

Abschlussbericht zum Projekt

Gewinnung von Europium, Lanthan, Gold und Palladium mit Hilfe von spezialisierten Hefekulturen als Biomining-Verfahren

Institution: Deutsche Bundesstiftung Umwelt DBU
Postfach 1705
49007 Osnabrück

Bewilligungsempfänger:
Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK)
Corrensstraße 3
06466 Seeland, Ortsteil Gatersleben
Tel. +49 39482 5247

Kooperationspartner:
G.U.B. Ingenieur AG
- Niederlassung Chemnitz -
Oberfrohaer Str. 27
09117 Chemnitz
Tel. +49 37144468 10

Projekt-Nr.: AZ 31205

Projektlaufzeit: 01.01.2014 – 30.06.2015

Gatersleben, 30.09.2015

Ziel des Vorhabens ist die Entwicklung eines Biomining-Verfahrens, mit dem sich Lanthan, Europium, Gold und Palladium aus Schlammrückständen, niedrighaltigen Erzen und Prozesswässern des herkömmlichen Gold-/ Palladium- und Rare Earth Element-Bergbaus gewinnen lassen und damit eine weitgehend vollständige Extraktion der im Schlamm enthaltenen Restmetallgehalte erreicht wird. Dieses Verfahren mit (1) Anreicherung der Wertstoffe, (2) Gewinnung der Wertstoffe und (3) Verwertung der Biomaterialien umfasst in sich geschlossene Stoffkreisläufe und ist damit aus ökonomischer und umweltrelevanter Sicht herkömmlichen Verfahren überlegen.

Einleitung

Ausgangsmaterialien für das Biomining-Verfahren sind Tailingwässer, Schlammrückstände und niedrighaltige Erze, deren darin enthaltenen „Rare Earth Elements“ (REEs - Lanthan, Europium) und Edelmetalle (Gold, Palladium) in die lösliche Phase überführt werden. Die im großen Volumen aber in sehr geringen Konzentrationen enthaltenen Wertstoffe müssen zunächst konzentriert werden, was über deren unspezifische Sorption an Biomaterialien, wie Algen, Pflanzen und Biozellulose erfolgt. Nach Entfernung der löslichen Phase wird das an den Biomaterialien adsorbierte Material, was neben REEs und Edelmetallen u.a. weitere Metalle umfasst, über einen Desorptionsschritt freigesetzt und in geringem Volumen wieder in die lösliche Phase überführt. Diese enthält nun die angereicherten Wertstoffe in höheren Konzentrationen. Die bei dem Prozess anfallende Biomasse lässt sich als Substratzusatz für Vergärungen mit Hefen bzw. zur Biogaserzeugung dem Stoffkreislauf wieder zuführen, was Schritt 3 der Wertstoffaufarbeitung ist.

Im zweiten Schritt dem sog. „Biomining“ kommt es zur eigentlichen Gewinnung der Wertstoffe (Lanthan, Europium, Gold, Palladium), was mittels Hefekulturen erfolgt. Deren Zellwandoberfläche wird dazu mit rekombinanten Peptiden belegt, die spezifisch den entsprechenden Wertstoff binden. Zu diesem Zweck werden die nach der Desorption im ersten Schritt angereicherten, in der wässrigen Phase befindlichen Wertstoffe mit den entsprechenden Hefestämmen inkubiert. Da spezifisch Lanthan, Europium, Gold bzw. Palladium angereichert werden muss, kommen in Abhängigkeit vom Wertstoff vier verschiedene Hefestämme zum Einsatz, die sich in ihren rekombinanten, an der Zellwandoberfläche immobilisierten Peptiden unterscheiden. Nach der spezifischen Immobilisierungsreaktion werden die Hefezellen geerntet (per Zentrifugation bzw. Filtration) und der entsprechende Wertstoff z. B. durch Verhüttung gewonnen. Da hierbei die transgenen Hefezellen vollständig verbrannt werden, ist deren sichere Entsorgung bei gleichzeitiger Energiegewinnung gewährleistet.

Die Projektbearbeitung ist in zwei Phasen vorgesehen. So waren in der hier im Fokus stehenden 18-monatigen Phase 1 zunächst vom Bewilligungsempfänger IPK erste Hefestämme zu konstruieren, die aufgrund ihrer zellwandlokalisierten rekombinanten Proteine die Wertstoffe in möglichst hohen Konzentrationen spezifisch akkumulieren. Diese waren in Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner (G.U.B. Ingenieur AG) auf Eignung zu prüfen. Dazu stellte dieser die entsprechenden Proben einschließlich erster wertstoffangereicherter Realproben zur Verfügung. Gleichzeitig wurden die Probenahmestandorte und die Prozedur der Probenvorbereitung festgelegt, was ebenfalls Aufgabe vom Kooperationspartner war.

In der folgenden Phase 2 sollen die in Phase 1 konstruierten Hefestämme unter Praxisbedingungen auf Eignung geprüft werden. Dazu ist vom Projektpartner GMBU e.V. der Anreicherungsschritt der Wertstoffe über deren unspezifische Sorption an Biomaterialien zu etablieren und der sich anschließende Desorptionsschritt so zu gestalten, dass die nun

angereicherten Wertstoffe unter Praxisbedingungen spezifisch an die Hefe-Zellwand immobilisieren. Die Etablierung des darauf aufbauenden gesamten Biomining-Verfahrens erfolgt abschließend unter Mitarbeit aller drei Partner.

Methoden und Ergebnisse (gegliedert nach Arbeitspaketen)

AP 1 Vorauswahl der Europium-, Lanthan-, Gold- und Palladium-bindenden Peptide

1.1 Erstellung einer Peptid-Bibliothek mit putativen Europium-, Lanthan-, Gold- und Palladium-bindenden Fragmenten

Um transgene Hefestämme zu konstruieren, die auf Basis von zellwandlokalisierten rekombinanten Proteinen Europium, Lanthan, Gold und Palladium spezifisch akkumulieren, waren im ersten Arbeitspaket die potentiellen Europium-, Lanthan-, Gold- und Palladium-bindenden Peptide zu selektieren. Dazu wurde auf Basis von Literaturdaten eine Vorauswahl an infrage kommenden Europium-, Lanthan-, Gold- und Palladium-bindenden Peptidfragmenten getroffen (Tab. 1). Diese wurden mit Proteinen fusioniert, welche in der Hefezelle deren Verankerung auf der Zellwandoberfläche realisieren (z. B. Aga1p).

Im ersten Schritt waren die Funktionalität, Affinität und Spezifität der selektierten potentiell Europium-, Lanthan-, Gold- und Palladium-bindenden Proteine zu den einzelnen Edelmetallen bzw. REEs zu prüfen. Hierzu wurden Hybridgene konstruiert, deren Genprodukte aus Bindepeptid – Aga1p-Fusionen bestehen. Diese Hybridgene wurden zunächst in *E. coli* transformiert und die rekombinanten Bindepeptid – Aga1p-Fusionen aus den transgenen Stämmen isoliert und gereinigt.

Tab. 1: Potentielle Peptide zur selektiven Bindung von Europium, Lanthan, Gold und Palladium.

<i>Edelmetall/REE</i>	<i>Peptid</i>
<i>Gold (Au)</i>	VSGSSPDS LKAHLPPSRLPS TGTSVLLATPYV
<i>Palladium (Pd)</i>	QQSWPIS NFMSLPRLGHMH SVTQNKY SPHPGPY HAPTPML
<i>Lanthan (La)</i>	<i>Domänen verschiedener Calcium-bindender Proteine</i> <i>Calmodulin</i> DKDGDITITKEV
<i>Europium (Eu)</i>	<i>Prothrombin Fragment 1</i> ANKGFLZZVRKGNLZRZCLZZPCSRZAFZLZS Z: Glutamin oder Glutaminsäure

Die in Tab. 1 markierten (fett unterlegten) Sequenzen potentieller Bindeproteine wurden in Kombination mit dem zur späteren Zellwandoberflächen-Immobilisierung in den Hefen *Arxula adenivorans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Hansenula polymorpha* verantwortlichen sog. Ankerprotein (Aga1p) zunächst in *E. coli* synthetisiert. Hierzu erfolgte die Fusion der von den Peptiden abgeleiteten Nukleotidsequenzen mit denen des *AGA1*-Gens. Alternativ wurden die Peptid-codierenden Fragmente mit dem aus Gerste stammenden *Horcolin* (*HORC*)-Gen fusioniert.

Alle Gold-, Palladium-, Lanthan- und Europium-bindenden Peptide wurden im ersten Schritt als Aga1p- bzw. Horcp-Fusionen in den transgenen *E. coli*-Stämmen synthetisiert. Um dabei möglichst hohe rekombinante Proteinkonzentrationen zu erreichen, wurde das T7 Expressionssystem (Novagen) mit den Basisvektoren pET21d⁺ und pET22b⁺ verwendet. Beide Vektoren sind durch eine C-terminale His-Tag-codierende Region gekennzeichnet und erlauben cytoplasmatische (pET21d⁺) bzw. in das Periplasma gerichtete Expressionen (pET22b⁺) der Zielgene (Fig. 1).



Fig. 1: Im Rahmen des Projektarbeiten genutzte Basisvektoren zur Konstruktion der transgenen *E. coli*-Stämme.

Fig. 1: Im Rahmen des Projektarbeiten genutzte Basisvektoren zur Konstruktion der transgenen *E. coli*-Stämme.

Die sog. „Open Reading Frames“ (ORF) bestehend aus *Bindepeptid-Sequenz* – *AGA1*-Hybridgen wurden per PCR amplifiziert und direkt in die *E. coli*-Vektoren pET21d⁺ und pET22b⁺ transferiert.

Das als weiterer Fusionspartner für die *Bindepeptid-Sequenzen* genutzte *HORC*-Gen codiert ein Gerstenprotein, das sich sehr gut in *E. coli* exprimieren lässt und damit eine hohe Akkumulation an rekombinantem löslichem Protein ermöglicht. Funktionell besitzt es weder die Fähigkeit einer Bindung von Edelmetallen bzw. REEs, noch ist es in Membranen verankert. Ausgenommen der Membranverankerung erfüllt Horcolin neben Aga1p die Voraussetzung als Trägerprotein der im Rahmen der Projektarbeiten auf dem SPR – Chip zu immobilisierenden Peptidfusionen zu fungieren (Fig. 2).

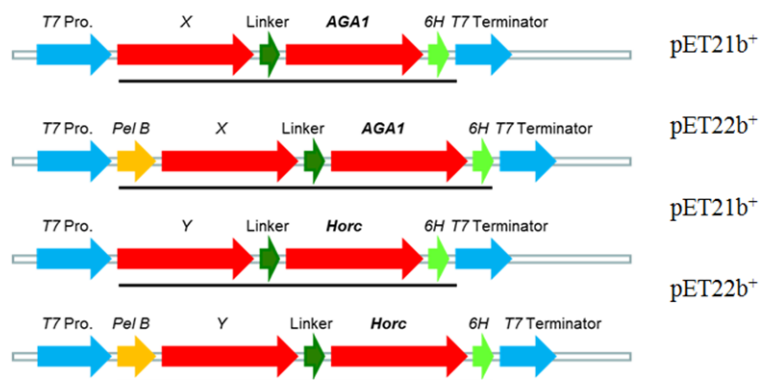


Fig. 2: Zusammensetzung der *E. coli*-Expressionsmodule bestehend aus Gold-, Palladium-, Lanthan- und Europium-bindenden Peptid codierenden Sequenzen und *AGA1*- bzw. *HORC*-Gen. X = Au, Pd; Y: La, Eu; 6H: Hexa-Histidin Tag.

Fig. 2: Zusammensetzung der *E. coli*-Expressionsmodule bestehend aus Gold-, Palladium-, Lanthan- bzw. Europium-bindenden Peptid codierenden Sequenzen und *AGA1*- bzw. *HORC*-Gen. X = Au, Pd; Y: La, Eu; 6H: Hexa-Histidin Tag.

Tab 2: Zur Synthese der rekombinanten Gold-, Palladium-, Lanthan- und Europium-bindenden Fusionsproteine genutzte transgene *E. coli*-Stämme.

Tab 2: Zur Synthese der rekombinanten metallbindenden Fusionsproteine genutzte transgene *E. coli*-Stämme.

<i>E. coli</i> Stamm	Basisvektor	X	Ankerprotein	C-Terminal His Tag
BL21(DE3)	pET-21d ⁺			6H
BL21(DE3)	pET-22d ⁺			6H
BL21(DE3)	pET-21d ⁺	Au	Aga1p	6H
BL21 (DE3)	pET-22b ⁺	Pd	Aga1p	6H
BL21 (DE3)	pET-22b ⁺	Au	Aga1p	6H
BL21 (DE3)	pET-22b ⁺	La	Horcp	6H
BL21 (DE3)	pET-22b ⁺	Eu	Horcp	6H
BL21 (DE3)	pET-21d ⁺	La	Horcp	6H
BL21 (DE3)	pET-21d ⁺	Eu	Horcp	6H
BL21(DE3) Lemo	pET-21d ⁺	Au	Aga1p	6H
BL21 (DE3) Lemo	pET-22b ⁺	Pd	Aga1p	6H
BL21 (DE3) Lemo	pET-22b ⁺	Au	Aga1p	6H
BL21 (DE3) Lemo	pET-22b ⁺	La	Horcp	6H
BL21 (DE3) Lemo	pET-22b ⁺	Eu	Horcp	6H
BL21 (DE3) Lemo	pET-21d ⁺	La	Horcp	6H
BL21 (DE3) Lemo	pET-21d ⁺	Eu	Horcp	6H

Alle Bindepeptid-Aga1p codierenden Nukleotidsequenzen wurden in pET21d⁺ bzw. pET22b⁺ Expressionsvektoren kloniert und in *E. coli* exprimiert. Die rekombinanten Proteine ließen sich per Western-Blot in den transgenen *E. coli*-Stämmen detektieren (Tab. 2, Fig. 3).

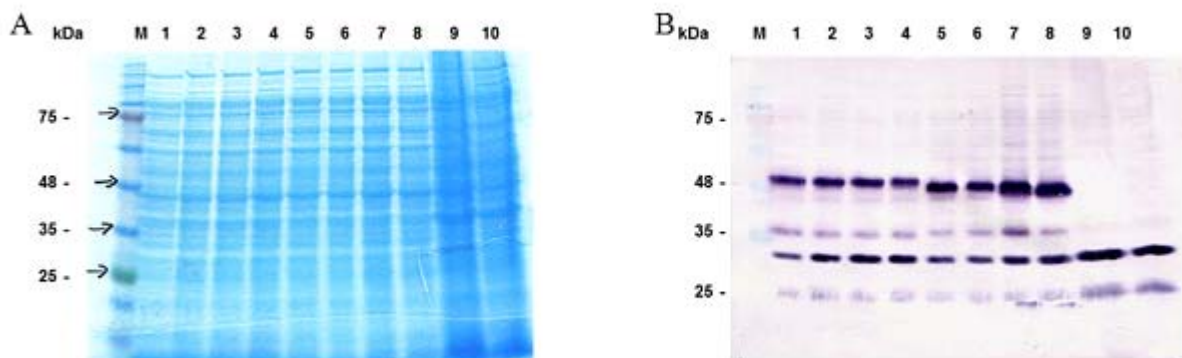


Fig. 3: Akkumulation von Palladium und Gold bindenden Fusionsproteinen mit Aga1p in einer Auswahl an transgenen *E. coli*-Stämmen. (A) SDS-PAGE - Coomassie Färbung, (B) Western Blot mit anti-His-Tag Antikörpern, (M) Proteinstandard, (1) pET22b⁺-Au-AGA1-6H (1-1), (2) pET22b⁺-Au-AGA1-6H (1-2), (3) pET21d⁺-Au-AGA1-6H (2-1), (4) pET21d⁺-Au-AGA1-6H (2-2), (5) pET22b⁺-Pd-AGA1-6H (3-1), (6) pET22b⁺-Au-AGA1-6H (3-2), (7) pET22b⁺-Pd-AGA1-6H (4-1), (8) pET22b⁺-Pd-AGA1-6H (4-2), (9) Negativkontrolle pET21d⁺ (10) Negativkontrolle pET22b⁺ (10).

Die anschließende Reinigung der Proteinfusionen aus *E. coli*-Zellextrakt erfolgte über Immobilisierte Metall Affinitäts Chromatographie (IMAC).

Fig. 4 demonstriert den Ablauf der Reinigung am Beispiel von Au-Aga1p und Pd-Aga1p. Beide Proteininfusionen ließen sich über IMAC reinigen. Unter Standardbedingungen (37°C Kultivierungstemperatur, 1 mM IPTG Induktion, Wirt *E. coli* BL21(DE3)) wurde allerdings nur ein geringer Anteil am jeweiligen löslichen Fusionsprotein pro Gesamtprotein-Konzentration erreicht. In weiterführenden Expressionsversuchen wurde durch die Anpassung der Inkubationstemperatur und der Konzentration des Induktors (IPTG) an die spezifischen *E. coli*-Transformanten bzw. den Wechsel auf alternative *E. coli*-Expressionsstämme (*E. coli* T7 Express- Lemo, NEB) versucht den Anteil an löslichem Protein zu erhöhen.

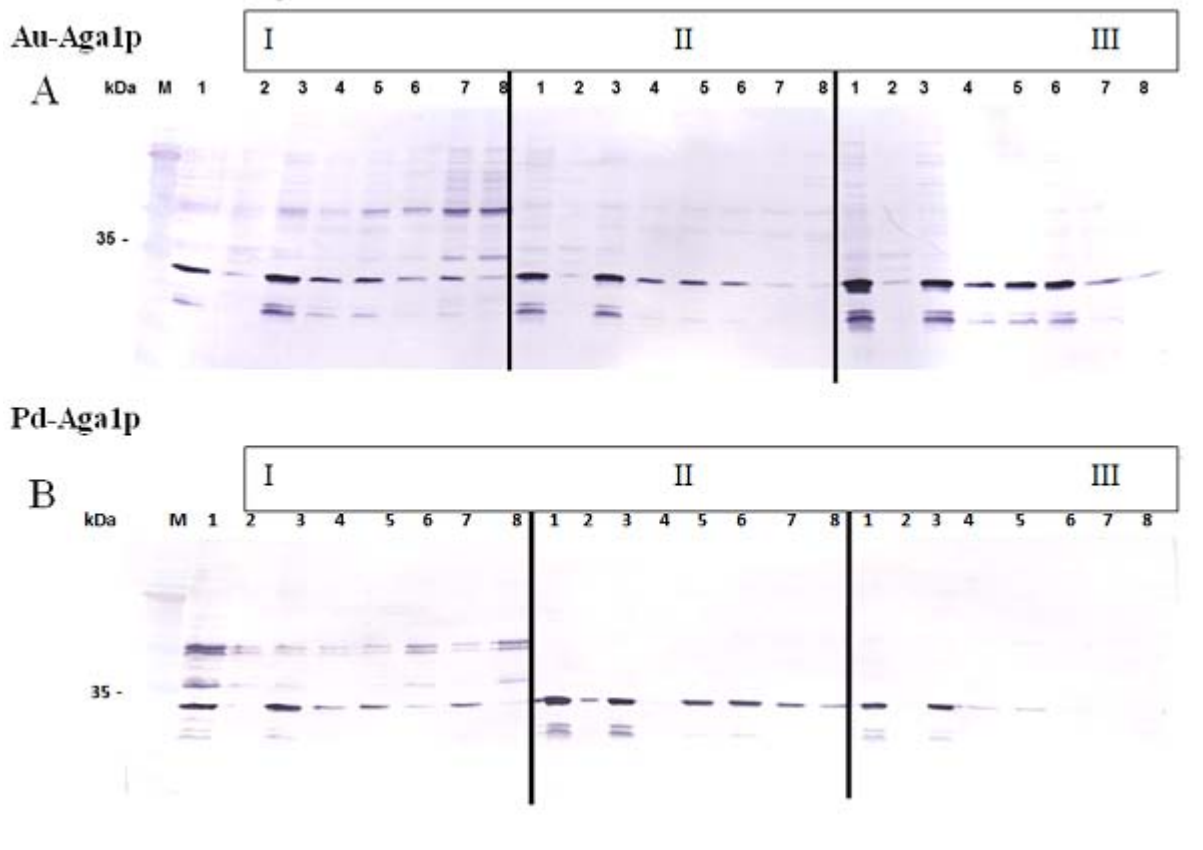


Fig. 4: Reinigung der (A) Au-Aga1p und (B) Pd-Aga1p-Fusionsproteine per NiNTA funktionalisierter Agarose. (A) I - BL21(DE3)/pET22d⁺-Au-AGA1-6H; II - Negativkontrolle BL21(DE3)/pET21d⁺; III - Negativkontrolle BL21(DE3)/pET22b⁺. (B) I - BL21(DE3)/pET22b⁺-Pd-AGA1-6H; II - Negativkontrolle BL21(DE3)/pET21d⁺; III - Negativkontrolle BL21(DE3)/pET22b⁺. (M) Proteinstandard; (1) Rohextrakt; (2) Durchlauf; (3) Waschschrift 1 (mit 5 mM Imidazol); (4) Waschschrift 2 (mit 20 mM Imidazol); (5-7) Elutionsschritte 1-4.

Die Au-Aga1p (A) und Pb-Aga1p (B) Fusionsproteine ließen sich per Ni-NTA funktionalisierter Agarose-Säulen aus den *E. coli*-Extrakten reinigen. Auf Grund der Verluste an rekombinantem Protein während der Reinigungsprozedur wurde in den sich anschließenden SPR-Analysen zur Interaktion vom Fusionsprotein mit Gold bzw. Palladium parallel mit Extrakten geringeren Reinigungsgrades gearbeitet. Als Negativkontrollen dienten Zellextrakte, die keine Fusionsproteine enthielten (*E. coli* BL21(DE3), transformiert mit pET21b⁺ bzw. pET22b⁺) als Biokomponenten (Fig. 4).

1.2 Auswahl und Bewertung geeigneter Rohstoffquellen des aktiven und stillgelegten Bergbaus bzw. des Urban-Mining zur Gewinnung der Elemente Europium, Lanthan, Gold und Palladium

Folgende Rohstoffquellen wurden zur Gewinnung von Europium, Lanthan, Gold und Palladium vom Kooperationspartner G.U.B. Ingenieur AG selektiert:

- Gold und Palladium aus
 - Kupferschieferlagerstätte Lausitz, Bohrkerne → KSL Kupferschiefer Lausitz GmbH,
 - Kupferbergbauunternehmen in Polen → Lagerstätten Lubin, Polkowice-Sieroszowice (KGHM Polska),
 - Kupferschieferlagerstätte Harz, Halden und sanierte Tailing Ponds → MDSE Mitteldeutsche Sanierungs- und Entsorgungsgesellschaft mbH.
- Gold aus
 - Deutschland → Altbergbau des Erzgebirges, Placer in registrierten Gebieten (sehr geringe Vorkommen und geringe Konzentrationen),
 - Mexiko → private Mine der Silber-Gold Gewinnung nahe Durango,
 - Tailing Ponds in Kumtor, Kirgistan (noch kein erfolgreicher Kontakt).
- Lanthan aus REE-Lagerstätten
 - Kirgistan → geplante Kooperation für Projekt-Phase 2 (GEOPRIBOR, Prof. Torgojev und ggs. mit Kirgisische Chemie und Metallurgische Fabrik (KCMZ),
 - Madagaskar → Betreiber: Tantalus Rare Earth AG.
- Europium und Palladium aus industriellen Abfallströmen
 - Europium-Oxid aus Alt-Leuchtstoff-Gemischen,
 - Palladium-Filterstäube für Bergversatz → AUREC Bernburg (Salzstock Versatz) - Anfrage Probenahme,
 - Glas, Holz und Kunststoff mit gefährlichen Stoffen → Tönsmeier Entsorgung Köthen GmbH; Recycling-Park Harz GmbH,
 - Abgaskatalysatoren für Ottomotoren → Calbe Chemie GmbH.

Die Selektion geeigneter Rohstoffquellen erfolgte nach umfangreichen Recherchen, Sichtung der verfügbaren Informationen über Verfügbarkeit, Veröffentlichungen und durch Kontaktaufnahme zu den Eigentümern/Verwaltern zu den Hinterlassenschaften.

AP 2 Eingrenzung der Europium-, Lanthan-, Gold- und Palladium-bindenden Peptide

2.1 Screening der in AP 1.1 erstellten Peptide mittels SPR (Surface Plasmon Resonance) auf Affinität und Spezifität für Europium, Lanthan, Gold, Palladium und Selektion der besten Peptide

Das Screening der im AP1.1 selektierten Peptide bezüglich Funktionalität fokussierte sich in der Projektphase 1 auf Gold- und Palladium-bindende Peptide und erfolgte per SPR. Hierfür dienten die isolierten, gereinigten Fusionsproteine Au-Aga1p und Pd-Aga1p als Biokomponenten.

Für die SPR-Interaktionsanalysen mussten die SPR-Chips zunächst mit den entsprechenden Biokomponenten funktionalisiert werden. Hierzu wurden die zu testenden potentiellen Peptidfusionen auf der Oberfläche des Chips über einen Dithiobis – NiNTA-Linker (Chipoberfläche) und den His-Tag der rekombinanten Bindeproteine immobilisiert (Fig. 5).

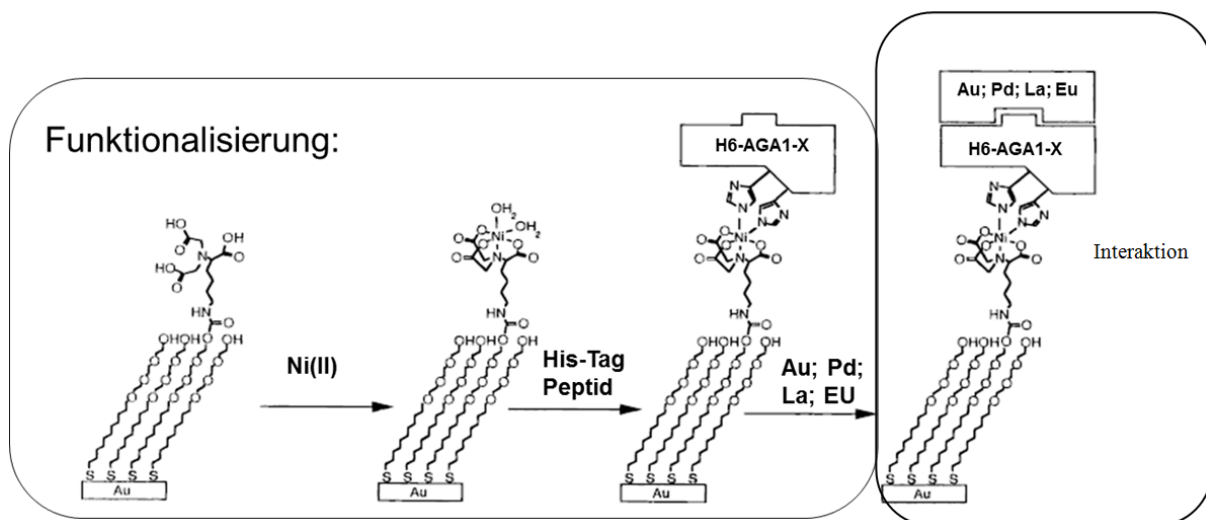


Fig. 5: Funktionalisierung der SPR-Chipoberfläche mit den potentiellen Metall-bindenden Proteinen (ausgerüstet mit einem His-Tag) und sich daran anschließender Interaktionsanalyse.

Für die Messung der Interaktion zwischen den auf dem Chip immobilisierten potentiellen Europium-, Lanthan-, Gold- und Palladium-bindenden Proteinen und den Edelmetallen bzw. REEs wurde polarisiertes Licht auf die Chipoberfläche geleitet, das dort reflektiert und per CCD-Kamera detektierbar war. Hierbei misst die CCD-Kamera den Verlust an reflektiertem polarisiertem Licht im Einfallswinkel auf Grund der dabei stattfindenden Oberflächen Plasmon Resonanz (SPR). Diese Daten wurden mit Hilfe einer Software so verarbeitet, dass sich die genaue Position des Reflexionswinkels berechnen lässt. Nach Zugabe einer Messprobe (entsprechendes Edelmetall bzw. REE) bindet diese an die immobilisierten, modifizierten Peptide. Diese Interaktion zwischen Biokomponente (Edelmetall- bzw. REE-bindendes Protein) und Edelmetall bzw. REE verursacht eine Verschiebung des Reflexionswinkels. Die Intensität dieser Verschiebung wurde zur Quantifizierung der Bindungsstärke verwendet und in Pixel (pxl) angegeben.

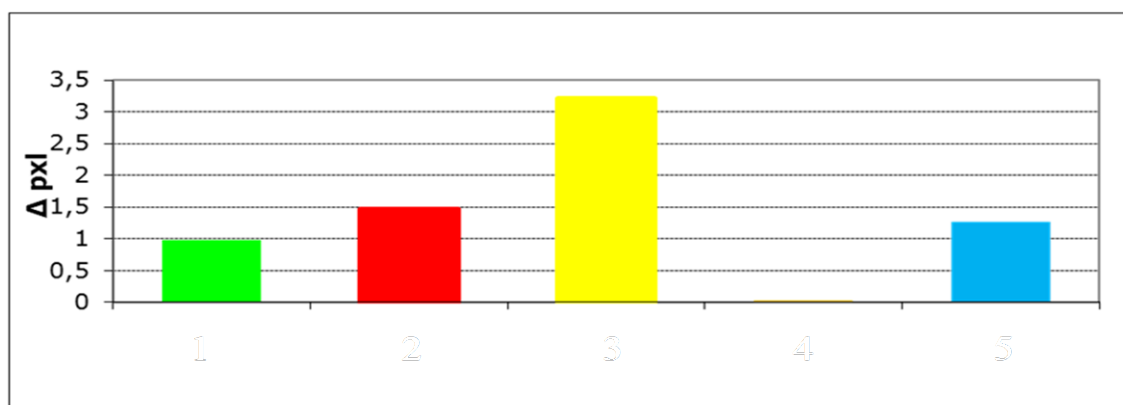


Fig. 6: SPR-Messsignale in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Chips (Goldoberfläche) zur Funktionalisierung mit den entsprechenden Biokomponenten. (1) ohne Vorbehandlung, (2 und 3) mit Ni-NTA bzw. (4 und 5) mit BSA behandelt.

Fig. 6: SPR-Messsignale in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der Chips (Goldoberfläche) zur Funktionalisierung mit den entsprechenden Biokomponenten. (1) ohne Vorbehandlung, (2 und 3) mit Ni-NTA bzw. (4 und 5) mit BSA behandelt.

Eine Bindung von Ni^{2+} sollte nur am NTA-Feld erfolgen, was sich durch eine geringe Steigerung des Messsignals (Δpxl) messtechnisch detektieren ließ. So zeigte die mit NTA und

Ni^{2+} -behandelte Goldoberfläche gegenüber der nur mit NTA als auch der mit BSA und BSA- Ni^{2+} -behandelten Fläche ein höheres Messsignal. Dies demonstriert die erfolgreiche Aktivierung (Komplexierung) der NTA mit Ni^{2+} , was Voraussetzung für die effektive gerichtete Immobilisierung der mit His-Tag ausgestatteten Bindeproteine an der Chipoberfläche ist (Fig. 6).

Um nun die Immobilisierung der Bindeproteine an den mit Ni^{2+} -aktivierten NTA nachzuweisen, erfolgte im nächsten Schritt die Immobilisierung der Biokomponenten (entsprechende Bindeproteine) über deren His-Tag an der Ni^{2+} -aktivierten Goldoberfläche, was messtechnisch detektierbar war (Fig. 7 und 8).

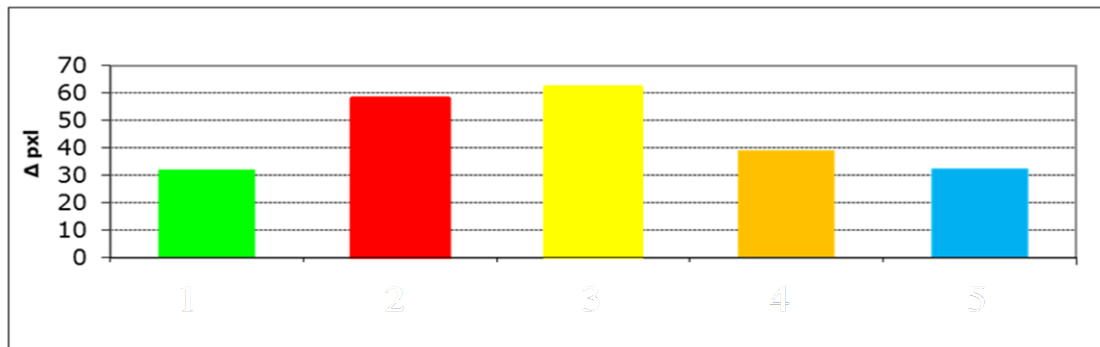


Fig. 7: SPR-Messsignale in Abhängigkeit von der Funktionalisierung der Chips mit Au-Aga1p als Biokomponente. (1) Funktionalisierung ohne Vorbehandlung, (2 und 3) mit Ni-NTA bzw. (4 und 5) mit BSA.

Fig. 7: SPR-Messsignale in Abhängigkeit von der Funktionalisierung der Chips mit Au-Aga1p als Biokomponente. (1) Funktionalisierung ohne Vorbehandlung, (2 und 3) mit Ni-NTA bzw. (4 und 5) mit BSA.

Hierbei zeigte sich, dass die Messsignale an den mit Ni-NTA vorbehandelten Messflächen (rot, gelb) gegenüber den Kontroll-Oberflächen (Gold – grün, BSA - braun, blau) doppelt so hoch waren (Δpxl - ca. 30), was die Bindung der Biokomponente an Ni-NTA dokumentiert. Die Bindeproteine ließen sich auf diese Weise gerichtet über ihre His-Tags an der Chipoberfläche immobilisieren.

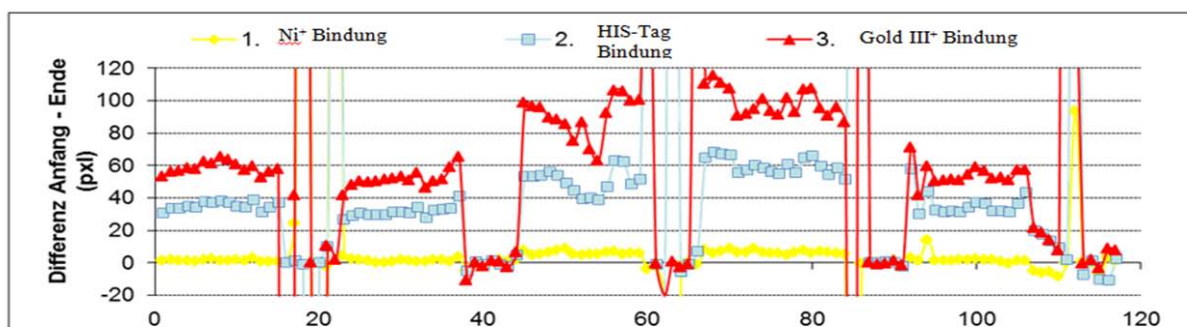


Fig. 8: Verlauf des Messsignals während der Vorbehandlung und Funktionalisierung des Chips. Dargestellt sind der Einfluss von (1) Ni-NTA, (2) Au-Aga1p und der Zusatz von Au^{3+} auf die Messsignale (Δpxl).

Fig. 8: Verlauf des Messsignals während der Vorbehandlung und Funktionalisierung des Chips. Dargestellt sind der Einfluss von (1) Ni-NTA, (2) Au-Aga1p und der Zusatz von Au^{3+} auf die Messsignale (Δpxl). Vor Beginn der jeweiligen Analysen wurden die Kanäle des SPR-Chips entweder mit C2 – Dithiobis-NTA (1 mM) oder BSA (1 mg/ml) funktionalisiert. Die Aktivierung des C2 – Dithiobis-NTA erfolgte durch Zugabe von Nickelsulfat. BSA-beschichtete Felder und die nicht-funktionalisierte Goldoberfläche fungierten als Kontrollen, da hier die rekombinanten Bindeproteine nicht binden können (Fig. 9).



Fig. 9: Beschichtung der einzelnen Kanäle der Chipoberfläche. Linker - C2-Dithiobis-NTA 1 mM in H₂O, Referenzflächen - BSA 1 mg/ml; reine Goldoberfläche, Blockierungslösung - BSA 1 mg/ml in HEPES pH 6.9, Aktivator - NiSO₄ 0,03 M in H₂O, His-Tag Peptid - Au-Aga1p, Messprobe - AuCl₃ (0,1 mM, 19,6 µg Gold/ml).

Fig. 9: Beschichtung der einzelnen Kanäle der Chipoberfläche. Linker - C2-Dithiobis-NTA 1 mM in H₂O, Referenzflächen - BSA 1 mg/ml; reine Goldoberfläche, Blockierungslösung - BSA 1 mg/ml in HEPES pH 6.9, Aktivator - NiSO₄ 0,03 M in H₂O, His-Tag Peptid - Au-Aga1p, Messprobe - AuCl₃ (0,1 mM, 19,6 µg Gold/ml).

Nach Funktionalisierung der Chip – Oberfläche wurde eine 0,1 mM Gold-Messlösung über die Felder des SPR-Chips gegeben und die Höhe der Plasmonresonanz simultan für alle funktionalisierten Felder gemessen (Fig. 9 und 10).

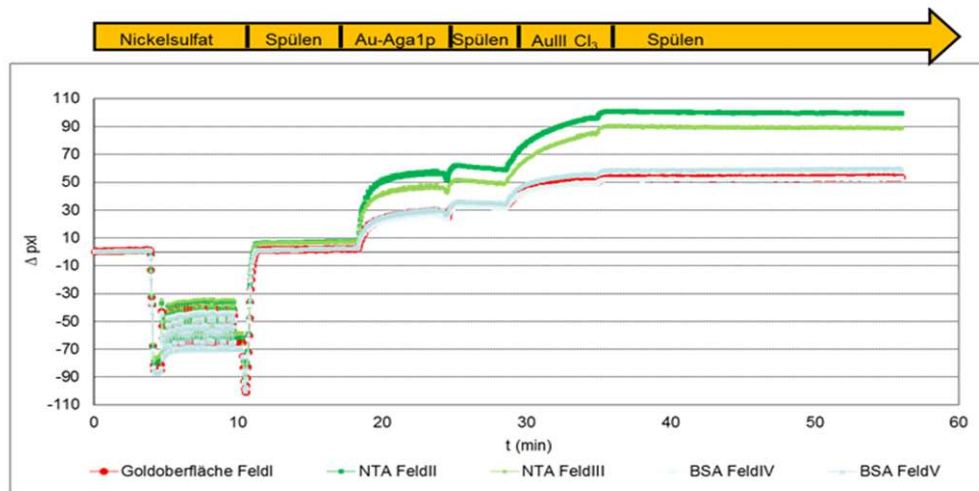


Fig. 10: Messsignale (Δpxl) während der Funktionalisierung des Chips mit Au-Aga1p und sich anschließender Messung von AuCl₃ (0,1 mM, 19,6 µg Gold/ml) im zeitlichen Verlauf.

Fig. 10: Messsignale (Δpxl) während der Funktionalisierung des Chips mit Au-Aga1p und sich anschließender Messung von AuCl₃ (0,1 mM, 19,6 µg Gold/ml) im zeitlichen Verlauf.

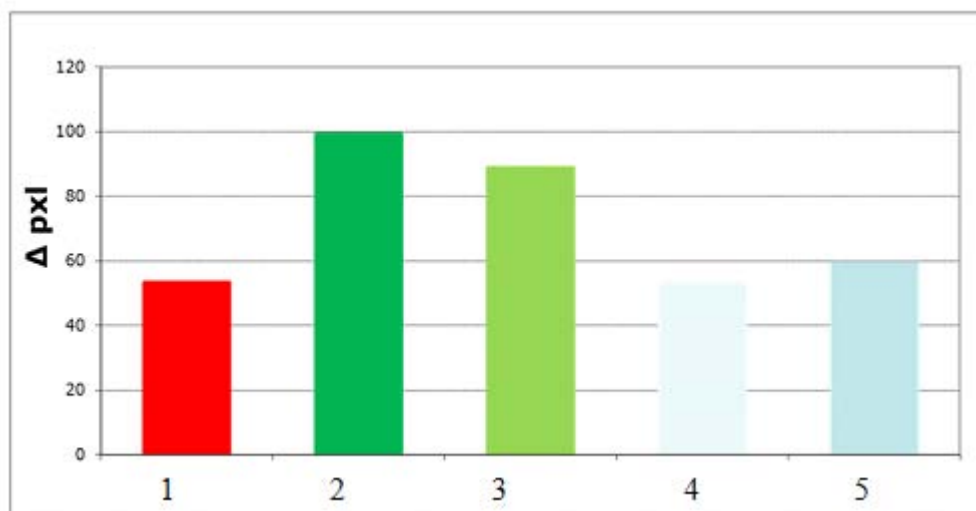


Fig. 11: Au-Aga1p - Gold-Bindung in Abhängigkeit von der Funktionalisierung des SPR – Chips. (1) Funktionalisierung ohne Vorbehandlung, (2 und 3) mit Ni-NTA bzw. (4 und 5) mit BSA.

Die mit Gold-Bindeprotein (Au-Aga1p) funktionalisierten Ni-NTA Felder (grün) zeigten eine Verdopplung des Messsignals (Δpxl) im Vergleich zu den Negativkontrollen Gold (rot) und

BSA (blau). Es konnte somit eine Bindung von Gold am immobilisierten Au-Aga1p nachgewiesen werden (NTA-Feld II und III) (Fig. 11).

Nachdem das SPR-System bezüglich Gold – Au-Aga1p Interaktionsanalyse optimiert war, erfolgten Untersuchungen bezüglich Spezifität der Goldbindung an die Au-Aga1p Proteinfusion. Dazu wurden die Kanäle des SPR-Chips per C2-Dithiobis-NTA und anschließender Aktivierung durch Ni²⁺ funktionalisiert. Im folgenden Schritt wurden verschiedene His-Tag markierte Bindeproteine mit doppeltem Au- bzw. Pd-Peptid-Motif (2Au-Aga2p, 2Pd-Aga2p) an die Chip-Oberfläche immobilisiert. Als negativ-Kontrolle dienten bakterielle Extrakte von *E. coli*-Stämmen mit leerem Plasmid (*E. coli* BL21(DE3)/pET21d⁺, BL21(DE3)/pET22b⁺) (Fig. 12).

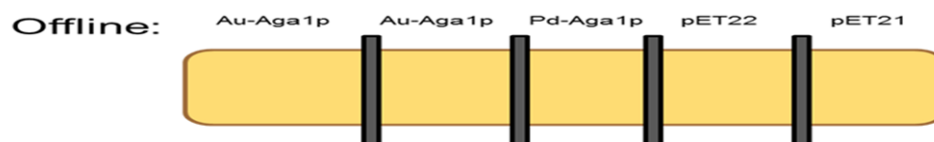


Fig. 12: Beschichtung der einzelnen Kanäle der Chipoberfläche. Linker - C2-Dithiobis-NTA 1 mM in H₂O, Referenzflächen - BSA 1 mg/ml; reine Goldoberfläche, Blockierungslösung - BSA 1 mg/mL in HEPES pH 6,9, Aktivator - NiSO₄ 0,03 M in H₂O, His-Tag Peptid - 2Au-Aga1p bzw. 2Pd-Aga1p, Messprobe 1: AuCl₃ (0,1 mM, 19,6µg Gold/ml).

Fig. 12: Beschichtung der einzelnen Kanäle der Chipoberfläche. Linker - C2-Dithiobis-NTA 1 mM in H₂O, Referenzflächen - BSA 1 mg/ml; reine Goldoberfläche, Blockierungslösung - BSA 1 mg/mL in HEPES pH 6,9, Aktivator - NiSO₄ 0,03 M in H₂O, His-Tag Peptid - 2Au-Aga1p bzw. 2Pd-Aga1p, Messprobe 1: AuCl₃ (0,1 mM, 19,6µg Gold/ml).

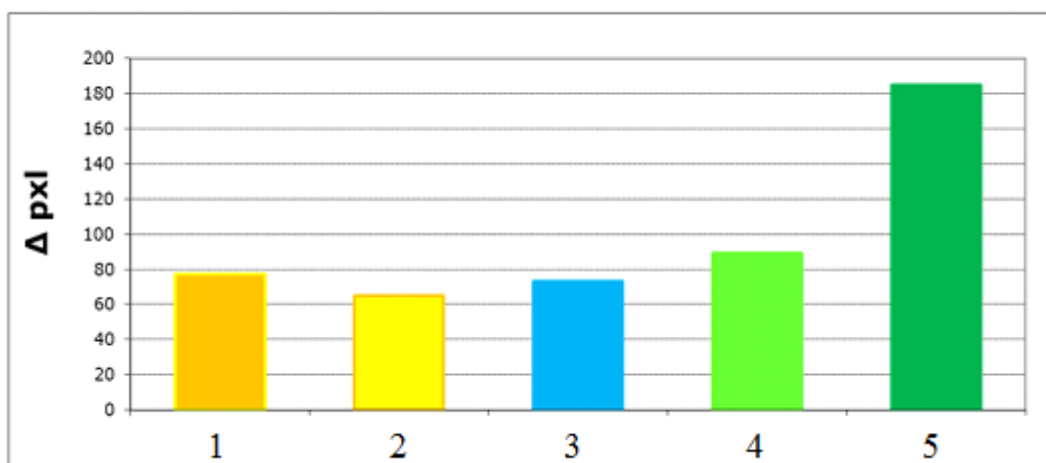


Fig. 13: Spezifität der Gold – Bindepeptid (2Au-Aga1p) Interaktion (4, 5) in Abhängigkeit von der Funktionalisierung der Chip-Oberfläche. Als Negativkontrollen wurde das Bindeprotein 2Pd-Aga1p (3) und Proteinextrakte von transgenen *E. coli*-Stämmen mit leerem Plasmid (*E. coli* BL21(DE3)/pET21d⁺ und BL21(DE3)/pET22b⁺ - 1,2) eingesetzt.

Basierend auf dem optimierten Messansatz wurde eine Bindung von Gold am immobilisierten 2Au-Aga1p (grün) nachgewiesen. Der immobilisierte Proteinextrakt aus *E. coli* BL21(DE3)/pET22b⁺-2Au-Aga1p zeigte ein um ca. 100 Pixel erhöhtes Messsignal gegenüber den Negativkontrollen (*E. coli* BL21(DE3)/pET22b⁺). Hingegen war das als direkte Negativkontrolle mitgeführte Bindeprotein 2Pd-Aga1p (blau) nicht in der Lage das Gold der Messprobe zu binden, was sich mit einem im Vergleich zu den Negativkontrollen (*E. coli*

BL21(DE3)/pET21d⁺ - orange, *E. coli* BL21(DE3)/pET22b⁺ - gelb) ähnlichen Δp_{xl} -Wert ausdrückt (Fig. 13).

Im letzten Schritt wurde die Abhängigkeit der Messsignale von der Goldkonzentration analysiert. Dazu dienten Lösungen mit unterschiedlichen Goldkonzentrationen als Messproben und 2Au-Aga1p als immobilisierte Biokomponente (Fig. 14).

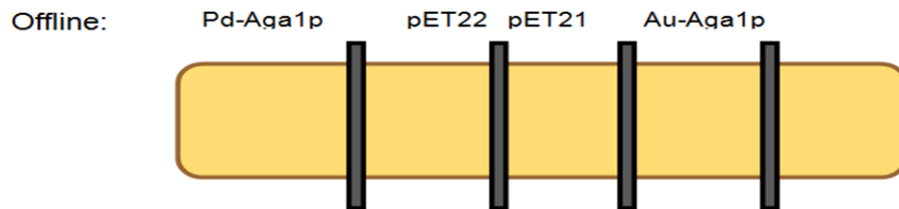


Fig. 14: Beschichtung der einzelnen Kanäle der Chipoberfläche. Linker - C2-Dithiobis-NTA 1 mM in H₂O, Aktivator - NiSO₄ 0,03 M in H₂O, Kontrollen - pET22⁺- und pET21⁺-Extrakte, Immobilisierte Peptide - 2Pd-Aga1p, 2Au-Aga1p, Messprobe - AuCl₃ (0,1 mM, 19,6µg Gold/ml).

Fig. 14: Beschichtung der einzelnen Kanäle der Chipoberfläche. Linker - C2-Dithiobis-NTA 1 mM in H₂O, Aktivator - NiSO₄ 0,03 M in H₂O, Kontrollen - *E. coli* BL21(DE3)/pET22b⁺- und *E. coli* BL21(DE3)/pET21d⁺- Extrakte, immobilisierte Peptide - 2Pd-Aga1p, 2Au-Aga1p, Messprobe - AuCl₃ (0,1 mM, 19,6µg Gold/ml).

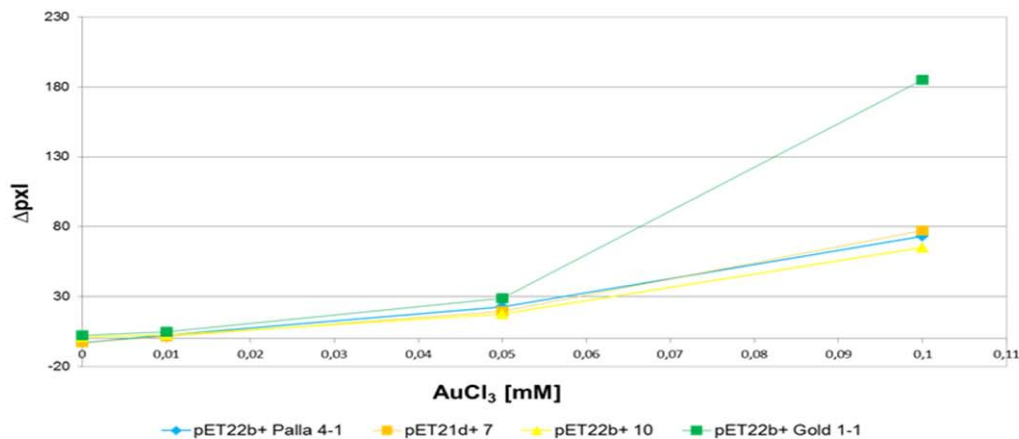


Fig. 15: Abhängigkeit der Messsignale von der Goldkonzentration. Als Biokomponenten wurden 2Au-Aga1p, 2Pd-Aga1p und die Negativkontrollen Proteinextrakte pET21⁺ und pET22⁺ genutzt.

Fig. 15: Abhängigkeit der Messsignale von der Goldkonzentration. Als Biokomponenten wurden 2Au-Aga1p (grün), 2Pd-Aga1p (blau) und die Negativkontrollen Proteinextrakt von *E. coli* BL21(DE3)/pET21d⁺ (orange) und *E. coli* BL21(DE3)/pET22b⁺ (gelb) genutzt.

Wie aus Fig. 15 ersichtlich, korreliert das Messsignal (Δp_{xl}) mit der Au³⁺-Konzentration. Bereits bei einer AuCl₃-Konzentration von 0,01 mM kommt es zum Anstieg der Messsignale gegenüber den Negativkontrollen und der Biokomponente 2Pd-Aga1p. Im Gegensatz dazu erreichen alle Kontrollen nur sehr geringe Δp_{xl} -Werte. Damit konnte die Spezifität zwischen Gold als Messprobe und 2Au-Aga1p belegt werden.

2.2 Systematische Probenahme, Untersuchung und Konditionierung gold-, palladium-, lanthan- bzw. europiumhaltiger Materialien aus primären und sekundären Lagerstätten, industriellen Abfall-Stoffströmen, bergbaulichen Abraumhalden und Tailing Ponds, inklusive Bestimmung kontinuierlicher Stoffströme und Zusammensetzungen bzw. Einschätzung von Diskontinuitäten

Die systematische Probenahme, Untersuchung und Konditionierung erfolgten in

- Schlammproben aus Bergwerksteichen → Revier am Zechenberg, Hohenstein-Ernstthal,

- Gneise und Schiefer des Silberbergbaus und Zinnerzbergbaus → Reviere Freiberg, Altenberg, Ehrenfriedersdorf,
- Schlämme, Haldensickerwässer → Proben von Haldensickerwässern, Drainagewässern aus Bergbaurevieren und Erzproben sind immer wieder neu beschaffbar,
- Europium, Lanthan aus Altbergbauhinterlassenschaften in Kirgistan (Tailings) → Proben liegen als Mischproben aus verschiedenen Tailingtiefen von jeweils 3 verschiedenen Tailingbecken der ehemaligen Buntmetallaufbereitung im Umfang von etwa 5 kg vor. Sie enthalten insbesondere Selten Erden Metalle im gesamten Spektrum von leicht, mittel und schweren Metallen,
- Erzproben als Festgestein → Umfang ca. 5 kg aus dem Tagebau in Kutessay,
- Probenmaterial aus Lagerstätten in Nord-West Madagaskar → Anreicherung im Muttergestein u. REE in Laterit Verwitterungsdecke, Probenmaterial wird im November per Kurier erwartet,
- Tailingmaterial und Sickerwasser aus der Kupferaufbereitung polnischer Erze der Fa. KGHM, Pt und Pd enthaltend, wird nach Genehmigung noch beschafft.

Die Recherchen und aktiven Beschaffungsmaßnahmen von Probematerial haben gezeigt, dass es wichtig ist auch Material in die Untersuchungen einzubeziehen, das aus potentiellen Rohstoff- bzw. Sekundärrohstoffquellen kommt, wo jetzt schon aktive Untersuchungen laufen, die Wiederaufbereitung und Gewinnung von „Industriemetallen“ durchzuführen.

AP 3 Konstruktion und Selektion der Biokomponenten

3.1 Klonierung der Expressionsmodule mit in AP2.1 selektierten Peptiden, in die Xplor2 Expressionsplattform und Transformation in Auxotrophievarianten der Hefen *A. adenivorans*, *H. polymorpha* und *S. cerevisiae*

Voraussetzung für das Andocken der Gold-, Palladium-, Lanthan- bzw. Europium-bindenden Peptide auf der Hefe-Zellwandoberfläche ist deren Kopplung an zellwandgebundene Proteine. Hierfür wurde zunächst das aus *S. cerevisiae* bekannte Aga1p/Aga2p-Agglutinin-System bezüglich Eignung getestet (Fig. 16). Agglutinine sind Adhäsionsmoleküle, die Zell-Zell-Interaktionen, z. B. während des „Mating“ stabilisieren. Aga1p ist dabei die Verankerungsuntereinheit. Es ist ein stark glykosyliertes Protein mit N-terminalem Sekretionssignal und C-terminalem Signal für das Andocken eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers zur Aga2p-Fixierung an der Zellwand. Aga2p ist die Adhäsionsuntereinheit (Ligand für α -Agglutinin) und mit Aga1p über 2 Disulfidbrücken verbunden (Fig. 16).



Fig. 16: Aufbau und Lokalisation von Aga1p/Aga2p an der Zellwand-Oberfläche von *S. cerevisiae*.

Fig. 16: Aufbau und Lokalisation von Aga1p/Aga2p an der Zellwand-Oberfläche von *S. cerevisiae*.

Das Aga1p/Aga2p-Agglutinin-System bietet zwei Möglichkeiten der Lokalisation von rekombinanten Proteinen auf der Zellwandoberfläche. (1) Auf DNA-Ebene kann ein Zielgen (z.B. Gold- bzw. Palladium-bindendes Peptid codierendes Gen - *MP*) direkt mit dem 5'-Bereich des *AGA1*-Gens fusioniert werden. Das daraus resultierende rekombinante Genprodukt bestehend aus Gold- bzw. Palladium-bindender Peptid-Aga1p Fusion (*Mp-aga1p*) ist damit durch das Anheften des GPI-Ankers am C-terminalen Ende des Fusionsproteins an der Oberfläche des Hefezellwand lokalisiert (Fig. 17A). (2) Es wird eine Fusion des Bereiches vom codierenden Gold- bzw. Palladium-bindenden Peptid (*MP*) mit dem *AGA2*-Gen konstruiert. Hierbei wird neben dem Hybridgen *AGA2-MP* (ohne GPI-Anker codierender Region) auch das *AGA1*-Gen (mit GPI-Anker codierender Region) mit einem konstitutiven Promotor ausgerüstet und in die entsprechenden Hefen transformiert. Die transgenen Hefen sollten dann Aga1p mittels GPI-Anker auf der Zellwand-Oberfläche fest gebunden haben, während das Aga2-mpp über Disulfidbrücken an Aga1p bindet (Fig. 17B).

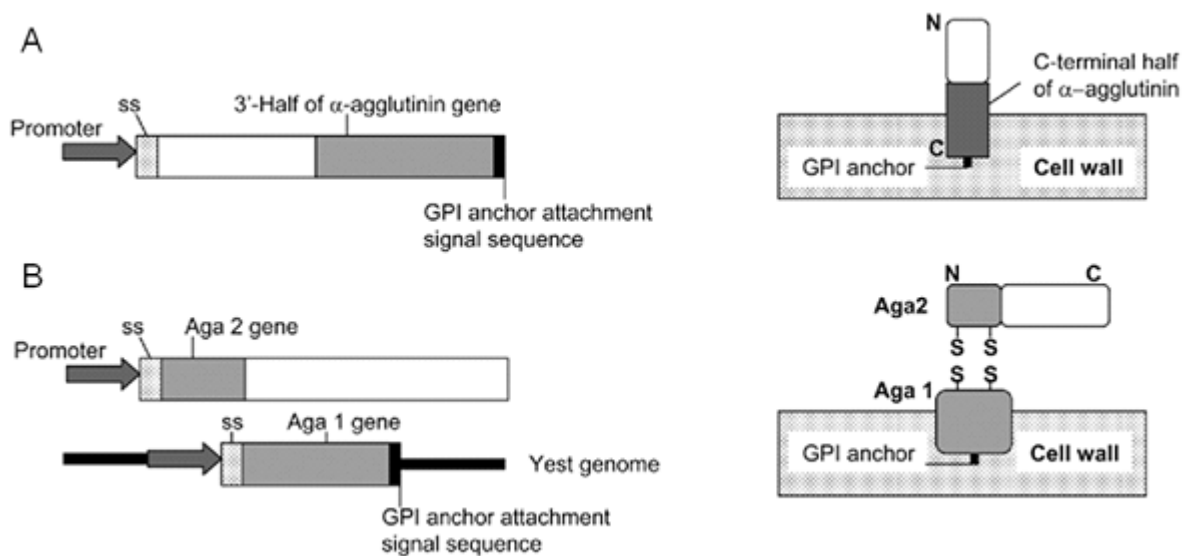


Fig. 17: Möglichkeiten des Andockens von Fusionsproteinen an der Zellwand-Oberfläche mit Hilfe des Aga1p/Aga2p-Systems (nach: A. Kondo, M. Ueda: Appl Microbiol Biotechnol (2004) 64: 28–40).

Für das Andocken der Gold- bzw. Palladium-bindenden Peptide auf der Zellwand-Oberfläche der Hefen wurden zunächst Aga1p-Fusionskonstrukte erstellt (*Mp-aga1p* – Fig. 18A). Um diese auch nachweisen zu können, wurden zusätzlich Konstrukte mit dem His-Tag codierenden Bereich bzw. dem *GFP*-Gen konstruiert (Fig. 18B).

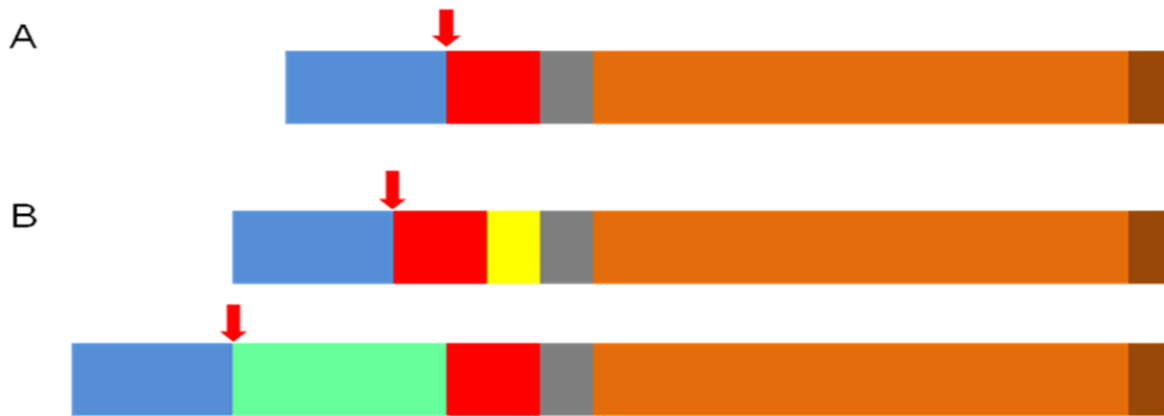


Fig. 18: Genfusionen bestehend aus Sekretionssignal (blau), welches abgespalten wird (Pfeil), codierendem Gold-, Palladium-, Lanthan- bzw. Europium-bindendem Peptid (rot), Linker (grau) und dem 3'-Ende vom *AGAI*-Gen (hellbraun) mit GPI Anker-Sequenz (dunkelbraun) (A). Dargestellt in (B) sind zusätzliche Konstrukte deren Genprodukte sich über einen internen His-Tag (gelb) bzw. GFP (grün) eindeutig lokalisieren lassen.

Fig. 18: Genfusionen bestehend aus Sekretionssignal (blau), welches vom resultierenden rekombinanten Protein abgespalten wird (Pfeil), codierendem Gold- bzw. Palladium-bindendem Peptid (rot), Linker (grau) und dem 3'-Ende vom *AGAI*-Gen (hellbraun) mit GPI Anker-Sequenz (dunkelbraun) (A). Dargestellt in (B) sind zusätzliche Konstrukte deren Genprodukte sich über einen internen His-Tag (gelb) bzw. GFP (grün) eindeutig lokalisieren lassen.

Die erstellten Konstrukte wurden in Form von Expressionsmodulen (d.h. flankiert mit einem starken Promotor und Terminator) zusätzlich mit einem Selektionsmarker-Modul ausgerüstet und per Sanger-Sequenzierung überprüft. Anschließend erfolgte deren Transformation in die Hefen *A. adenivorans*, *H. polymorpha* und *S. cerevisiae*. Von den erhaltenen potentiellen Transformanten wurden jeweils ca. 20 ausgesucht und per Southern-Hybridisierung bezüglich erfolgreicher Genom-Integration der aus Expressionsmodul und Selektionsmarker-Modul bestehenden Kassette überprüft. Dies wird durch mindestens eine zusätzliche Bande, über das Signal für das Wildtypgen hinaus, angezeigt (Fig. 19). Tab. 3 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Hefe-Transformanten.

Tab. 3: Übersicht über die erhaltenen Hefe-Transformanden mit Mp-aga1p.

Stamm		Konstrukt	interne Bezeichnung	Transformanden
<i>A. adeninivorans</i>	G1212	Au-AGA1	G1212/YRC102-Au-AGA1	59
		Au-HIS-AGA1	G1212/YRC102-Au-6H-AGA1	47
		Au-GFP-AGA1	G1212/YRC102-GFP-Au-AGA1	87
		Pd-AGA1	G1212/YRC102-Pd-AGA1	145
<i>S. cerevisiae</i>	SEY6210	Au-AGA1	SEY6210/YRC102-Au-AGA1	4
		Au-HIS-AGA1	SEY6210/YRC102-Au-6H-AGA1	7
		Au-GFP-AGA1	SEY6210/YRC102-GFP-Au-AGA1	3
		Pd-AGA1	SEY6210/YRC102-Pd-AGA1	19
<i>H. polymorpha</i>	RB11	Au-AGA1	RB11/YRC102-Au-AGA1	63
		Au-HIS-AGA1	RB11/YRC102-Au-6H-AGA1	39
		Pd-AGA1	RB11/YRC102-Pd-AGA1	40
				513

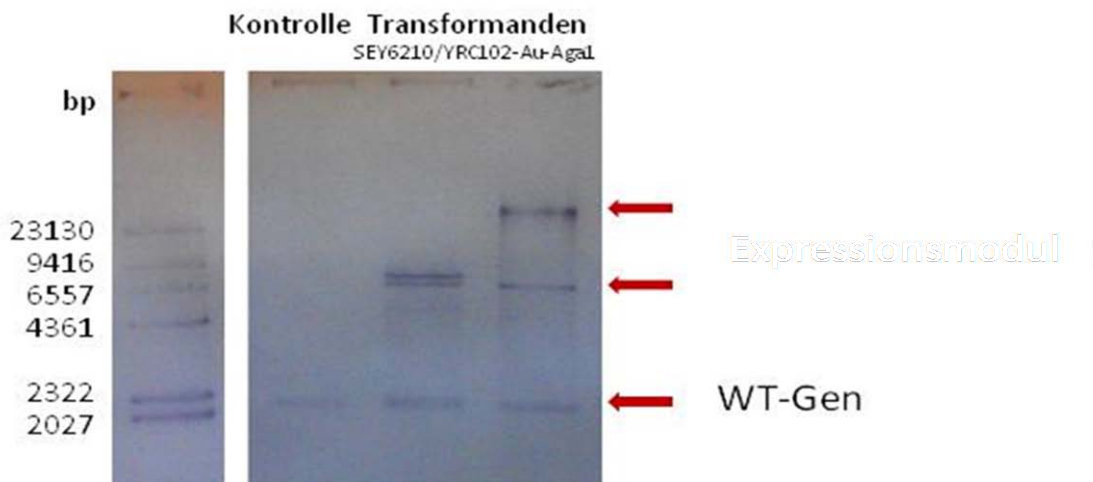


Fig. 19: Southern-Blot Analyse von *S. cerevisiae*-Transformanden. Die zusätzlichen Hybridisierungssignale im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle bestätigen die Integration der konstruierten Expressionsmodule ins Hefegenom.

Fig. 19: Southern-Blot Analyse von *S. cerevisiae*-Transformanden.

Für den Nachweis der erhaltenen rekombinanten Proteine an der Zellwand wurden zunächst Western-Blot Analysen durchgeführt. Die Fusionen mit internem His-Tag konnten nicht mit einem Anti-His-Tag-Antikörper nachgewiesen werden, da wie in Fig. 20A zu sehen, kein Signal mit der erwartenden Molekularmasse von ca. 35 kDa in den *A. adeninivorans*-Transformanden detektiert werden konnte. Mittels eines Anti-GFP-Antikörpers (Fig. 20B) konnten hingegen in den *GFP*-Gen enthaltenden *S. cerevisiae*-Stämmen Signale im erwarteten Bereich von ca. 63 kDa detektiert werden. Bei *A. adeninivorans*-Transformanden

war dies allerdings nicht der Fall. Hier gab es lediglich eine vermutlich unspezifische Kreuzhybridisierung des Antikörpers, was zu einem Signal bei 35 kDa führte.

Die *GFP*-Gen enthaltenden *S. cerevisiae*-Stämme wurden zusätzlich per Fluoreszenzmikroskopie auf das Vorhandensein des GFP untersucht, um die Ergebnisse der Western-Blots (Fig. 20B) zu verifizieren. Hier konnte, wie in Fig. 21 gezeigt, die grüne Fluoreszenz vom GFP detektiert werden.

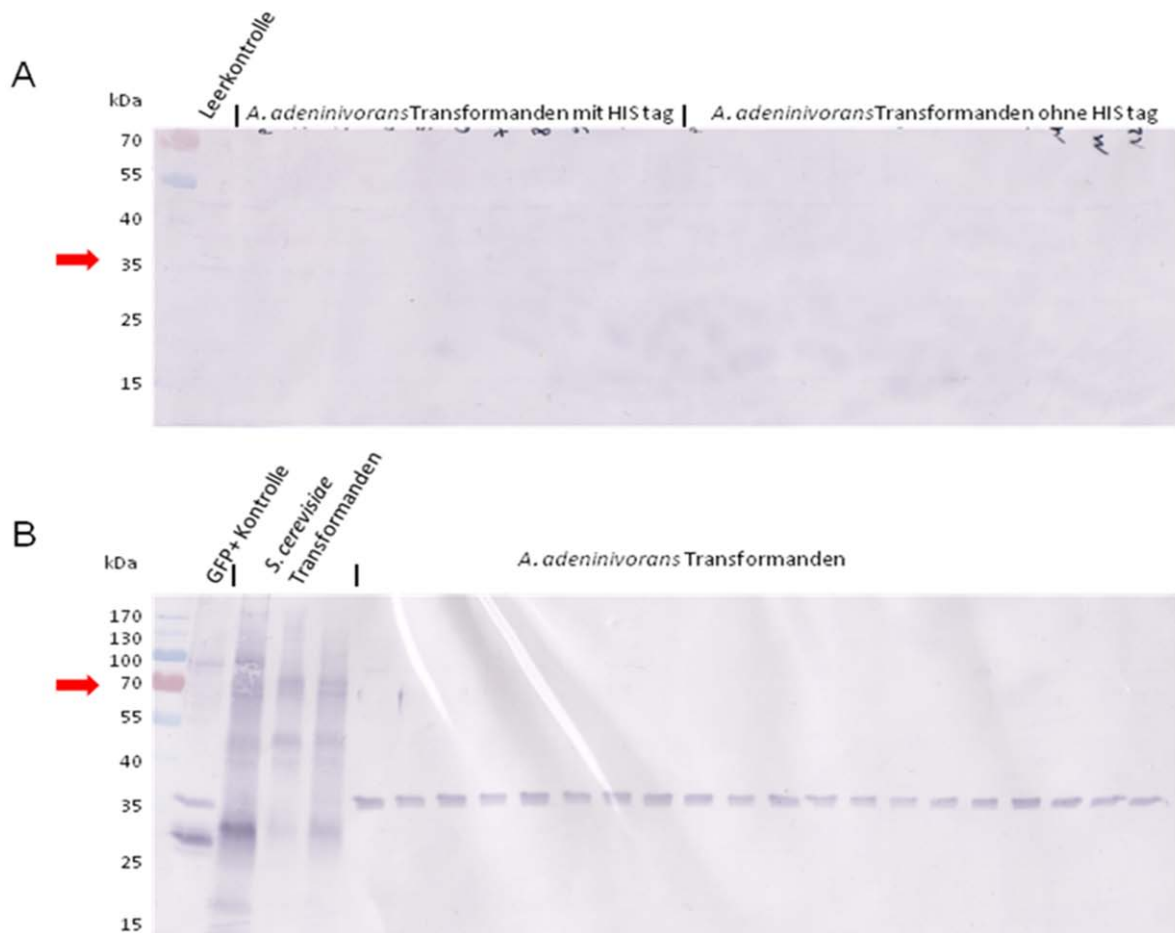


Fig. 20: Western-Blots zum Nachweis der Fusionskonstrukte auf der Zellwand von Hefetransformanden über His-Tag (A) bzw. mit Anti-GFP Antikörper (B). Die Pfeile zeigen die erwarteten Molekularmassen der Proteine.

Fig. 20: Western-Blots zum Nachweis der Fusionskonstrukte mit (A) His-Tag bzw. (B) GFP auf der Zellwand von Hefetransformanden über Anti-His-Tag Antikörper (A) bzw. Anti-GFP Antikörper (B). Die Pfeile zeigen die erwarteten Molekularmassen der Proteine.

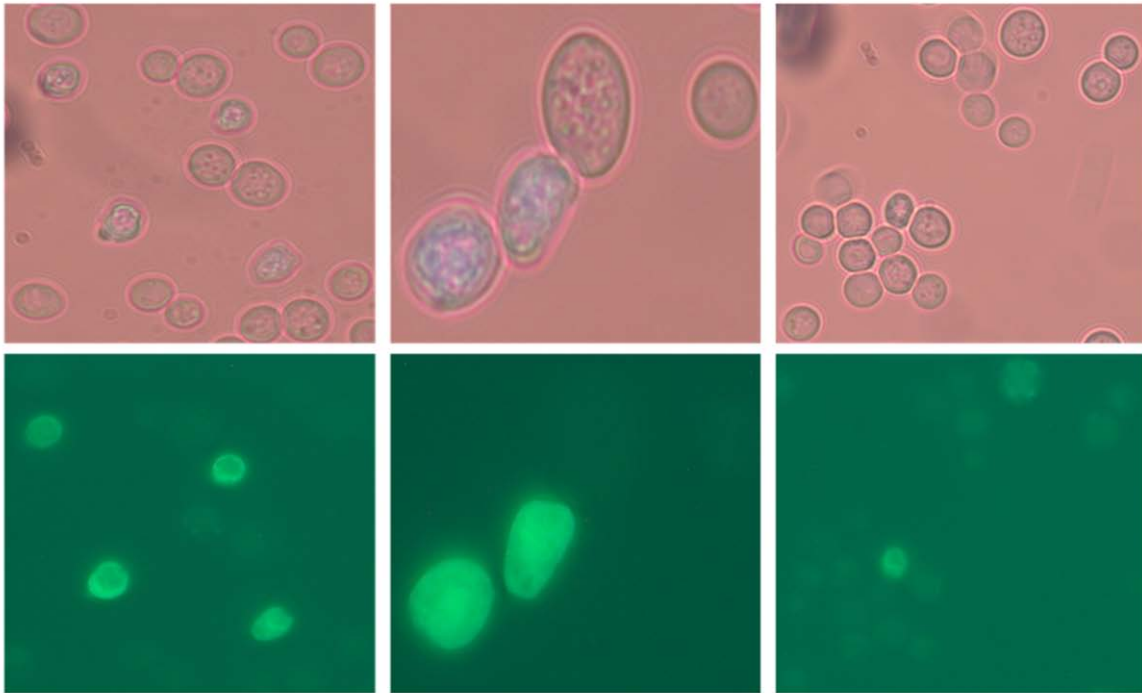


Fig. 21: Mikroskopische Aufnahmen von *S. cerevisiae*-Transformanten mit einer GFP-Aga1p Fusion im Hellfeld (oben) und entsprechender Fluoreszenzmikroskopie (unten).

Fig. 21: Mikroskopische Aufnahmen von *S. cerevisiae*-Transformanten mit einer GFP-Aga1p Fusion im Hellfeld (oben) und entsprechender Fluoreszenzmikroskopie (unten).

Über die GFP-Aga1p-Fusionen hinaus wurden Transformanten mit rot bzw. gelb fluoreszierenden Proteinen erzeugt (Tab. 4). Auch hier wurden die entsprechenden Fluoreszenzen nachgewiesen (Fig. 22). Allerdings konnte dazu kein eindeutiges Spektrum zugeordnet und somit die Lokalisation auf der Zellwand nicht zweifelsfrei bestätigt werden.

Tab. 4: Übersicht über die Hefe-Transformanten für Aga1p mit fluoreszierenden Proteinen.

Stamm		Konstrukt	interne Bezeichnung	Transformanten
<i>A. adenivorans</i>	G1212	dsRed-Au-ohne HIS-Tag-AGA1	G1212/YRC102-dsRed-Au-AGA1	103
		YFP-Au-ohneHIS-Tag-AGA1	G1212/YRC102-YFP-Au-AGA1	143
<i>S. cerevisiae</i>	SEY6210	dsRed-Au-ohneHIS-Tag-Aga1	SEY6210/YRC102-dsRED-Au-AGA1	90
		YFP-Au-ohneHIS-Tag-Aga1	SEY6210/YRC102-YFP-Au-AGA1	206
				542

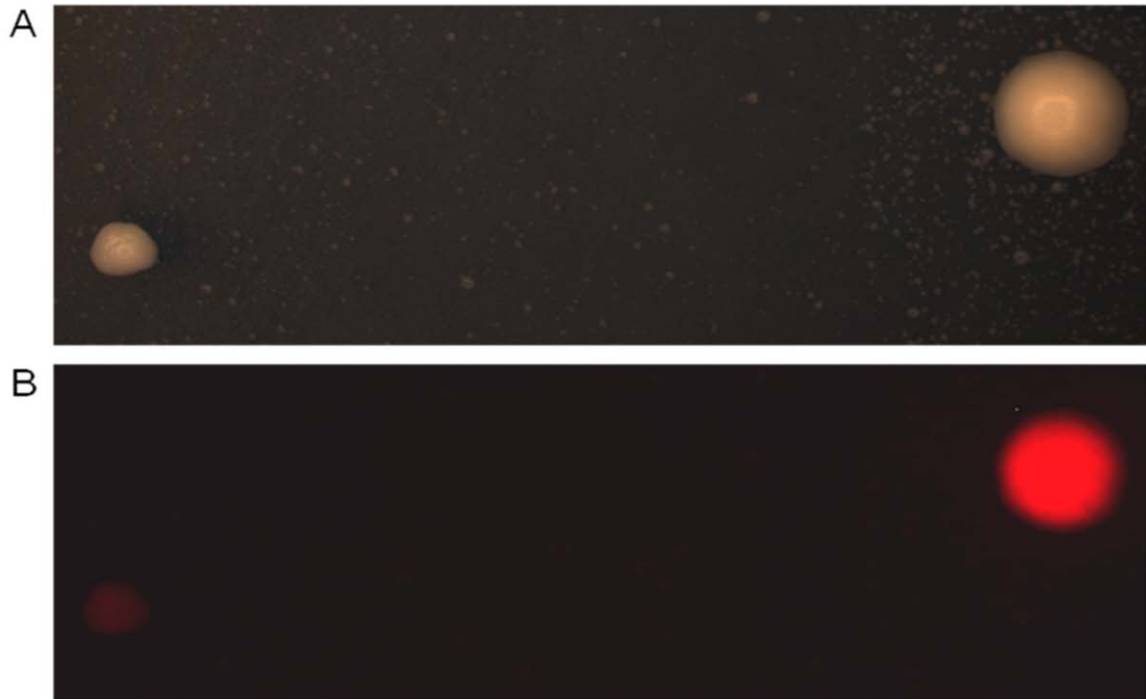


Fig 22: Kolonien von dsRED-Au-ohneHIS-Tag-Aga1 Transformanden (*S. cerevisiae*) im Hellfeld (A) und fluoreszierend (B).

Fig 22: Kolonien von dsRED-Au-ohneHIS-Tag-AGA1 Transformanden (*S. cerevisiae*) im Hellfeld (A) und fluoreszierend (B).

Alternativ zum direkten Nachweis von Aga1p-Fusionen auf der Zellwand-Oberfläche wurde auch die in Fig. 17B gezeigte Strategie angewendet. Hierfür wurden das endogene *AGA1*-Gen und verschiedene Fusionen mit dem *AGA2*-Gen (Fig. 23) konstitutiv exprimiert. Der Nachweis der daraus resultierenden rekombinanten Proteine über Fluoreszenzdetektion verlief wie bei den bereits beschriebenen Beispielen.

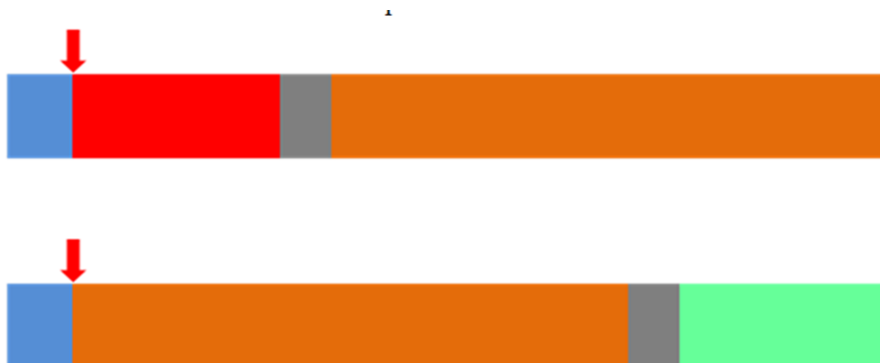


Fig. 23: Genfusionen bestehend aus Sekretionssignal (blau), welches vom resultierenden rekombinanten Protein abgespalten wird (Pfeil), *AGA2*-Gen (orange), Linker (grau) und dem *dsRed*-Gen (rot) bzw. dem *GFP*-Gen (grün).

Fig. 23: Genfusionen bestehend aus Sekretionssignal (blau), welches vom resultierenden rekombinanten Protein abgespalten wird (Pfeil), *AGA2*-Gen (orange), Linker (grau) und dem *dsRed*-Gen (rot) bzw. dem *GFP*-Gen (grün).

Leider gelang der Nachweis mittels fluoreszierender Proteine nicht immer eindeutig. Aus diesem Grund wurde versucht, Fusionsproteine mit enzymatischer Aktivität für diese Tests zu nutzen. So ist die Messung der Phytase-Aktivität relativ einfach durchführbar, was durch die

Kombination mit Aga1p als auch Aga2p mit Phytase K bezüglich Eignung getestet werden sollte (Fig. 24).



Fig. 24: Genfusionen bestehend aus Sekretionssignal (hellgelb), welches von resultierenden rekombinanten Protein abgespalten wird (Pfeil), *phyk*-Gen (gelb), Linker (grau), *AGA1*- bzw. *AGA2*-Gen (orange) und Sequenz für den GPI-Anker (braun).

Fig. 24: Genfusionen bestehend aus Sekretionssignal (hellgelb), welches von resultierenden rekombinanten Protein abgespalten wird (Pfeil), *phyk*-Gen (gelb), Linker (grau), *AGA1*- bzw. *AGA2*-Gen (orange) und Sequenz für den GPI-Anker (braun).

Hierbei zeigte sich, dass beim Kontrollstamm *A. adenivorans* G1212/YRC102 jeweils ca. 50% der gesamten endogenen Phytase-Aktivität an den Zellen bzw. im Kulturüberstand nachweisbar war. Bei den Transformanten, die die in Fig. 24 gezeigten Fusionskonstrukte exprimieren, war die aus endogener und rekombinanter Phytaseaktivität zusammengesetzte Gesamt-Phytaseaktivität deutlich höher (Fig. 25 und 26). Außerdem war die Phytaseaktivität bevorzugt an den Zellen und nicht im Überstand detektierbar (Fig. 25). Dies dokumentiert, dass sich die rekombinanten Fusionsproteine über den GPI-Anker (Aga1p) bzw. per Interaktion mittels Disulfidbrücken (Aga2p) an der Zellwand der Hefen angelagert haben.

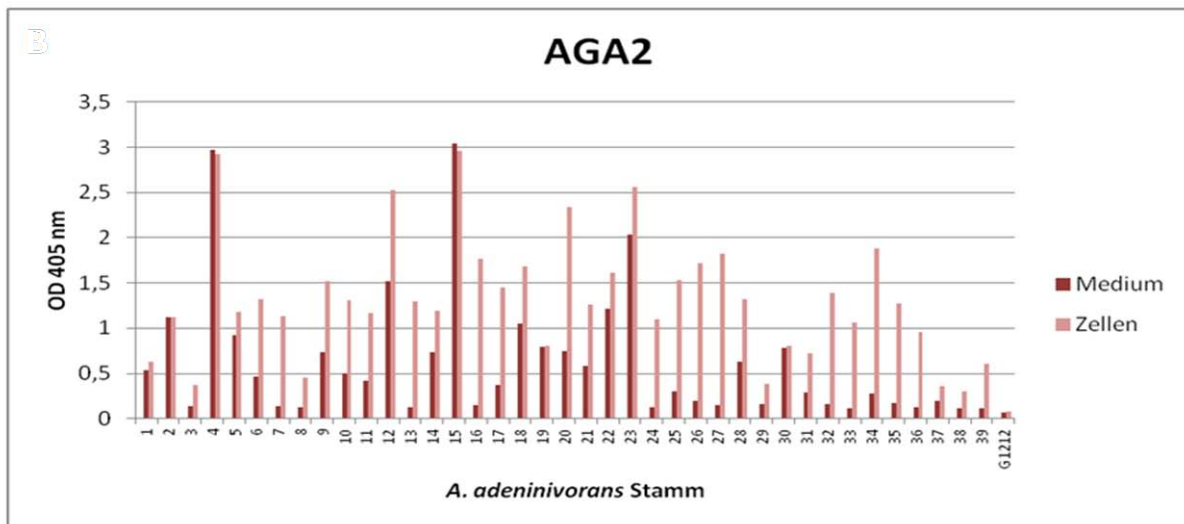
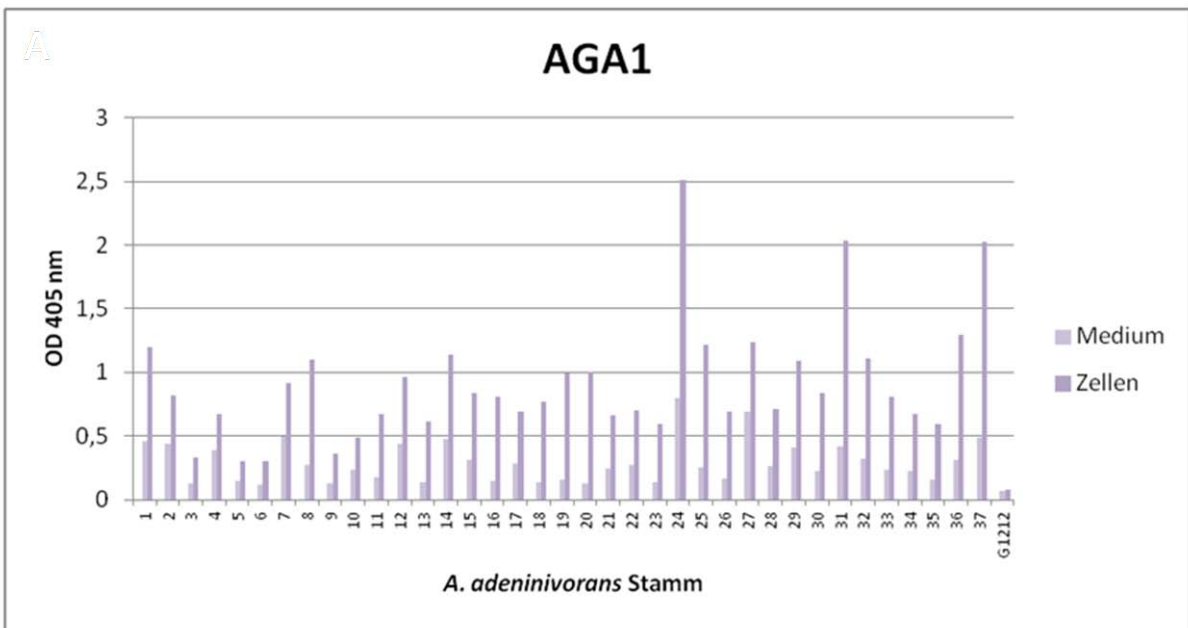


Fig. 25: Absolute PhytaseK-Aktivität in den *A. adenivorans*-Transformanten, die PhytaseK als Fusionsprotein mit Aga1p (A) bzw. Aga2p (B) synthetisieren, im Vergleich zum Kontrollstamm *A. adenivorans* G1212/YRC102.

Fig. 25: Absolute Phytase-Aktivität in den *A. adenivorans*-Transformanten, die rekombinante PhytaseK als Fusionsprotein mit Aga1p (A) bzw. Aga2p (B) synthetisieren, im Vergleich zum Kontrollstamm *A. adenivorans* G1212/YRC102, der nur die endogene Phytase synthetisiert.

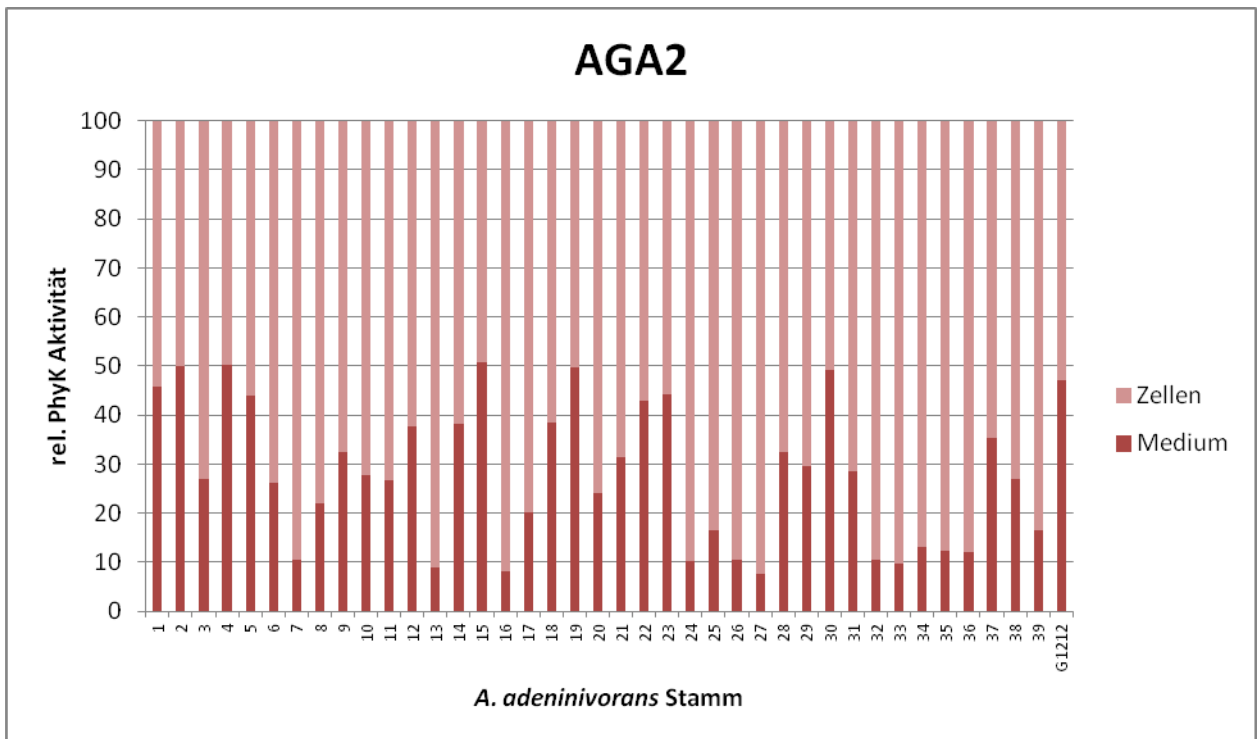
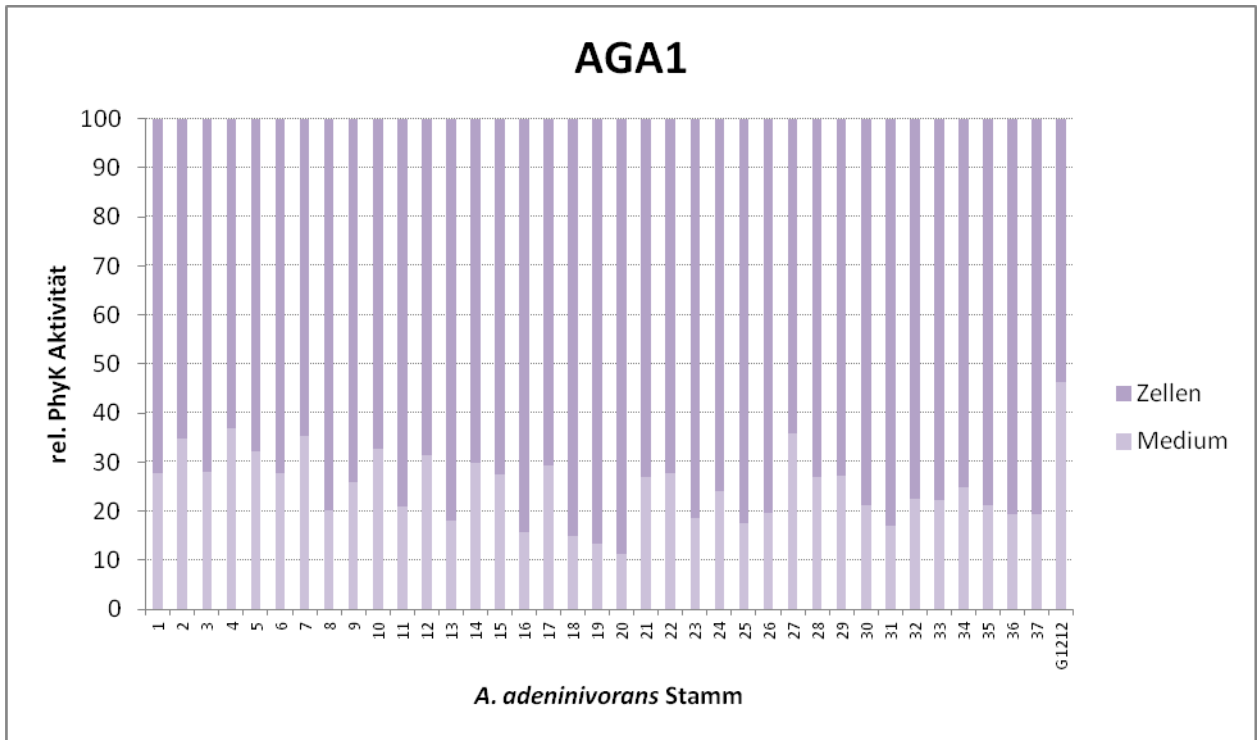


Fig. 26: Relative Phytase-Aktivität in den *A. adenivorans*-Transformanten, die PhytaseK als Fusionsprotein mit Aga1p (A) bzw. Aga2p (B) synthetisieren im Vergleich zum Kontrollstamm *A. adenivorans* G1212/YRC102.

Für Aga2p wurden darüber hinaus Konstrukte erstellt, die die Sequenzinformation für das Bindepeptid mehrfach enthielten. Hierfür wurde ein Primer für die PCR so konzipiert, dass er bei jedem Zyklus die Sequenz für ein zusätzliches Peptid anhängt (Fig. 27).



Fig. 27: Genfusionen bestehend aus Sekretionssignal (blau), welches von resultierenden rekombinanten Protein abgespalten wird (Pfeil), *AGA2*-Gen (orange), Linker (grau) und codierender Region für das Gold-, Palladium-, Lanthan- bzw. Europium-Bindepeptid (rot).

Fig. 27: Genfusionen bestehend aus Sekretionssignal (blau), welches von resultierenden rekombinanten Protein abgespalten wird (Pfeil), *AGA2*-Gen (orange), Linker (grau) und codierende Region für das Gold- bzw. Palladium-Bindepeptid (rot).

Die *A. adeninivorans*-Transformanten für rekombinante GFP-Aga1p-Fusionen (Fig. 20B) weisen ein von den *S. cerevisiae*-Stämmen abweichendes Hybridisierungssignal auf, das bezüglich Molekularmasse nicht der berechneten Masse entspricht. Ursache hierfür könnte eine nicht-korrekte Prozessierung des Fusionsproteins in *A. adeninivorans* sein. Um dies zu prüfen, wurden zusätzliche Fusionskonstrukte mit dem *A. adeninivorans* eigenen *AGAS1*-Gen konstruiert, das das putative zellwandständige Agas1p codiert. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die *GAS*-Genfamilie aus 5 Genen besteht. *GAS1* kodiert eine β -1,3-Glucanosyltransferase, die auf der Zellwand lokalisiert ist und eine wichtige Funktion bei der Zellwand-Assemblierung spielt. Bei den im Rahmen der Projektarbeiten erstellten Konstrukten (Fig. 28) wurden zwei unterschiedliche Sekretionssignale verwendet. Zum einen, die endogene Sequenz vom *GAS1*-Gen und zum anderen der *MAT α* -Leader von *S. cerevisiae*. Insgesamt wurden über 500 *A. adeninivorans*- bzw. *S. cerevisiae*-Transformanten mit *GAS1*-ausgestatteten Expressionsmodulen erhalten (Tab. 5).



Fig. 28: Genfusionen bestehend aus Sekretionssignal (hellblau *MAT α* -Leader, dunkelblau SS von *GAS1*), welches vom resultierenden rekombinanten Protein abgespalten wird (Pfeil), *GFP*-Gen (grün), Gold- bzw. Palladium-bindender Peptid-codierender Bereich (rot), Linker (grau) und *GAS1*-Gen (hellviolett) mit Sequenz für den GPI Anker (braun).

Tab. 5: Übersicht über die mit den Genen *GAS1* und *GFP* ausgerüsteten *S. cerevisiae*- und *A. adenivorans*-Transformanden.

Stamm		Konstrukt	interne Bezeichnung	Transformanden
<i>A. adenivorans</i>	G1212	Mata-GFP-Au-AGAS1	G1212/YRC102-SS-Mata-GFP-Au-AGAS1	133
		AGAS1Leader-GFP-Au-AGAS1	G1212/YRC102-SS-AGAS1-GFP-Au-AGAS1	159
<i>S. cerevisiae</i>	SEY6210	SS Mata-GFP-Au-AGAS1	SEY6210/YRC102-SS-Mata-GFP-Au-AGAS1	90
		SS AGAS1-GFP-Au-AGAS1	SEY6210/YRC102-SS-AGAS1-GFP-Au-AGAS1	125
				507

Für den Nachweis von rekombinanten GFP wurde ein neuer Ansatz getestet. Dazu wurden die Hefen nach ihrer Anzucht in unterschiedlichen Verdünnungsstufen in Mikrotiterplatten pipettiert und mit Hilfe des Infinite M200 (Tecan) Mikroplatten-Readers die Emission nach Anregung des GFP detektiert. Für die Transformanden konnte bei diesen Versuchen kein erhöhtes Fluoreszenzsignal gemessen werden (Fig. 29).

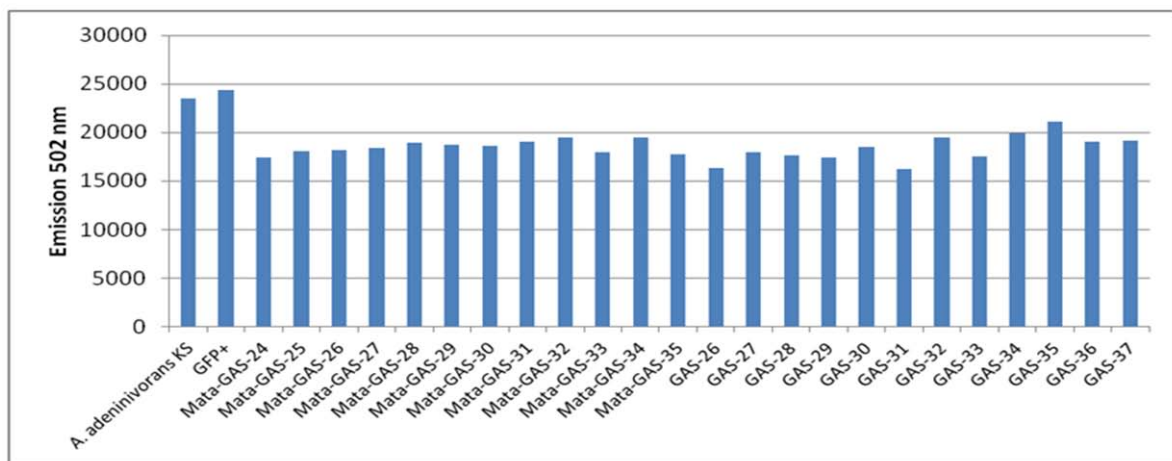


Fig. 29: Analyse von *A. adenivorans* Transformanden für Aga2/GFP mittels Mikroplatten Reader. Sowohl Konstrukte mit MAT α -Leader (Mata-GAS-x) als auch mit GAS1 Signalsequenz (GAS-x) erbrachten keine höheren Fluoreszenzwerte als der GFP-freie Kontrollstamm (KS) bzw. die GFP-Positivkontrolle (GFP+).

Fig. 29: Analyse von *A. adenivorans*-Transformanden für Aga2p/GFP mittels Mikroplatten-Reader. Sowohl Konstrukte mit MAT α -Leader (Mata-GAS-x) als auch mit GAS1 Signalsequenz (GAS-x) erbrachten keine höheren Fluoreszenzwerte als der GFP-freie Kontrollstamm (KS) bzw. die GFP-Positivkontrolle (GFP+).

Zusätzlich wurde ein aus *A. adenivorans* stammendes Zellwand-Syntheseprotein als Ankerprotein eingesetzt, das dem Kre9p der Bäckerhefe ähnelt. Vorteil hierbei ist, dass die GPI-Ankersequenz sich weiter N-terminal befindet, was die Konstruktion von C-terminalen Fusionsproteinen ermöglicht. Hierbei bleibt auch die Signalsequenz analog zum nativen

Protein erhalten. Für den Nachweis der Zellwandlokalisierung des Fusionsproteins wurde ebenfalls dessen Enzymaktivität biochemisch detektiert. Dazu wurde eine aus *A. adenivorans* stammende Exo- β -1,3-glucanase, die zu >97% extrazellulär lokalisiert ist, mit dem entsprechenden Ankerprotein fusioniert (Fig. 30).



Fig. 30: Genfusion bestehend aus Sekretionssignal (hellgrau), welches von resultierenden rekombinanten Protein abgespalten wird (Pfeil), GPI-Anker-Domäne und Zellwandsyntheseprotein (von links nach rechts in Graustufen) sowie der Exo- β -1,3-glucanase codierenden Gensequenz (blau), verbunden durch eine Linkersequenz (schwarz).

Die auf Basis dieser Genfusion resultierenden Ergebnisse zeigten eine erhöhte β -Glucanase-Aktivität bei den transgenen Hefestämmen im Vergleich zum Kontrollstamm *A. adenivorans* G1212/YRC102 (Fig. 31). Die zellokalisierte/extrazelluläre Glucanase-Aktivität beträgt ca. 50% im Überstand und 50% an den Zellen (Fig. 31). Da gezeigt wurde, dass die Überexpression des *Glucanase*-Gens ohne GPI-Anker-Domäne zur nahezu 100%igen extrazellulären Lokalisation des rekombinanten Enzyms führt, deuten die Werte darauf hin, dass mehr Fusionsprotein mit der GPI-Ankerdomäne akkumuliert wird als die transgene Hefe an ihrer Zellwand binden kann.

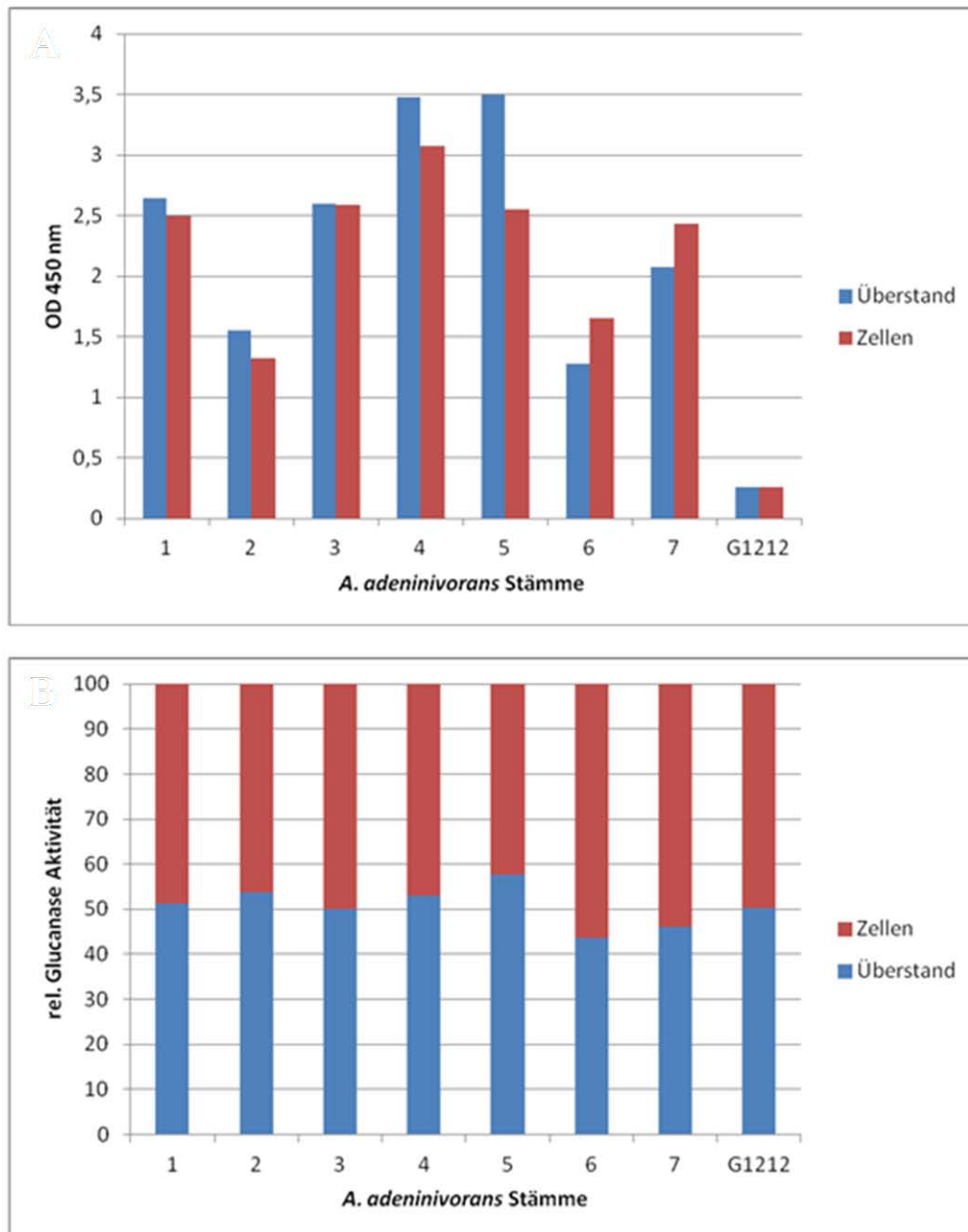


Fig. 31: Absolute (A) und relative (B) Glucanase-Aktivität in den transgenen *A. adenivorans*-Stämmen, die im Vergleich zum Kontrollstamm *A. adenivorans* G1212/YRC102 eine Glucanase als Fusionsprotein mit einem Zellwandsyntheseprotein akkumulieren.

Fig. 31: Absolute (A) und relative (B) Glucanase-Aktivität in den transgenen *A. adenivorans*-Stämmen, die im Vergleich zum Kontrollstamm *A. adenivorans* G1212/YRC102 eine Glucanase als Fusionsprotein mit einem Zellwandsyntheseprotein akkumulieren.

Insgesamt wurden im Rahmen des Projektes >1500 Transformanten generiert, die verschiedene putativ zellwandgebundene Ankerproteine (Aga1p, Aga2p, Agas1p, Zellwandsyntheseprotein) in Verbindung mit unterschiedlichsten Markern (fluoreszierende Proteine, His-Tag, Enzyme) synthetisieren.

3.2 Katalysatorwirkung natürlicher Bioorganismen wie Bakterien für den Aufschluss Seltener Erden und Edelmetalle; chemische Unterstützung als Vorstufe der Bioakkumulation mit Abgleich herkömmlicher Aufbereitungsstandards, chemisch-biochemische Wechselwirkungen

Anhand bisheriger Recherchen sind grundsätzlich zwei Ansätze zur Unterstützung der Metallextraktion durch biologische Katalyse denkbar. Basierend auf dem jeweils zugrunde liegenden Funktionsprinzip sind dies zum einen (1) Verfahren zur Oxidation einschließender sulfidischer Erze, zum anderen (2) die Bindung von PGM oder REE an biogene Substanzen zur Erhöhung der Löslichkeit und Aufkonzentration.

(1) Die mikrobielle Oxidation sulfidischer Erze ist gegenwärtig bereits Stand der Technik zur Gewinnung von Buntmetallen aus refraktären, gering konzentrierten Erzen. Die geringen Kosten dieses Verfahrens, insbesondere in der Haufenlaugung refraktärer Primärerze oder zunehmend auch in der Laugung von Halden des Altbergbaus ermöglichen eine ökonomische Gewinnung der Rohstoffe. Obwohl Seltene Erden Metalle, Gold und andere Platin-Gruppen Metalle selbst nicht durch den mikrobiellen Stoffwechsel oxidiert werden können, kann die Extraktion dieser Metalle durch die zielgerichtete Förderung des Wachstums von Eisen-Schwefel-Bakterien gefördert werden. Speziell in der Gewinnung refraktärer Golderze gibt es bereits verschiedene Verfahren der mikrobiellen Katalyse. Die sogenannte Biooxidation als erster Schritt zur Aufbereitung refraktärer Golderze wird beispielsweise im kommerziellen Verfahren BIOX® (Firma Goldfields, www.goldfieldsbioonline.co) weltweit angewandt. Aufgrund des hohen Wertes der Zielmetalle ist in diesem Fall auch der Einsatz von Tanklaugung ökonomisch darstellbar. Aufgrund jahrzehntelanger Forschung sind die mikrobiellen und physikalisch-chemischen Grundlagen mikrobieller-schwefelsaurer Laugung weitestgehend bekannt [1,2]. Der Einsatz dieses Verfahrens ist grundsätzlich für alle Rohstoffquellen geeignet, in denen die Zielmetalle durch sulfidische, durch Oxidation und Säure zu lösliche Mineralien eingeschlossen sind. Zu prüfen sind im weiteren Verlauf daher (i) inwieweit ein Einschluss der Zielmetalle in sulfidische Minerale vorliegt, (ii) welche indigenen Mikroorganismen bereits vorhanden sind und durch Maßnahmen wie Belüftung oder Ansäuerung in ihrer Aktivität gefördert werden können, (iii) welche weiteren Maßnahmen z.B. die gezielte Beimpfung mit schwermetall-resistenteren Spezies zur Freisetzung der Zielmetalle beitragen können.

(2) Die Bindung von PGM oder REE an biogene Substanzen zur Erhöhung der Löslichkeit und Aufkonzentration kann die Gewinnung insbesondere der schwer löslichen und in Tailingsuspensionen sehr dispersen Platin-Gruppen und Seltene Erden Metalle unterstützen. Bereits nachgewiesen sind in diesem Zusammenhang verschiedene Möglichkeiten zur Rückgewinnung von gelöstem und metallischem Gold aus den unterschiedlichsten Lösungen durch ausgewählte Bakterien, Hefen, Pilze Algen und höheren Pflanzen [3]. So wurden Goldanreicherungergebnisse durch Akkumulation einschließlich der separaten Prozesse der Oxidation, Lösung, Reduktion, Laugung und Sorption in Abhängigkeit des physiko-chemischen Milieus erreicht. Lebende oder tote Algen-Zellen können aus Lösungen Au^{3+} -Ionen akkumulieren und innerhalb von 2 Tagen zu Au^+ oder metallischem Gold reduzieren [30]. So wurden bei einer Zugabe von Gold zu *Chlorella vulgaris* mit einer Lösung von 20 mg Au^{3+} /l bis zu 16,5 g Au/kg Algentrockenmasse akkumuliert. Auch für die Extraktion Seltener Erden existieren verschiedenste Belege zur Akkumulation mittels Mikroorganismen oder biogenen Substanzen in der Literatur. Besonders Pilze wie *Aspergillus niger* und einzellige Algen kommen aufgrund ihrer einfachen Kultivierbarkeit und nachgewiesenen Sorptionskapazitäten [4-6] für die Anreicherung von Gold, Palladium und Seltenen Erden sowohl in der Lösung als auch im Hinblick auf eine biologische Konzentrationsstufe vor der

Separation mit Hefen in Frage. In diesem Zusammenhang ist auch zu prüfen, inwieweit vorhandene Eisen-Schwefel-Bakterien Edelmetalle und REE binden.

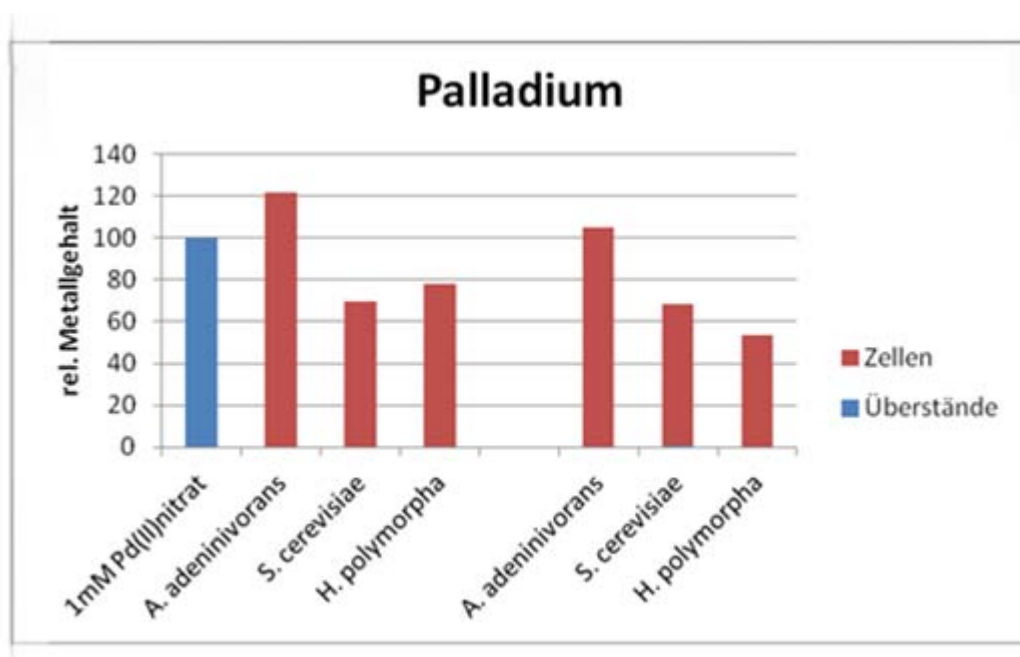
Die Eignung biogener komplexierender Reagenzien oder Chelatoren zur Lösung Seltener Erden oder PGM, häufig auch als heterotrophe Laugung bezeichnet, wurde ebenfalls in verschiedenen Publikationen nachgewiesen und hätte gegenüber der Verwendung intakter Zellen den Vorteil, dass keine Gefahr der unbeabsichtigten Akkumulation in Biofilmen innerhalb der Tailings bestünde. Die Steigerung der Extraktion beruht dabei zum einen auf der Lösung adsorptiv gebundener Metallionen durch stärkere Wechselwirkungen mit den Lösungs-Substanzen, zum anderen in der höheren Löslichkeit des Komplexes gegenüber der des Metallions, welche ein Ausfallen/ Auskristallisieren aus der Lösung verhindern kann. So können beispielsweise Acet-Aminogruppen in biogenen Substanzen wie Chitin, als Chelatoren für Seltene Erden fungieren [7]. Des Weiteren sind organische Säuren wie Zitronen-, Oxal- und Glucon-Säure nachweislich geeignet um REE und PGM zu komplexieren/ in Lösung zu bringen [8]. Eine Vielzahl wissenschaftlicher Ansätze beschäftigt sich in diesem Zusammenhang insbesondere auch mit der selektiven Gewinnung von PGM und REE aus Abwässern, industriellen Abfällen/Schlamm und Bergbaurückständen [8]. Eine wesentliche Erkenntnis neben dem Nachweis der prinzipiellen Funktionalität dieser Extraktionsprozesse ist, dass die industrielle Machbarkeit derartiger Prozesse eine optimierte und kostengünstige Produktion der Biosubstanzen erfordert [9-10]

- [1] JOHNSON, D. B. (2013). Development and application of biotechnologies in the metal mining industry. *Environmental Science and Pollution Research International*. <http://doi.org/10.1007/s11356-013-1482-7>
- [2] VERA, M., SCHIPPERS, A., & SAND, W. (2013). Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7529–41. <http://doi.org/10.1007/s00253-013-4954-2>
- [3] DAS, N. (2010). Recovery of precious metals through biosorption – A review, *Hydrometallurgy* 103 (2010) S. 180 - 189
- [4] COLICA G., CAPARROTTA S., et al. (2012): Gold biosorption by exopolysaccharide producing cyanobacteria and purple non sulfur bacteria. *J Appl Microbiol*.
- [5] TEXIER A.-C., ANDRÈS Y., LE CLOIREC P. (1999): Selective Biosorption of Lanthanide (La, Eu, Yb) Ions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Sci. Technol.* 33(3), 489–495.
- [6] KUYUCAK, N., VOLESKY, B. (1988). Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions. *Biotechnology Letters* 10 (2), 137–142.
- [7] VIJAYARAGHAVAN, K., & BALASUBRAMANIAN, R. (2010). Single and binary biosorption of cerium and europium onto crab shell particles. *Chemical Engineering Journal*, 163(3), 337–343. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2010.08.012>
- [8] ZHUANG, W.-Q., FITTS, J. P., AJO-FRANKLIN, C. M., MAES, S., ALVAREZ-COHNE, L., & HENNEBEL, T. (2015). Recovery of critical metals using biometallurgy. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 327–335. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.019>
- [9] DENG X, CHAI L, YANG Z, TANG C, WANG Y, SHI Y. (2013): Bioleaching mechanism of heavy metals in the mixture of contaminated soil and slag by using indigenous *Penicillium chrysogenum* strain F1. *J Hazard Mater*, 248–249:107-114.
- [10] Lenz K, Koellensperger G, Hann S, Weissenbacher N, Mahnik SN, Fuerhacker M: Fate of cancerostatic platinum compounds in biological wastewater treatment of hospital effluents. *Chemosphere* 2007, 69:1765-1774.

AP 4 Anpassung der Biokomponenten an die Aufbereitungsprozedur

4.1 Analyse der Wertstoffakkumulation (Gold bzw. Palladium) durch die etablierten Hefezelllinien unter verschiedenen Bedingungen anhand von Mustersubstanzen und Selektion der geeignetsten Stämme

Für erste Untersuchungen zur Wertstoffakkumulation (Gold, Palladium) wurden definierte Metalllösungen (je 1 mM Palladium(II)nitrat bzw. Gold(III)chlorid) mit Hefen-Wildtypstämmen von *A. adeninivorans*, *H. polymorpha* und *S. cerevisiae* inkubiert. Dazu wurden die Hefezellen für 4 bzw. 24 h in Hefe-Vollmedium (HVM) kultiviert, um aus der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase stammende Zellen auf ihre Akkumulationsfähigkeit (Gold, Palladium) zu analysieren. Die Hefezellen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten geerntet, gewaschen und für 30 min bei 30°C in 5 mL der jeweiligen Gold- bzw. Palladium-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt zur Trennung der Zellen vom Medium, das direkt bezüglich Gold- und Palladium-Akkumulation analysiert wurde. Parallel wurde das Hefepellet lyophilisiert, dessen Trockengewicht ermittelt, ein Aliquot in Salpetersäure gelöst und mittels Atomspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AAS) auf Akkumulation von Gold und Palladium analysiert. In Fig. 32 sind die gemessenen Gold- und Palladium-Konzentrationen relativ zur ursprünglich eingesetzten Ausgangskonzentration dargestellt.



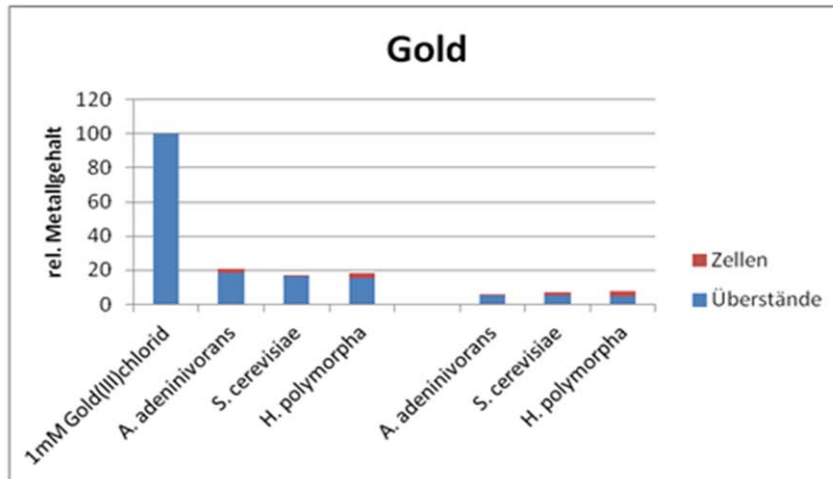


Fig. 32: ICP-AAS-Analyse der Wildtyphefen *A. adenivorans*, *H. polymorpha* und *S. cerevisiae* nach Inkubation in Palladium- (A) bzw. Goldhaltiger-Lösung (B). Die gemessenen Palladium- bzw. Gold-Konzentrationen sind relativ zu deren Konzentrationen in der Ausgangslösung dargestellt. Jeweils linksseitig im Diagramm sind die Werte für exponentiell wachsende Hefezellen (4 h) und rechts für die Hefezellen aus der stationären Wachstumsphase (24 h) dargestellt.

Fig. 32: ICP-AAS-Analyse der Wildtyphefen *A. adenivorans*, *H. polymorpha* und *S. cerevisiae* nach Inkubation in Palladium- (A) bzw. Goldhaltiger-Lösung (B). Die gemessenen Palladium- bzw. Gold-Konzentrationen sind relativ zu deren Konzentrationen in der Ausgangslösung dargestellt. Jeweils linksseitig im Diagramm sind die Werte für exponentiell wachsende Hefezellen (4 h) und rechts für die Hefezellen aus der stationären Wachstumsphase (24 h) dargestellt.

Unabhängig aus welcher Wachstumsphase die Hefezellen stammen verhalten sie sich bezüglich Gold- und Palladium-Akkumulation ähnlich. Nach der Inkubation der *A. adenivorans*-, *H. polymorpha*- bzw. *S. cerevisiae*-Wildtyphefen in palladiumhaltiger Lösung konnten im Kulturüberstand nur noch Akkumulationswerte von <20% nachgewiesen werden (Fig. 32A). D. h. das Gold bzw. Palladium ist nahezu komplett an der Zellwand der Hefezellen gebunden. Im Gegensatz zum Palladium lässt sich jedoch vom Gold nur noch maximal 20% der Ausgangskonzentration in den Zellen + Überständen nachweisen. (Fig. 32B). Mögliche Ursache dieses Effektes ist, dass die Gold(III)-Ionen während der Inkubation mit den Hefezellen zu elementarem Gold reduziert werden und damit sich nicht mehr per Salpetersäurebehandlung in Lösung bringen lassen.

Analog wurde dieser Versuch mit den ersten transgenen *S. cerevisiae*-Stämmen, ausgerüstet mit Pd-Bindepeptid - Aga1p-Fusionen (Fig. 33) durchgeführt. Auch hier wurde Palladium in höheren Konzentrationen in der Zellfraktion gemessen als in der nicht-gebundenen Form. Dies bezieht sich insbesondere auf die Hefezellen aus der stationären Wachstumsphase (24 h - Fig. 33). Absolut waren die Akkumulationswerte allerdings geringer als beim Einsatz der Wildtyphefen (Fig. 32).

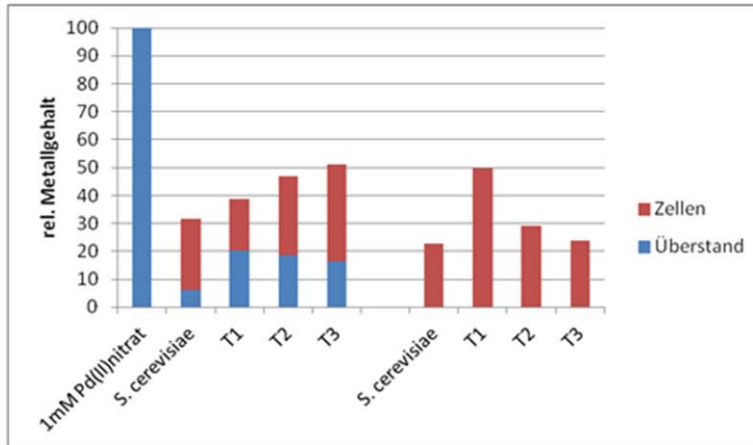


Fig. 33. 18: ICP-AAS-Analyse der *S. cerevisiae*-Transformanten (T1-T3 - SEY6210/YRC102-Pd-AGA1) im Vergleich zum Kontrollstamm *S. cerevisiae* SEY6210/YRC102 nach Inkubation in einer Palladium-Lösung. Die gemessenen Palladiumkonzentrationen sind relativ zur Metallkonzentration in der Ausgangslösung dargestellt. Jeweils linksseitig im Diagramm sind die Werte für Hefezellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (4 h), rechts für die aus der stationären Wachstumsphase (24 h).

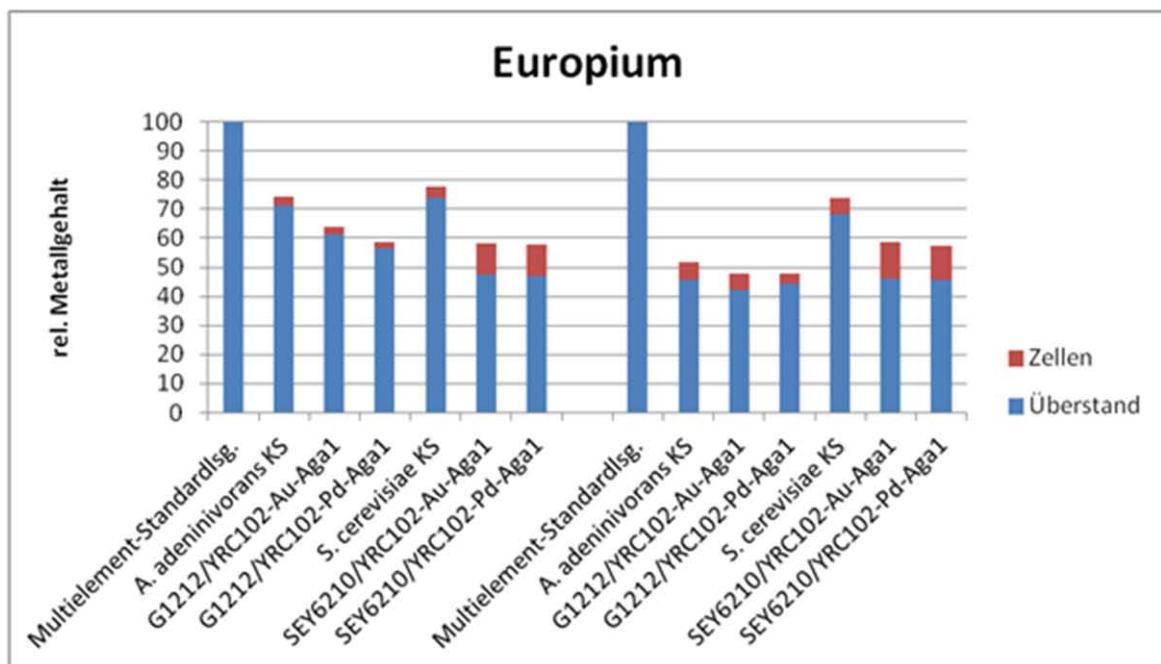
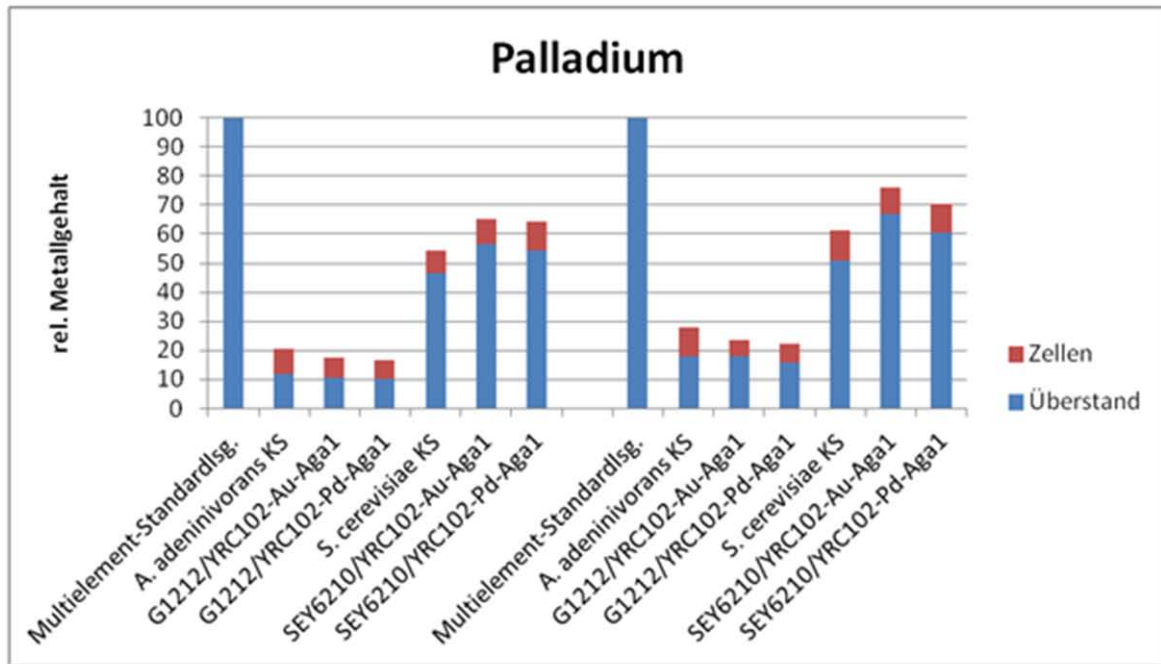
Fig. 33: ICP-AAS-Analyse der *S. cerevisiae*-Transformanten (T1-T3 - SEY6210/YRC102-Pd-AGA1) im Vergleich zum Kontrollstamm *S. cerevisiae* SEY6210/YRC102 nach Inkubation in einer Palladium-Lösung. Die gemessenen Palladium-Konzentrationen sind relativ zur Metallkonzentration in der Ausgangslösung dargestellt. Jeweils linksseitig im Diagramm sind die Werte für Hefezellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (4 h), rechts für die aus der stationären Wachstumsphase (24 h).

Um die Spezifität der Palladium-Akkumulation zu analysieren, wurde im nächsten Schritt ein Mix aus jeweils 5 mg/L Gold, Palladium, Europium und Lanthan (Multielementstandard-Lösung) als sog. simulierte Realprobe eingesetzt. In Fig. 34 sind die Ergebnisse des Bindungsassays dargestellt. Dazu wurden Hefezellen aus der stationären Wachstumsphase (24 h) für 5 bzw. 30 min mit der Multielementstandard-Lösung inkubiert. Als Biokomponenten wurden die transgenen Hefestämme *A. adenivorans* G1212/YRC102-Au-AGA1, G1212-Pd-AGA1 und *S. cerevisiae* SEY6210/YRC102-Au-AGA1 und SEY6210/Pd-AGA1 mit Gold- bzw. Palladium-Bindepeptid sowie die Kontrollstämme G1212/YRC102 und SEY6210/YRC102 eingesetzt (Fig. 34).

Unabhängig vom Bindeprotein waren in den transgenen *A. adenivorans*-Zellen nach der Inkubation mit der Multielementstandard-Lösung nur geringe Konzentrationen an Palladium in der nicht-gebundenen Form nachweisbar. Allerdings konnte vom Rest nur ein geringer Teil als Zell-gebundene Form detektiert werden. Eine vergleichbare Konzentration an Palladium bindet auch an die Zellen der *S. cerevisiae*-Transformanten. Hier verbleibt jedoch der größte Teil des Palladiums in der nicht-gebundenen Fraktion.

Europium, was als Kontrolle diente, wurde erhöht an den mit beiden Bindeproteinen (Gold- bzw. Palladium-Bindeprotein) ausgerüsteten *S. cerevisiae*-Transformanten akkumuliert, auch im Vergleich zum Kontrollstamm *S. cerevisiae* G1212/YRC102. Im Gegensatz dazu waren bei *A. adenivorans*-Stämmen keine signifikanten Unterschiede zwischen Transformanten mit und ohne Bindeprotein bezüglich Europium-Akkumulation detektierbar. Ähnlich verhält es sich mit der Bindung von Lanthan.

Auffällig bei allen Messungen war, dass die Summe der gemessenen Gold-, Palladium-, Europium -und Lanthan-Konzentrationen (zellgebunden + ungebunden) niedriger als in der Ausgangslösung (Multielementstandard-Lösung) war.



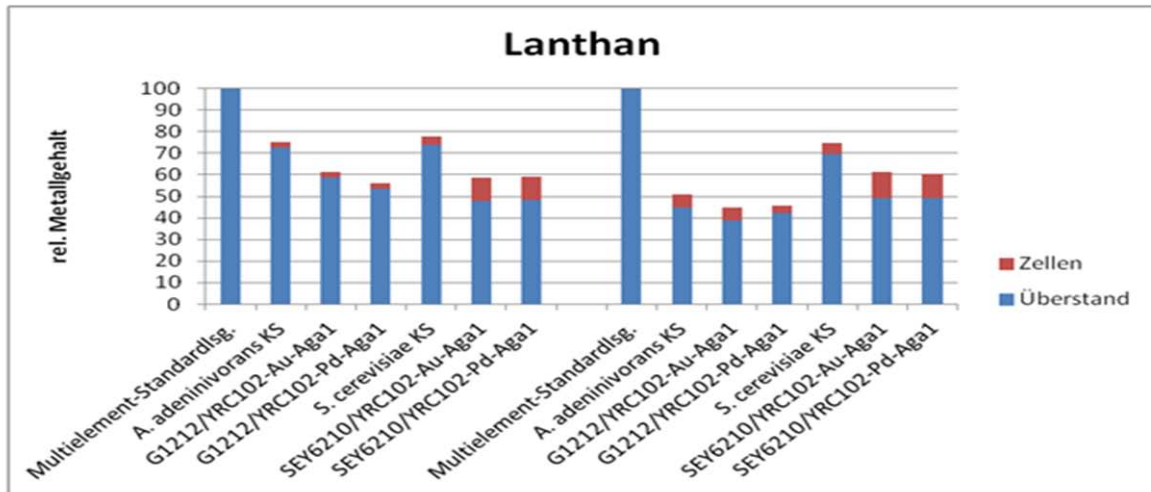
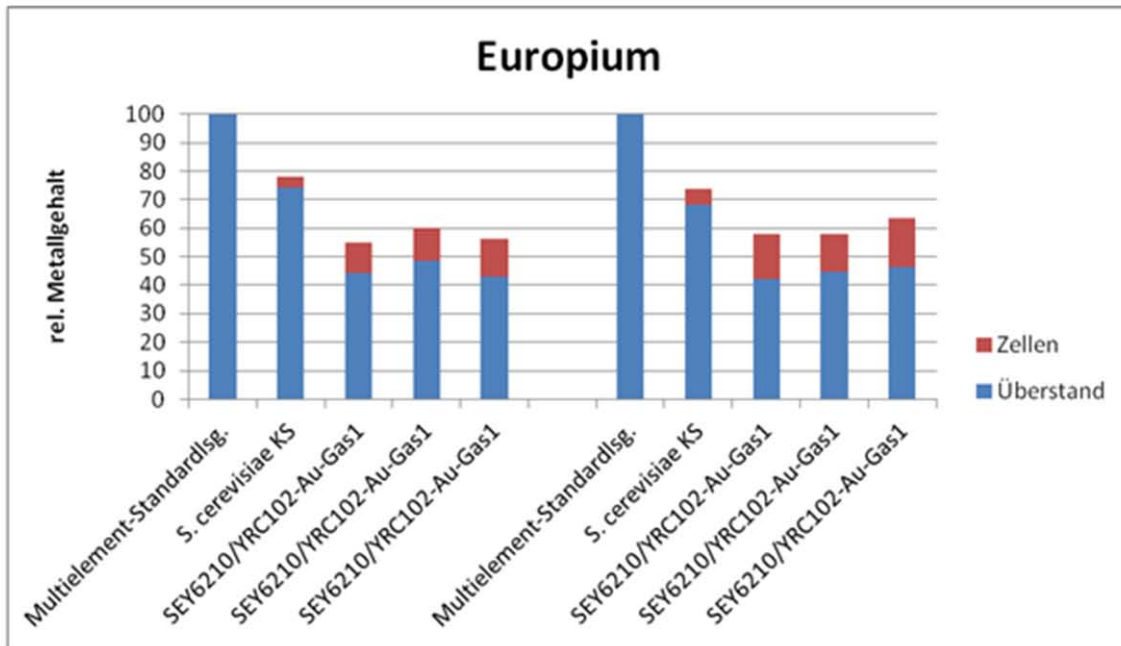
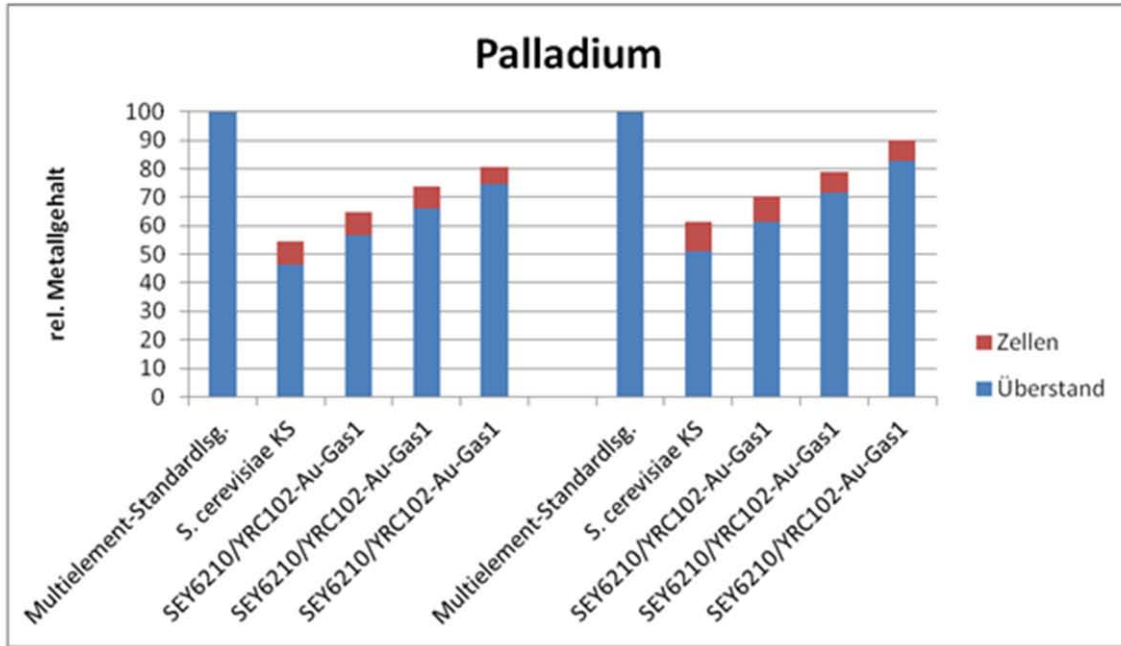


Fig. 34: Palladium-, Europium- und Lanthan-Akkumulation in den transgenen *A. adenivorans*-Stämmen G1212/YRC102-Au-AGA1 und G1212/YRC102-Pd-AGA1 bzw. *S. cerevisiae*-Transformanten SEY6210/YRC102-Au-AGA1 und SEY6210/YRC102-Pd-AGA1 im Vergleich zum Kontrollstamm (KS – *A. adenivorans* G1212/YRC102, *S. cerevisiae* SEY6210/YRC102) nach Inkubation in Multielementstandard-Lösung. Die gemessenen Konzentrationen an Palladium, Europium und Lanthan (A-C) sind relativ zur entsprechenden Konzentration in der Ausgangslösung. Jeweils linksseitig im Diagramm sind die Akkumulationswerte nach 5-minütiger und rechts nach 30-minütiger Inkubation gezeigt.

Fig. 34: Palladium-, Europium- und Lanthan-Akkumulation in den transgenen *A. adenivorans*-Stämmen G1212/YRC102-Au-AGA1 und G1212/YRC102-Pd-AGA1 bzw. *S. cerevisiae*-Transformanten SEY6210/YRC102-Au-AGA1 und SEY6210/YRC102-Pd-AGA1 im Vergleich zum Kontrollstamm (KS – *A. adenivorans* G1212/YRC102, *S. cerevisiae* SEY6210/YRC102) nach Inkubation in Multielementstandard-Lösung. Die gemessenen Konzentrationen an Palladium, Europium und Lanthan (A-C) sind relativ zur entsprechenden Konzentration in der Ausgangslösung. Jeweils linksseitig im Diagramm sind die Akkumulationswerte nach 5-minütiger und rechts nach 30-minütiger Inkubation gezeigt.

Auch Fusionen der β -1,3-Glucanosyltransferase (Aga1p) mit dem Gold-Bindepeptid (vgl. Fig. 28) transformiert in *S. cerevisiae* SEY6210 wurden auf diese Weise untersucht (Fig. 35). Hier wurden ähnliche Ergebnisse erhalten, wie für die Aga1p-Fusionen. Beim Palladium gab es hinsichtlich der Akkumulation keine signifikanten Unterschiede zwischen mit Gold-Bindepeptid ausgerüsteten Transformanten und den Kontrollen. Bei Europium und Lanthan hingegen wurde im Vergleich zum Kontrollstamm eine etwas höhere Konzentration in der zellgebundenen Fraktion gemessen.



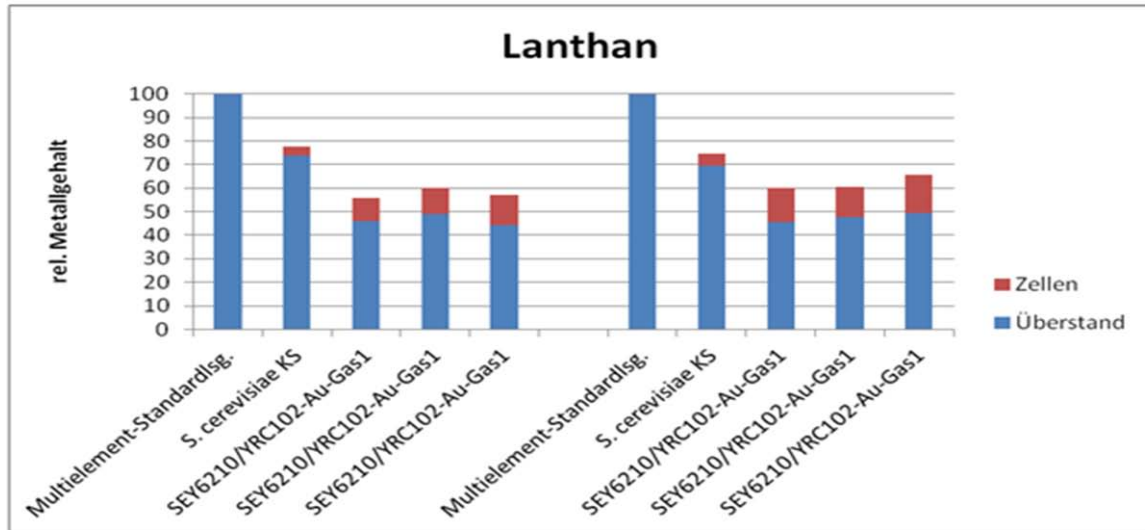
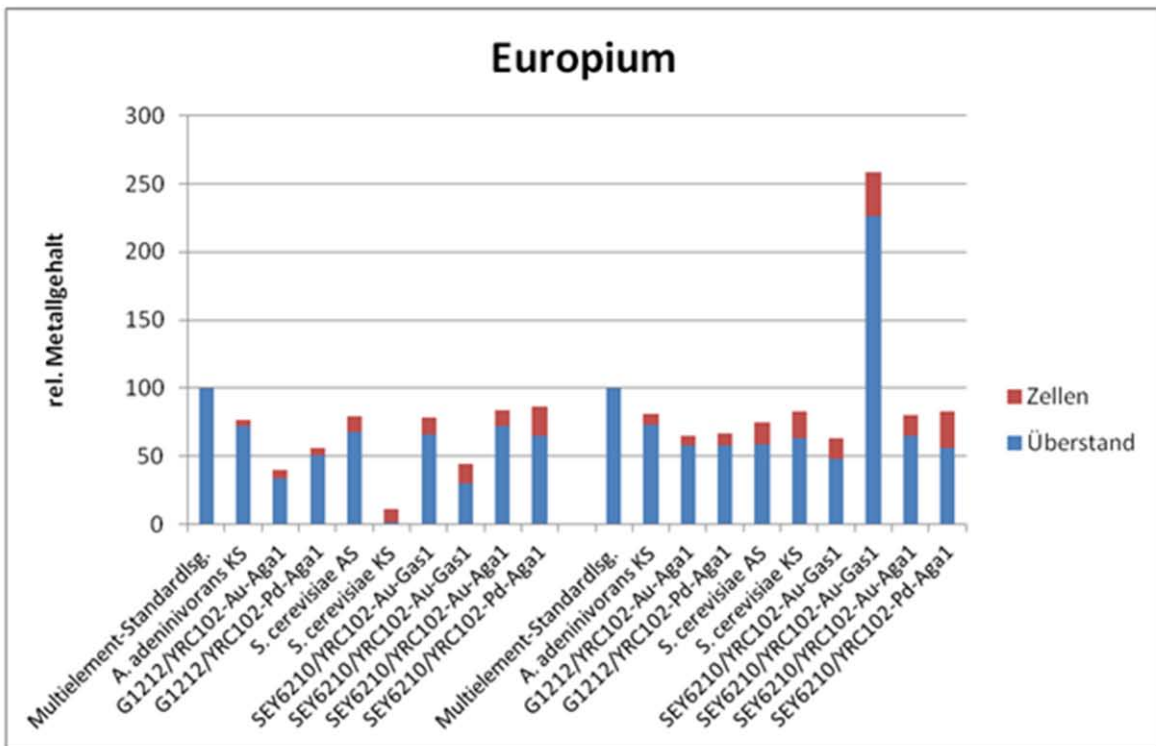
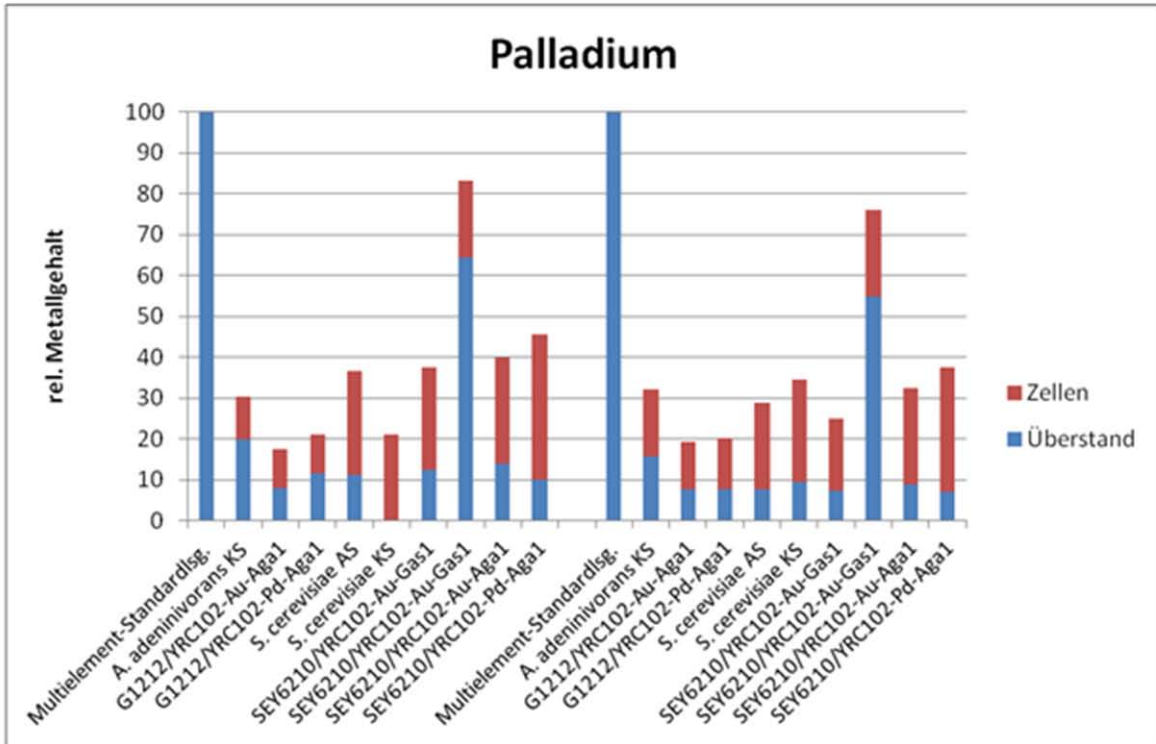


Fig. 35: Palladium-, Europium- und Lanthan-Akkumulation in den transgenen *S. cerevisiae*-Stämmen SEY6210/YRC102-Au-GAS1 im Vergleich zum Kontrollstamm (KS – *S. cerevisiae* SEY6210/YRC102) nach Inkubation in Multiementstandard-Lösung. Die gemessenen Konzentrationen an Palladium, Europium und Lanthan (A-C) sind relativ zur entsprechenden Konzentration in der Ausgangslösung. Jeweils linksseitig im Diagramm sind die Akkumulationswerte nach 5-minütiger und rechts nach 30-minütiger Inkubation gezeigt.

Fig. 35: Palladium-, Europium- und Lanthan-Akkumulation in den transgenen *S. cerevisiae*-Stämmen SEY6210/YRC102-Au-GAS1 im Vergleich zum Kontrollstamm (KS – *S. cerevisiae* SEY6210/YRC102) nach Inkubation in Multiementstandard-Lösung. Die gemessenen Konzentrationen an Palladium, Europium und Lanthan (A-C) sind relativ zur entsprechenden Konzentration in der Ausgangslösung. Jeweils linksseitig im Diagramm sind die Akkumulationswerte nach 5-minütiger und rechts nach 30-minütiger Inkubation gezeigt.

Da die Multiementstandard-Lösung einen pH-Wert von 1 besitzt, was einen negativen Einfluss auf die Integrität der Hefezellen als auch auf die Struktur der Zellwandproteine haben kann, wurde durch Zugabe von NaOH der pH-Wert auf 3 erhöht. Dadurch erfolgt natürlich das Einbringen von zusätzlichen Ionen (auch Metallionen) in die Lösung, deren Wirkung nicht einschätzbar war. Mit dieser auf pH 3 eingestellten Lösung wurden eine Auswahl an transgenen *A. adenivorans*- bzw. *S. cerevisiae*-Stämmen erneut auf Akkumulation an Palladium, Europium und Lanthan untersucht (Fig. 36). Die dabei erhaltenen Messwerte zeigten, dass vereinzelt sog. Ausreißer auftraten, z. B. bei der Akkumulation von Europium und Lanthan nach 30-minütiger Inkubation mit *S. cerevisiae* SEY6210/YRC102-Au-GAS1, wo insgesamt mehr an Europium und Lanthan in der gebundenen Fraktion gemessen wurden (ca. 250%) als in der Ausgangslösung. Ein weiteres Beispiel ist der *S. cerevisiae* Kontrollstamm (KS – SEY6210/YRC102) bei dem nach 5-minütiger Inkubation weder Europium noch Lanthan gemessen werden konnten. Mögliche Ursachen liegen hier im Design der Methode und wurden bereits diskutiert (Ausfällung von Europium und Lanthan). Insgesamt scheint allerdings der höhere pH-Wert die Akkumulation von Palladium zu begünstigen (vgl. Fig. 35 und 36), sowohl bei Transformanten als auch den Kontrollstämmen. Bei Europium und Lanthan scheint der Einfluss des pH-Wertes dagegen nur gering zu sein, zumal die zum Einsatz gebrachten Hefestämme nicht mit den entsprechenden Bindeproteinen ausgestattet waren.



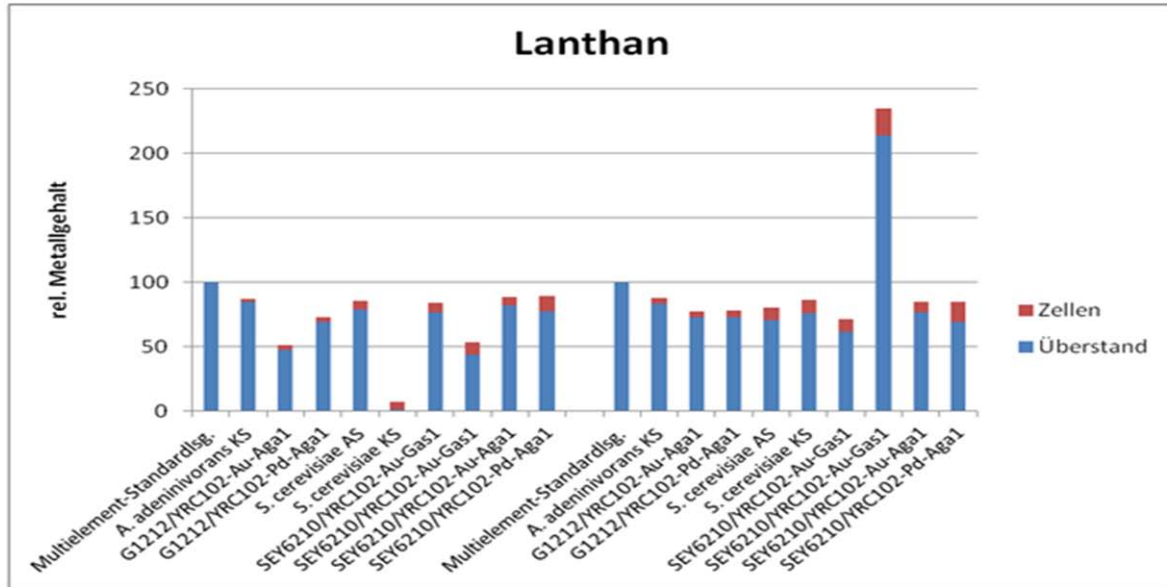


Fig. 36: Palladium-, Europium- und Lanthan-Akkumulation in den transgenen *A. adeninivorans*-Stämmen G1212/YRC102-Au-AGA1 und G1212/YRC102-Pd-AGA1 bzw. den *S. cerevisiae*-Stämmen SEY6210/YRC102-Au-GAS1 und SEY6210/YRC102-Au-AGA1 im Vergleich zum Kontroll-/Ausgangsstämmen (KS/AS – *A. adeninivorans* G1212/YRC102, *S. cerevisiae* SEY6210/YRC102) nach Inkubation in Multielementstandard-Lösung (pH 3,0). Die gemessenen Konzentrationen an Palladium, Europium und Lanthan (A-C) sind relativ zur entsprechenden Konzentration in der Ausgangslösung. Jeweils linksseitig im Diagramm sind die Akkumulationswerte nach 5-minütiger und rechts nach 30-minütiger Inkubation gezeigt.

Fig. 36: Palladium-, Europium- und Lanthan-Akkumulation in den transgenen *A. adeninivorans*-Stämmen G1212/YRC102-Au-AGA1 und G1212/YRC102-Pd-AGA1 bzw. den *S. cerevisiae*-Stämmen SEY6210/YRC102-Au-GAS1 und SEY6210/YRC102-Au-AGA1 im Vergleich zum Kontroll-/Ausgangsstämmen (KS/AS – *A. adeninivorans* G1212/YRC102, *S. cerevisiae* SEY6210/YRC102) nach Inkubation in Multielementstandard-Lösung (pH 3,0). Die gemessenen Konzentrationen an Palladium, Europium und Lanthan (A-C) sind relativ zur entsprechenden Konzentration in der Ausgangslösung. Jeweils linksseitig im Diagramm sind die Akkumulationswerte nach 5-minütiger und rechts nach 30-minütiger Inkubation gezeigt.

Da nach Inkubation mit der Multielementstandard-Lösung (pH 3) erhöhte Akkumulationen an Palladium, Europium und Lanthan detektierbar sind, wurden Hefe-Transformanten, ausgerüstet mit Aga2p fusioniert mit einer unterschiedlichen Anzahl Palladium-Bindepeptiden als Biokomponenten für die Akkumulationsversuche auf ihre Eignung getestet (vgl. Fig. 27). Hierbei konnte auch mit 8 Bindepeptiden ausgerüstete transgene Hefestämme bezüglich Akkumulation von Palladium, Europium und Lanthan keine Unterschiede zu den Konstrukten mit nur einem Peptid aufweisen (Fig. 37).

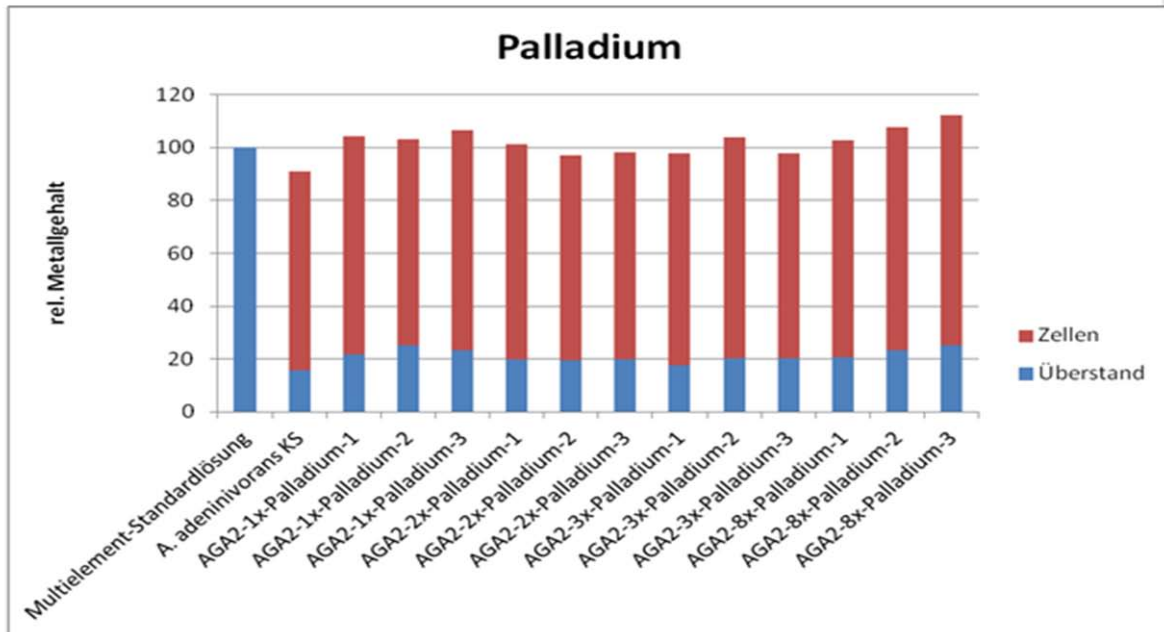


Fig. 37: Palladium-, Europium- und Lanthan-Akkumulation in den transgenen *A. adenivorans*-Stämmen G1212/YRC102-Pd-AGA1 mit einer unterschiedlichen Anzahl an Palladium-Bindeproteinen codierenden Fragmenten im Vergleich zum Kontroll-/Ausgangsstämmen (KS– *A. adenivorans* G1212/YRC102) nach Inkubation in Multiementstandard-Lösung (pH 3,0). Die gemessenen Konzentrationen an Palladium sind relativ zur entsprechenden Konzentration in der Ausgangslösung.

Fig. 37: Palladium-Akkumulation in den transgenen *A. adenivorans*-Stämmen G1212/YRC102-Pd-AGA1 mit einer unterschiedlichen Anzahl an Palladium-Bindeproteinen codierenden Fragmenten im Vergleich zum Kontroll-/Ausgangsstämmen (KS– *A. adenivorans* G1212/YRC102) nach Inkubation in Multiementstandard-Lösung (pH 3,0). Die gemessenen Konzentrationen an Palladium sind relativ zur entsprechenden Konzentration in der Ausgangslösung.

Wie bereits erwähnt war die Bestimmung von Gold am IPK nicht möglich. Daher wurde alternativ ein Akkumulationsversuch als Serviceleistung über die GMBU e.V. Halle vermessen, bei dem vorab die Hefezellen einem Königswasser-Aufschluss unterzogen wurden. Wie in Fig. 38 gezeigt, konnte auf diese Weise die reale Goldkonzentration ermittelt werden. Als Biokomponenten wurden dabei *A. adenivorans*-Transformanten eingesetzt, die das Gold-Bindepeptid mehrfach als Fusion mit Aga2p synthetisieren. Auch hier konnte allerdings keine Korrelation zwischen der Anzahl an Gold-Bindepeptiden und Gold-Akkumulationswerten detektiert werden.

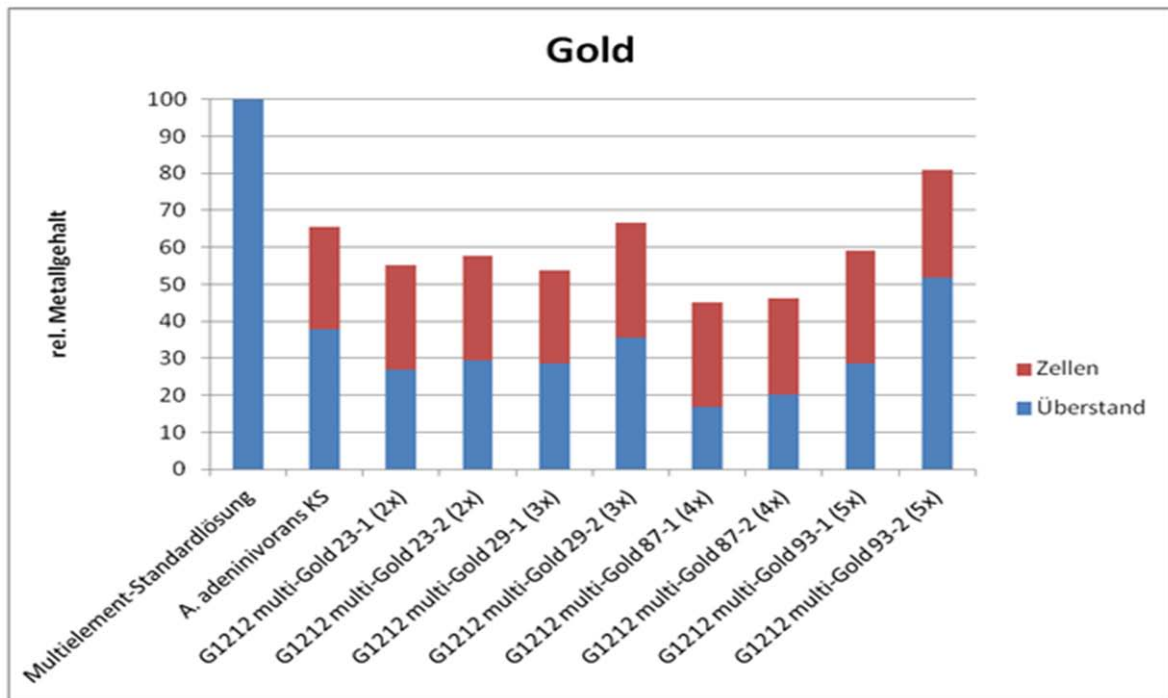


Abb. 23: Palladium-, Europium- und Lanthan-Akkumulation in den transgenen *A. adenivorans*-Stämmen G1212/YRC102-Au-AGA2 mit einer unterschiedlichen Anzahl an Gold-Bindeproteinen codierenden Fragmenten im Vergleich zum Kontrollstamm (KS– *A. adenivorans* G1212/YRC102) nach Inkubation in Multielementstandard-Lösung (pH 3,0). Die gemessenen Konzentrationen an Gold sind relativ zur entsprechenden Konzentration in der Ausgangslösung.

Abb. 38: Gold-Akkumulation in den transgenen *A. adenivorans*-Stämmen G1212/YRC102-Au-AGA2 mit einer unterschiedlichen Anzahl an Gold-Bindeproteinen codierenden Fragmenten im Vergleich zum Kontrollstamm (KS– *A. adenivorans* G1212/YRC102) nach Inkubation in Multielementstandard-Lösung (pH 3,0). Die gemessenen Konzentrationen an Gold sind relativ zur entsprechenden Konzentration in der Ausgangslösung.

Basierend auf den im Rahmen der Projektarbeiten erreichten Ergebnissen lässt sich nach Bearbeitung der Phase I folgendes zusammenfassen:

(1) Für die spezifische Akkumulation von Gold, Palladium, Europium und Lanthan mit Hilfe von transgenen Hefen müssen zellwandgebundene Proteine als Träger für die Gold, Palladium-, Europium- bzw. Lanthan-Bindepeptide verfügbar sein. Im Rahmen der Projektarbeiten wurden mehrere Kandidaten getestet. Der Nachweis mit Hilfe fluoreszierender Proteine bzw. über verschiedene Antikörper gestaltete sich schwierig. Möglicherweise liegt das an einer alternativen Prozessierung der Fusionsproteine im Gegensatz zum entsprechenden endogenen Zellwandprotein. Auch posttranslationale Veränderungen (Glykosylierungen) könnten derartige Nachweise beeinträchtigen. Die Kopplung der putativ zellwandständigen Proteine an Enzyme (Phytase, Glucanase) und der Nachweis deren Aktivität war erfolgreicher, was anhand der erhaltenen Daten belegbar ist.

(2) Die Spezifität für die Akkumulation von Gold bzw. Palladium mit den selektierten Bindepeptiden muss verbessert werden. Da Ionen auch unspezifisch an verschiedene Ladungsträger (funktionelle Gruppen von Zuckerresten oder Proteinen etc.) auf der Zellwand binden können, was zu Hintergrundwerten bei der gewählten Messmethode führt, kann dieser Nachweis nicht sofort im Ganzellsystem erfolgen. Die Spezifität gegenüber REEs und Edelmetallen ist deshalb zunächst in einem zellfreien Versuchsaufbau nachzuweisen.

Die im Projektantrag Phase 1 gestellten zwei Meilensteine konnten teilweise erreicht werden. So ließ sich jeweils ein Gold- bzw. Palladium-Bindepeptid bezüglich Akkumulation von

Gold und Palladium testen. Die damit ausgerüsteten transgenen Hefestämme zeigten allerdings, dass trotz Andocken der Bindeproteine auf der Zellwandoberfläche, die unspezifische Bindung der REEs und Edelmetalle an die Hefezellwand noch zu hoch ist. Hier müssen weitere Optimierungen einschließlich Versuche im zellfreien System erfolgen. Alternativ muss eine Methode etabliert werden, die bevorzugt an die entsprechenden Bindeproteine gebundenen REEs und Edelmetalle entfernt.

Fazit

Die in der 18-monatigen Projektbearbeitungsphase 1 gestellten zwei Meilensteine konnten teilweise erreicht werden. So wurden geeignete Stoffquellen beschafft, jeweils ein Gold- bzw. Palladium-Bindepeptid selektiert und bezüglich Akkumulation von Gold und Palladium als Biokomponenten auf einer Surface Plasmon Resonance (SPR) Plattform getestet. Parallel wurden transgene Hefestämme generiert, die diese Peptide auf ihrer Zelloberfläche verankern. Erste Tests mit einer Multielementstandard-Lösung, zur Simulation von Realbedingungen zeigten am Beispiel der Palladium-Akkumulation jedoch, dass die Spezifität noch verbessert werden muss. Darüber hinaus demonstrierten die Versuche, dass die unspezifischen Wechselwirkungen der REEs und Edelmetalle mit der Hefezellwand die spezifischen Bindungen überlagern. Hier müssen weitere Optimierungen bzw. alternative Lösungsansätze erörtert werden. Beispielsweise könnten die Akkumulationsversuche in zellfreien Systemen durchgeführt werden. Alternativ sollte auch eine Methode etabliert werden, die selektiv die an die entsprechenden Bindeproteine gebundenen REEs und Edelmetalle eluiert.