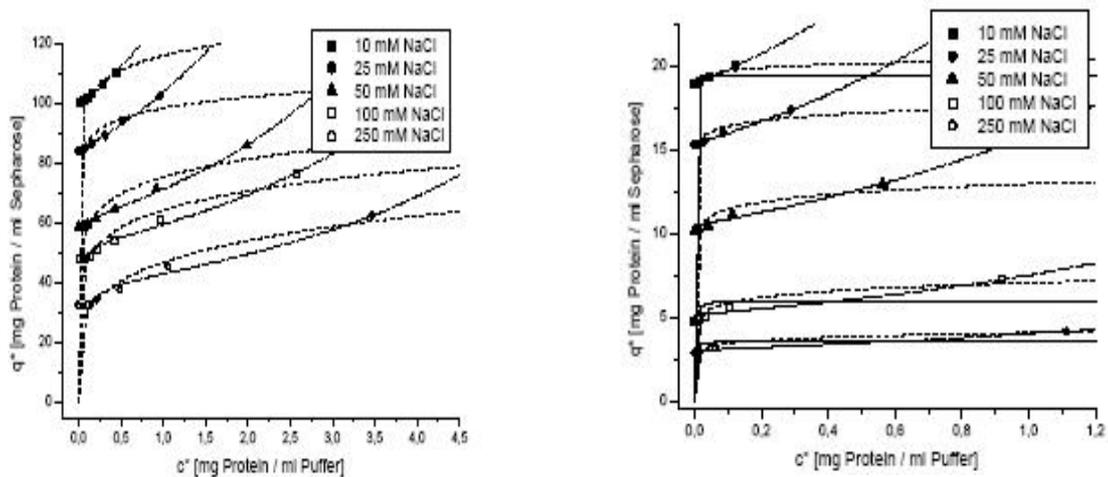


Abb. 3: Desorptionsisothermen in 20 mM Bis-Tris-Puffer bei pH 7, links: BSA, Ausgangsbeladung 118,5 mg/ml, rechts OVA, Ausgangsbeladung 94 mg/ml

stationären Phase zu lösen, die verbleibende Restbeladung ist von der Ionenstärke des Elutionspuffers abhängig. Die Isothermen lassen sich am besten durch das Multilayer-langmuir-Modell beschreiben.

Unsere Ergebnisse machen erstmal deutlich, dass der Auswahl des Puffers bei der Adsorption und damit chromatischen Trennprozessen erhebliche Bedeutung zukommt. Systematische Untersuchungen in der von uns durchgeführten Art sind bisher nicht bekannt. Diese beziehen sich natürlich nur auf singuläre Proteine, die Situation wird bei Vorliegen von Proteingemischen und von Zellbruchstücken (bei der Expanded Bed Chromatography) noch erheblich komplexer. Voraussetzung für das Verständnis konkurrierender Adsorptionsprozesse sind aber unbedingt quantitative Daten über die Adsorption der Einzelkomponenten. Die Ergebnisse zeigen, dass für chromatographische Trennungen noch ein hohes Entwicklungspotential allein durch die Auswahl des Puffers vorliegt. Die Übernahme von Protokollen aus biochemischen/molekularbiologischen Labors kann nicht empfohlen werden, wenn der Puffereinfluss nicht systematisch bearbeitet wurde. Das gleiche gilt für die Desorption bzw. Elution. Insgesamt ist allein hier durch gezielte Voruntersuchungen eine erhebliche technisch-wirtschaftliche Prozessverbesserung zu erreichen.