

Topologisch-selektive Chromatographie zur Studie der Superspiralisierung von Plasmiden während einer Fermentation und Isolierung einzelner Topoisomere**

Marek Mahut, Elisabeth Haller, Parisa Ghazidezfuli, Michael Leitner, Andreas Ebner, Peter Hinterdorfer, Wolfgang Lindner und Michael Lämmerhofer*

Plasmid-DNA (pDNA) hat ein großes Potenzial für den Einsatz in der Gentherapie und DNA-Vakzinierung, und aus diesem Grund genießt die biotechnologische Produktion dieser neuen Medikamentengruppe sehr viel Aufmerksamkeit. Hier präsentieren wir eine einzigartige Methode der Flüssigchromatographie für die Trennung von Topoisomeren der geschlossen-zirkulären (ccc) Plasmid-DNA, welche von der US-amerikanischen Food and Drug Administration therapeutisch als die am meisten aktive Form angesehen wird.^[1] Die Trennung beruht auf an Siliciumdioxidträgern immobilisierten Chinincarbamat-Liganden und vermag die ccc-Form der pDNA in ein normalverteiltes Muster aus diskreten und schmalen Peaks aufzuspalten. Die Verwindungszahl als Maß für die absolute Superspiralisierung dieser einzelnen Topoisomere, die aus dem HPLC-Eluat isoliert wurden, konnte durch Kapillargelektrophorese bestimmt werden. Eine entsprechende Analyse von gesammelten Proben der In-Prozess-Kontrolle zeigte deutlich eine Änderung der Topoisomerenmuster während der Fermentation. In Kombination mit der hohen Beladbarkeit von Chinincarbamatsäulen eignet sich die hier beschriebene Methode auch zur präparativen Isolierung von Topoisomeren mit einem bestimmten Grad an Superspiralisierung.

Die natürliche ccc-Isoform ist eine Mischung aus mehreren Topoisomeren, wobei jedes einen anderen Grad an Superspiralisierung aufweist. DNA-Superspiralisierung wird

mathematisch als die Differenz $\Delta L k$ in der Verwindungszahl zwischen dem zu bestimmenden Topoisomer i und dem relaxierten Zustand $L k_0$ beschrieben. Die Verwindungszahl $L k_i$ ist eine ganze Zahl, welche durch mechanische Verformung des Moleküls nicht verändert werden kann.^[2] $L k_0$ ist der Quotient der Plasmidgröße, angegeben in N , der Zahl an Basenpaaren, und h , der Zahl an Basenpaaren (bp) pro volle Helixwindung. Unter Standardbedingungen (0.2 M NaCl, pH 7, 37 °C),^[3] wird dafür der Betrag von 10.5 Basenpaaren pro Windung genommen (h^0), und es gilt $L k_0 = N/h^0$ (für eine gegebene pDNA mit 4896 bp wird $L k_0$ zu 466). Geometrisch wird die Superspiralisierung durch zwei Größen beschrieben: die Windungszahl der Superhelix („Writhe“, bezeichnet die Spiralisierung der Helixachse) und die Windungszahl der Helix („Twist“, bezeichnet die Verdrehung der DNA-Stränge zueinander). Für eine erfolgreiche Trennstrategie ist es notwendig, entweder die Superhelixwindungen (Writhe) selbst zu erkennen, oder den Abstand zwischen benachbarten Basenpaaren in Anlehnung an furchenbindende Moleküle, oder weiterhin den Abstand zwischen benachbarten Nukleobasen wie im Fall von Interkalatoren. Die beiden letzten Ansätze würden einen unterschiedlichen Twist erkennen.

Weil für die Writhe-Erkennung intuitiv ein großer Selektor nötig wäre, Interkalatoren aber langsame Bindungs- und Dissoziationsprozesse eingehen,^[4] was zu breiten Peaks führt,^[5] haben wir uns für einen niedermolekularen Selektor entschieden, der benachbarte Strukturen in der DNA-Furche erkennen könnte. Aus diesem Grund wählten wir einen Chinincarbamat-Selektor, bei dem der Abstand zwischen dem tertiären Amin des Chinuclidin-Ringsystems und der Carbamatgruppe einige DNA-Furchen-bindende Moleküle nachahmt,^[6] deren Bindungsmechanismus gut charakterisiert ist.^[7] Zusätzlich zu dieser geometrischen Unterscheidung liefert das Heteroaren zusätzliche konformativ Stabilität, wie durch unsere früheren Studien gezeigt werden konnte.^[8] Die stationäre Phase mit dem beschriebenen Selektor ist in Abbildung 1a gezeigt.

Freies Chinin ist zu einer interkalativen Bindung befähigt;^[9] aus diesem Grund war es von Interesse, ob der Chinincarbamat-Selektor ebenfalls als Interkalator agieren und damit auch die Größen Twist und Writhe verändern kann, was den Trennprozess entscheidend stören könnte. Während der Aufnahme von rasterkraftmikroskopischen Bildern (AFM) von hochkondensierter pDNA anhand unseres früheren Protokolls,^[10] wurde die Form der pDNA-Partikel nach Zugabe von *n*-Butylcarbamoylchinin, welche den chromatographischen Selektor nachahmen soll, nicht verändert. Al-

[*] Dr. M. Mahut, Mag. E. Haller, Mag. P. Ghazidezfuli, Prof. W. Lindner, Prof. M. Lämmerhofer

Institut für Analytische Chemie
Universität Wien, Währinger Straße 38, 1090 Wien (Österreich)
E-Mail: Michael.Laemmerhofer@univie.ac.at

Dipl.-Ing. M. Leitner, Dr. A. Ebner, Prof. P. Hinterdorfer
Institut für Biophysik, Johannes-Kepler-Universität
Altenbergerstraße 69, 4040 Linz (Österreich)

Prof. P. Hinterdorfer
Center for Advanced Bioanalysis (CBL)
Gruberstraße 40–42, 4040 Linz (Österreich)

Prof. M. Lämmerhofer
Neue Adresse: Pharmazeutisches Institut, Universität Tübingen,
Auf der Morgenstelle 8, 72070 Tübingen (Deutschland)

[**] Wir sind sehr dankbar für die finanzielle Unterstützung durch Boehringer-Ingelheim RCV (Wien, Österreich) und für die Bereitstellung der Plasmide und Fermentationsproben. Wir möchten uns weiterhin bei Andreas Reininger für seine Hilfe bei den AFM-Aufnahmen bedanken.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106495> zu finden.

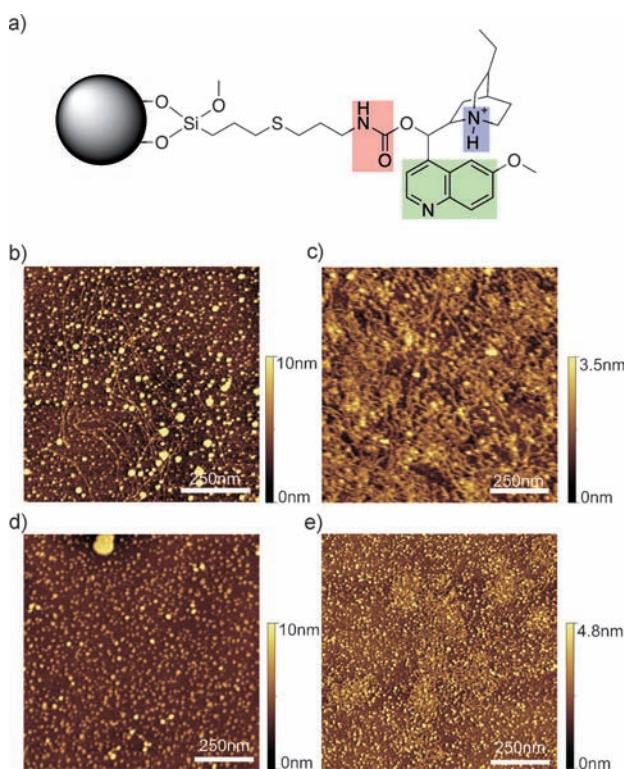


Abbildung 1. a) Der über eine Thioetherbrücke an Siliciumdioxid geknüpfte Chinincarbamat(QC)-Ligand, der in dieser Studie für die topologisch-selektive Chromatographie angewendet wurde. AFM-Bilder des stark kompaktierten pMCP1-Plasmids, aufgenommen in flüssiger Phase auf einer APTES-Glimmer-Oberfläche. Nach Zugabe des Interkalators Chloroquin (CLQ) begannen sich die Plasmid-Nanopartikel zu entspannen (b); 10 min nach CLQ-Zugabe), bis die Mehrheit der Doppelstränge sichtbar war (c); 30 min nach CLQ-Zugabe). Nach Zugabe von QC war keine makroskopische Änderung erkennbar (d); 30 min nach QC-Zugabe). Gab man jedoch anschließend CLQ zu, entspannten sich die Plasmide wieder (e); 20 min nach Zugabe von CLQ).

lerdings entspannten sich die Partikel sehr wohl nach Zugabe des Interkalators Chloroquin zur gleichen Lösung, was auf ein anderes Verhalten des Chinincarbamat-Moleküls deutet (Abbildung 1). Dessen Bindungsmechanismus ähnelt daher mehr dem von furchenbindenden Molekülen, welche die DNA-Konformation aus einer makroskopischen Sichtweise nicht bedeutend verändern.

Eine chromatographische Trennung von verschiedenen Plasmiden unterschiedlichen Ursprungs ist in Abbildung 2a–f gezeigt, wobei jeder Peak einem einzelnen Topoisomeren in seiner nativen Form zuzuordnen ist. Solche Topoisomerenmuster konnten bislang nur mit elektrophoretischen Techniken aufgenommen werden.^[11] Obwohl eine Antrennung von niedrig-superspiralisierten Topoisomeren an RP-18-Säulen gezeigt wurde,^[12] handelte es sich dabei um keine gezielte Selektivität, und es konnte auch keine Trennung zwischen nativen Topoisomeren erreicht werden. Demzufolge wird hier die erste chromatographische Trennung einer natürlichen Topoisomerverteilung präsentiert. Wir bezeichnen die vorgestellte Methode kurz als „topologische Analyse“, weisen aber darauf hin, dass auch andere Autoren diesen oder einen ähnlichen Begriff für die Auf trennung der Isoformen ver-

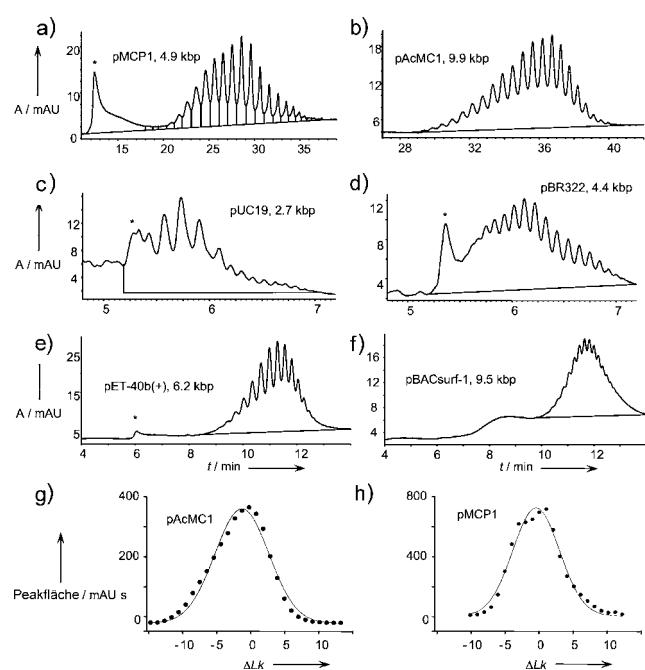


Abbildung 2. Trennung verschiedener nichtkommerzieller (a, b) und kommerzieller Plasmide (c–f) auf der stationären Phase aus Abbildung 1a. Die ccc-Isoformen aller Plasmide konnten erfolgreich in ihre Topoisomere aufgetrennt werden, was die allgemeine Anwendbarkeit dieser Methode demonstriert. Die offen-zirkuläre Isoform ist mit einem Stern markiert. In x, y-Diagrammen sind benachbarte Peakflächen von Topoisomeren gegen ihre Verwindungszahl in Bezug auf das häufigste Topoisomeren aufgetragen – beim Plasmid pMCP1 (g) wurden Daten aus (a), beim Plasmid pAcMC1 (h) wurden Daten aus (b) verwendet. Das häufigste Topoisomeren wurde willkürlich zu $\Delta Lk = 0$ gesetzt. Die durchgezogene Linie ist die angepasste Gauß-Funktion (siehe Text; $R^2 = 0.989$ bzw. 0.990). „A“ steht für Absorption gemessen bei 258 nm, „mAU“ steht für Milli-Absorptionseinheiten.

wenden, also die Trennung zwischen linearer, offen-zirkulärer und der geschlossen-zirkulären Isoform in ihrer Gesamtheit, welche allerdings keine Topoisomere sind.

Um die Identität der getrennten Spezies zu bestätigen, wurden sowohl für das pMCP1- als auch das pAcMC1-Plasmid mit 4.9 bzw. 9.9 Kilobasenpaaren (kbp) die Peakflächen benachbarter Peaks in der Elutionsreihenfolge in einem x, y-Diagramm dargestellt. An die erhaltenen Histogramme wurde unter Verwendung von Gleichung (1) eine Gauß'sche Verteilungskurve mit den Variablen a , b und x_0 angepasst (Abbildung 2g und h).

$$f(x) = a \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{x - x_0}{b} \right)^2 \right] \quad (1)$$

x_0 ist die kleine Winkel auslenkung,^[13] und es gilt $-0.5 < x_0 < +0.5$. Die Ausgleichskurven korrelieren mit den gemessenen Daten sehr gut, was eine Maxwell-Boltzmann-Verteilung der Peakflächen bestätigt und sich insofern rationalisieren lässt, als dass die Unterschiede in der Freien Energie der einzelnen Topoisomere gering sind, was folglich zu ähnlichen Wahrscheinlichkeiten ihres Vorliegens führt. Im Allgemeinen fügt der Prozess der Superspiralisierung einem Molekül eine Torsionsspannung zu, daher ist die Freie Ener-

gie von superspiralisierten Topoisomeren im Vergleich zur entspannten pDNA zwingend höher und daher energetisch ungünstiger.

Anschließend wurden einzelne Topoisomere isoliert, in dem Eluate nach der UV-Detektorzelle gesammelt wurden. Nach dem Einengen im Stickstoffstrom und anschließender Dialyse, um den Großteil von Salzen zu entfernen, wurden die Eluate unter identischen Bedingungen erneut chromatographiert. Die Eluate lieferten dabei einzelne diskrete Peaks, wobei deren Retentionszeit mit der Zeit, an der die Eluate gesammelt wurden, übereinstimmte. In Abbildung 3 wird

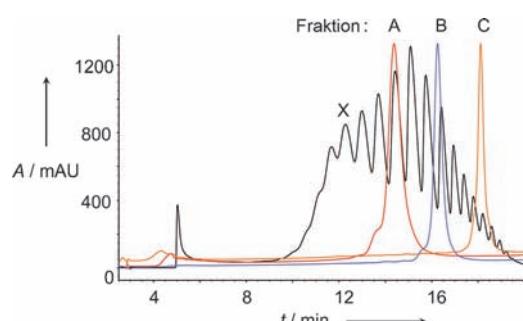


Abbildung 3. Chromatogramm eines semipräparativen Laufs nach Injektion von 285 µg pMCP1 auf eine topologisch-selektive Säule, bei dem vier verschiedene Fraktionen gesammelt wurden. Die Fraktionen A, B und C wurde einzeln erneut injiziert, und die entsprechenden Chromatogramme sind farbig dargestellt (nur y-Achsen wurden normiert). Fraktion X wurde für Bestimmung der Verwindungszahl verwendet.

eine Überlagerung von chromatographischen Läufen einer präparativen Injektion von ccc-pDNA sowie drei isolierten Fraktionen gezeigt. Die Elutionsreihenfolge ist umgekehrt zur Elektrophorese, was durch Analyse der einzelnen Fraktionen durch Kapillargelelektrophorese gezeigt wurde (siehe die Hintergrundinformationen). Um die getrennten Topoisomere vollständig zu charakterisieren, wurde die Windungszahl der Superhelix und damit die absolute Verwindungszahl der Fraktion X aus Abbildung 3 bestimmt. Mithilfe der Methode von Keller^[14] wurde gezeigt, dass für das Topoisomer in der Fraktion X $\Delta Lk = -26 \pm 2$ gilt. Berücksichtigt man nun das Chromatogramm in Abbildung 3 und die Regel, dass höher superspiralisierte Topoisomere später eluieren, müssen folglich die Fraktionen A bis C folgende Zahl an negativen Superhelixwindungen aufweisen: 29 ± 2 (A), 32 ± 2 (B), 36 ± 2 (C). Weiterhin kann abgeleitet werden, dass der Mittelwert der Topoisomerenverteilung in der natürlichen Probe des pMCP1-Plasmids ein Topoisomer mit einer Differenz der Verwindungszahl ΔLk von -30 ± 2 ist, was einer Superhelixdichte von -0.06 entspricht, was als mittlerer Wert bei natürlichen Plasmiden angenommen wird.^[15] Konventionsgemäß beträgt der Bestimmungsfehler der Verwindungszahl die Anzahl der für die Bestimmung verwendeten Gele, d.h. zwei in diesem Fall (siehe die Hintergrundinformationen).

Sobald ein solches Topoisomer für ein bestimmtes Plasmid charakterisiert ist, kann es als Referenzpunkt für zukünftige Messungen verwendet werden. Semipräparative

Läufe auf analytischen Säulen zeigten eine exzellente Beladbarkeit, da bei einer Injektion von 285 µg pDNA auf einer 120 × 4.0-mm-Säule mit einer 5 µm porösen (120 Å) statio-nären Phase keine Überladungssphänomene auftraten (Abbildung 3). Daher können ausreichende Mengen sowohl für analytische Zwecke oder auch als einzelne Topoisomer-Standards für Behörden in kurzer Zeit produziert werden.

Die gültigen Richtlinien an die Industrie von der US-amerikanischen FDA empfehlen die Überwachung von anderen Isoformen (linear, offen-zirkulär), RNA, Proteinen sowie anderen potenziell schädlichen organischen Verbin-dungen im Endprodukt. In der Pharma industrie werden große Mengen an pDNA üblicherweise in großen Fermen-toren mithilfe von *E. coli* produziert, wobei die Plasmide im Rahmen des „Upstream“-Prozesses vervielfältigt werden, um dann während des „Downstream“-Prozesses (bestehend aus mehreren Aufschluss- und Reinigungsverfahren) in reiner Form gewonnen zu werden.^[16] Proben aus Fermentations-prozessen des pMCP1-Plasmids, sowie dessen Variante pMCP1-3.5 (3.5 kbp) ohne des Antibiotikum-Resistenzgens, wurden direkt einer topologischen Analyse unterzogen. Aufgrund der hohen Kontamination der aufgeschlossenen Zellmassen mit RNA, genomischer DNA und zellulären Proteinen wurde eine zweidimensionale HPLC-Methode aufgesetzt, wobei pDNA in der ersten Dimension durch Größenausschlusschromatographie (SEC) an einer SEC-Säule mit porösem Siliciumdioxid-Material (1000 Å) isoliert wurde. Die nach 2 min eluierende pDNA-Masse wurde auf die topologisch-selektive Säule transferiert (siehe die Hin-tergrundinformationen).

Die serielle Injektion aller Fermentationsproben der In-Prozess-Kontrolle ermöglicht einen direkten Vergleich der Peakmuster durch das Übereinanderlegen der Chromato-gramme (Abbildung 4 a). In dieser Darstellung ist der Peak mit der größten Fläche in der Verteilung ein guter Schätzwert für den mittleren Superspiralisierungsgrad zur Zeit der Probenahme, deshalb wurde dessen Position gegen die Fermentationsdauer aufgetragen. Dabei wurde eine beachtliche Veränderung der Topologie während der Fermentation in beiden Fällen festgestellt. Die Superspiralisierung des kleinen Plasmids verringerte sich in den ersten Stunden („lag“-Phase) sehr stark im Vergleich zum Anfangszustand, was sich auch in der früheren Elution widerspiegelt, wobei sich der Zustand danach eingependelt (Abbildung 4 b). Das pMCP1-Plasmid wies dagegen ein anderes Verhalten auf, da der Anfangs- und der Endzustand sehr ähnlich sind, jedoch während des Prozesses beträchtliche Sprünge aufgetreten sind (Abbil-dung 4 c). Das zeigt, dass der Grad der Plasmid-Superspirali-sierung innerhalb der Zelle auf die Fermentationsbedin-gungen unterschiedlich reagieren kann, und interessanter-weise kann dieser zwischen der anfänglichen bakteriellen Kultur und dem Endprodukt stark variieren. Diese Topolo-gieänderung ist wahrscheinlich mit dem Zellalterungsprozess oder der Zahl an Zellteilungen verbunden. Ein circadianer Rhythmus, der für das Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* auf der Grundlage von Agarose-Gelektrophorese mit Chloroquin-Zusatz beschrieben wurde,^[17] kann mögli-cherweise die festgestellten Trends überlagern. Wie erwartet, kam es zu keiner Änderung der Superspiralisierung während

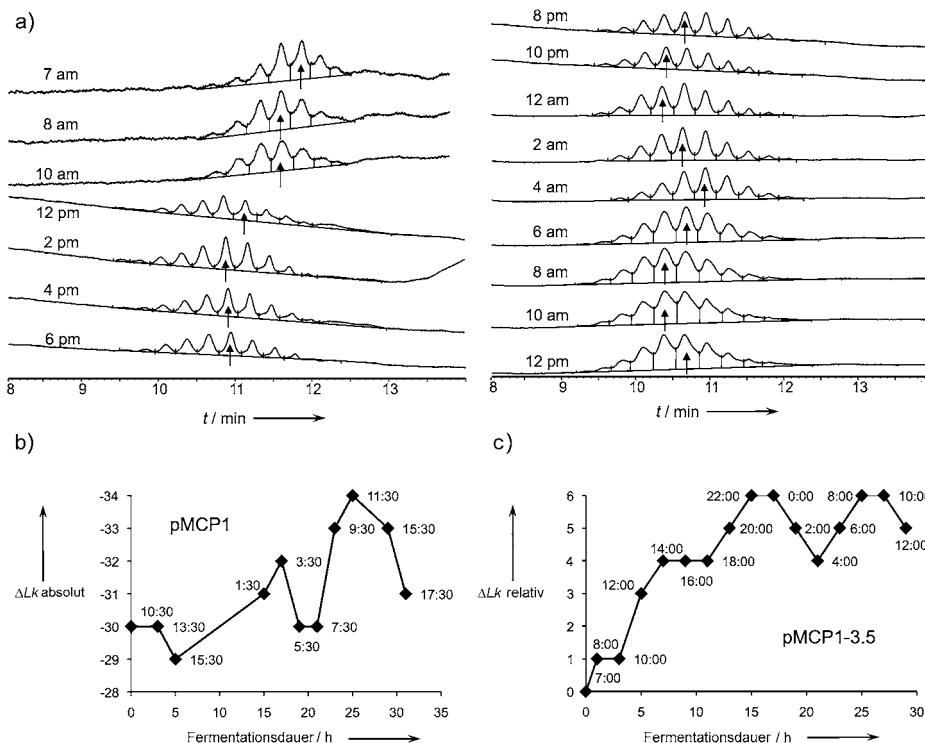


Abbildung 4. a) Die Überlagerung zeigt eine Serie von Proben die nacheinander während einer 30-stündigen Fermentation des Plasmids pMCP1-3.5 in *E. coli* in Intervallen von 2 Stunden gezogen und mit 2D-HPLC analysiert wurden. Die Pfeile kennzeichnen das Topoisomeren mit der größten Peakfläche (entspricht dem häufigsten Topoisomeren) und sind damit ein Maß für die mittlere Superspiralisierung. Die Beschriftung gibt die Uhrzeit der Probenahme an. Die Verwindungszahl des häufigsten Topoisomeren des pMCP1-Plasmids (b) (Superspiralisierung ist in absoluten Zahlen angegeben, die durch Gelelektrophorese ermittelt wurden) und des pAcMCP1-Plasmids (c) (nur relative Verwindungszahlen vorhanden, Anfangszustand wurde willkürlich zu Null gesetzt) wurde gegen die Fermentationsdauer aufgetragen.

des „Downstream“-Prozesses anhand der Proben von einzelnen Reinigungsschritten, da die entsprechende enzymatische Aktivität von Topoisomerasen nicht mehr vorhanden ist.

Wir konnten zeigen, dass eine stationäre Phase mit Chinnicarbamat eine einzigartig selektive Trennung von Topoisomeren geschlossen-zirkulärer Plasmide ermöglicht, was durch schnelle Bindungs- und Dissoziationsprozesse weiter unterstützt wird, da der chromatographische Selektor nicht über möglicherweise störende interkalative Eigenschaften verfügt. Die Elutionsreihenfolge ist umgekehrt zu der Migrationsreihenfolge in der Elektrophorese. Weiterhin wurde die Topologie von Fermentationsproben zweier unterschiedlicher Plasmidpräparationen mithilfe von zweidimensionaler Chromatographie bestimmt. Mit diesem Aufbau bestehend aus Größenausschlusschromatographie und topologisch-selektiver Chromatographie wurde gezeigt, dass sich die Topologie während der Fermentation beträchtlich ändert.

Experimentelles

Für die chromatographische Trennung wurde ein Mischgradient aus Salz und 2-Propanol von 0 bis 100 % in 15 Minuten (Abbildungen 2c-f und 4) oder 60 Minuten (Abbildungen 2a,b und 3) angewendet. Eluent A war eine Lösung von $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, eingestellt auf pH 7.0 mit 5 M NaOH. Eluent B war eine Lösung von $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, $0.6 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$ und 10 % (v/v) 2-Propanol, eingestellt auf

pH 7.0 mit 5 M NaOH. Zwischen den analytischen Läufen wurde die Säule mit Salz gewaschen (Injektion von $50 \mu\text{L} 3 \text{ M NaCl in H}_2\text{O}$) und 5 Minuten mit 0 % B äquilibriert. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0.7 mL min^{-1} , die Detektionswellenlänge 258 nm, und die Temperatur wurde auf 60°C eingestellt (mit Eluent-Vorheizung).

eingegangen am 14. September 2011
Online veröffentlicht am 16. November 2011

Stichwörter: Cinchona-Alkaloide · DNA-Strukturen · Flüssigchromatographie · Molekulare Erkennung · Plasmidtopoisomere

- [1] *Guidance for Industry: Considerations for Plasmid DNA Vaccines for Infectious Disease Indications*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, MD, 2007.
- [2] S. M. Mirkin, *Encyclopedia of Life Sciences* **2001**, 1–11.
- [3] W. R. Bauer, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1978**, 7, 287–313.
- [4] R. R. Monaco, *J. Nucleic Acids* **2010**, 2010, 4.
- [5] T. Fornstedt, G. Zhong, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* **1996**, 742, 55–68.
- [6] a) R. Corradini, S. Sforza, T. Tedeschi, R. Marchelli, *Chirality* **2007**, 19, 269–294; b) J. B. Chaires, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 314–320.
- [7] I. Haq, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, 403, 1–15.
- [8] N. M. Maier, S. Schefzick, G. M. Lombardo, M. Feliz, K. Rissanen, W. Lindner, K. B. Lipkowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8611–8629.
- [9] N. J. Pritchard, A. Blake, A. R. Peacocke, *Nature* **1966**, 212, 1360–1361.
- [10] M. Mahut, M. Leitner, A. Ebner, M. Lämmerhofer, P. Hinterdorfer, W. Lindner, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 1–8.
- [11] a) M.-D. Mayán-Santos, M.-L. Martínez-Robles, P. Hernandez, D. Krimer, J. B. Schwartzman, *Electrophoresis* **2007**, 28, 3845–3853; b) D. J. Clark, B. Leblanc, *Methods Mol. Biol.* **2009**, 543, 523–535.
- [12] U. Kapp, J. Langowski, *Anal. Biochem.* **1992**, 206, 293–299.
- [13] A. D. Bates, A. Maxwell in *DNA Topology*, 2. Aufl., Oxford University Press, New York, 2006.
- [14] W. Keller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 4876–4880.
- [15] W. R. Bauer, F. H. C. Crick, J. H. White, *Sci. Am.* **1980**, 243, 118–124; W. R. Bauer, F. H. C. Crick, J. H. White, *Sci. Am.* **1980**, 243, 126; W. R. Bauer, F. H. C. Crick, J. H. White, *Sci. Am.* **1980**, 243, 129–130; W. R. Bauer, F. H. C. Crick, J. H. White, *Sci. Am.* **1980**, 243, 132–133.
- [16] a) J. Urthaler, C. Ascher, H. Woehrer, R. Necina, *J. Biotechnol.* **2007**, 128, 132–149; b) J. Urthaler, W. Buchinger, R. Necina, *Acta Biochim. Pol.* **2005**, 52, 703–711.
- [17] M. A. Woelfle, Y. Xu, X. Qin, C. H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 18819–18824.