

Immobilisierung von BPA-Bindeproteinen an der Oberfläche von Hefezellen

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Magnus Mergler

aus Jülich

Berichter: Universitätsprofessor Dr. K. Wolf

Universitätsprofessor Dr. A. Schäffer

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen.....	V
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Östrogene und Xenoöstrogene.....	1
1.2 Das Xenoöstrogen Bisphenol A	3
1.3 Hefezellwand und GPI-Proteine.....	7
1.4 Östrogen- und phenolbindende Proteine bei Hefen – das Old Yellow Enzyme und verwandte Proteine	8
1.5 Die Hefe <i>Pichia pastoris</i>.....	10
1.6 Ziel der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Mikroorganismen.....	15
Bakterien.....	15
Hefen	15

2.1.2 Oligonukleotide und Plasmide.....	16
Oligonukleotide	17
Plasmide.....	17
2.1.3 Nährmedien	18
Medien für <i>E.coli</i> und <i>E.coli</i> -Transformanten.....	18
Medien für Hefe.....	19
2.1.4 Chemikalien und Enzyme.....	19
Chemikalien.....	19
Enzyme	19
2.2 Molekulargenetische Methoden	20
2.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	20
2.2.2 Isolation genomischer DNA aus Hefe	20
2.2.3 PCR-Amplifikation.....	20
2.2.4 Klonierung von DNA	21
2.2.5 Transformation in <i>P. pastoris</i> GS 115.....	22
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	22
2.2.7 DNA-Sequenzierung.....	23
2.3 Analytische Methoden.....	23
2.3.1 Extraktion und Quantifizierung von BPA	23
Extraktion des BPA aus wässriger Lösung.....	23
Derivatisierung des BPA mit Dansyl-Cl	24
HPLC-Messung des dansylierten BPA.....	24
Berechnung der BPA-Konzentration.....	24
Präparative Derivatisierung des BPA	25
2.3.2 Bestimmung der BPA-Sorption.....	26
2.3.3 Behandlung von BPA-bindenden Zellen mit Proteinase K	27
2.3.4 Berechnung der gebundenen BPA-Moleküle pro Zelle	27

3 Ergebnisse	28
3.1 BPA-Analytik	28
3.1.1 Fluoreszenz des dansylierten BPA	31
3.1.2 Chromatographie von Bis-Dansyl-BPA	33
3.1.3 Kalibrierung der BPA-Analytik.....	34
3.1.4 Überprüfung der BPA-Extraktion aus wäßriger Lösung.....	36
3.2 Konstruktion des BPA-bindenden Hefestammes <i>P. pastoris</i> pPIKA.....	37
3.2.1 PCR-Amplifikation und Klonierung des Gens <i>KYE1</i>	37
3.2.2 PCR-Amplifikation und Klonierung der 3'-Hälfte des Gens <i>AGα1</i>	41
3.2.3 Fusion der Gene <i>KYE1</i> und 3'- <i>AGα1</i>	44
3.2.4 Insertion des Fusionsgens in den <i>P. pastoris</i> -Expressionsvektor pPIC9K.....	47
3.2.5 Transformation des Plasmids pPIKA373-2 in <i>P. pastoris</i>	50
3.3 BPA-Sorption des neuen Stammes <i>P. pastoris</i> pPIKA	53
3.1 pH-Abhängigkeit der BPA-Sorption	53
3.3.2 Vergleich der BPA-Sorption von <i>P. pastoris</i> pPIKA und der des Ausgangs- stammes <i>P. pastoris</i> GS 115.....	55
3.3.3 Überleben der Zellen bei pH 9,3 ohne Kohlenstoffquelle.....	57
3.3.4 Kinetik der BPA-Sorption	58
Kinetik bei geringem Trockengewicht	59
Kinetik bei hohem Trockengewicht	60
3.3.5 Einfluß des proteinspaltenden Enzyms Proteinase K auf die BPA-Sorption	61
3.3.6 Konzentrationsabhängigkeit der BPA-Sorption	62
3.3.7 Anzahl der von einer Zelle gebundenen BPA-Moleküle.....	65
4 Diskussion.....	66
4.1 Analytik des BPA.....	66

4.2 Molekulargenetische Konstruktion des neuen**Hefestammes *P. pastoris* pPIKA.....69****4.3 BPA-Sorption von *P. pastoris* pPIKA70**

4.3.1 Zusammenhang zwischen pH-Wert und BPA-Sorption.....70

4.3.2 Erhöhte BPA-Sorption des neuen Stammes *P. pastoris* pPIKA724.3.3 Belege für die BPA-Sorption an der Zelloberfläche von *P. pastoris* pPIKA.....724.3.4 Mechanismus der BPA-Sorption von *P. pastoris* pPIKA74**4.4 Ausblick76****5 Zusammenfassung78****6 Literatur79**

Abkürzungen

a	Jahr
AG α	α -Agglutinin
AOX	Alkoholoxidase
aq.demin	demineralisiertes Wasser
BPA	Bisphenol A
C.	<i>Candida</i>
Dansyl-Cl	5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid
DIB-Cl	4-(4,5-Diphenyl-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)benzoylchlorid
DNA	desoxyribonucleic acid
E.	<i>Escherichia</i>
EBP	estrogen binding protein
ED	Elektrochemische Detektion
ER	estrogen receptor
ERE	estrogen-responsive element
FMN	Flavin-Mononucleotid
GC	Gaschromatographie
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRAS	generally recognized as safe
h	Stunde
HPLC	high performance liquid chromatography
HSLC	high speed liquid chromatography
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galactosid
K.	<i>Kluyveromyces</i>
kb	Kilobasen = 1000 Basenpaare
KYE	<i>Kluyveromyces</i> yellow enzyme
LB	Luria-Bertani-Medium
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
Mut ⁺	methanol utilization plus

Mut ⁻	methanol utilization minus
Mut ^S	methanol utilization slow
ori	origin of replication
ORF	open reading frame
OYE	old yellow enzyme
PCR	polymerase chain reaction
<i>P.</i>	<i>Pichia</i>
rpm	rounds per minute
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SPE	solid phase extraction
TG	Trockengewicht
U	(enzymatische) Units
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Medium

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:

Abb. 1.1: Strukturformel des BPA	3
Abb. 2.1: Vektor pUC19.....	17
Abb. 2.2: Vektor pIC9K	18
Abb. 3.1: Schema der Dansylierung des BPA.....	30
Abb. 3.2: Fluoreszenz-Anregungsspektrum des Bis-Dansyl-BPA.....	31
Abb. 3.3: Fluoreszenz-Emissionsspektrum des Bis-Dansyl-BPA.....	32
Abb. 3.4: Ausschnitt des HPLC-Chromatogramms von Bis-Dansyl-BPA	33
Abb. 3.5: Auftragung der gemessenen Peakfläche gegen die theoretische BPA-Menge in der HPLC	35
Abb. 3.6: Gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Ansatzes zur Amplifikation des Gens <i>KYE1</i>	38
Abb. 3.7: Plasmid pUK278-9 (pUC19 mit <i>KYE1</i>)	39
Abb. 3.8: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze von sechs Isolaten des Plasmids pUK278-9 (pUC19 mit <i>KYE1</i>).....	40
Abb. 3.9: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze zu Amplifikation der 3'-Hälfte des Gens <i>AGα1</i>	41

Abb. 3.10: Plasmid pUA277-1 (pUC19 mit 3'-AG α 1)	42
Abb. 3.11: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze von drei Isolaten des Plasmids pUA277-1 (pUC19 mit 3'-AG α 1)	43
Abb. 3.12: Schema der Konstruktion des Plasmids pUKA356-5 (pUC19 mit <i>KYE1</i> und 3'-AG α 1) zur Fusion der Gene <i>KYE1</i> und 3'-AG α 1	44
Abb. 3.13: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze von vier Isolaten des Plasmids pUKA356-5 (pUC19 mit <i>KYE1</i> und 3'-AG α 1) und einem Isolat des Plasmids pUK278-9 (pUC19 mit <i>KYE1</i>)	46
Abb. 3.14: Plasmid pPIKA373-2 (pPIC9K mit <i>KYE1</i> und 3'-AG α 1).....	48
Abb. 3.15: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze von zwei Isolaten des Plasmids pPIKA373-2 (pPIC9K mit <i>KYE1</i> - 3'-AG α 1-Fusionsgen).....	49
Abb. 3.16: Schema der Integration des Plasmids pPIKA373-2 über das <i>HIS4</i> -Gen ins Genom von <i>P. pastoris</i> GS 115	51
Abb. 3.17: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von genomischer DNA zweier <i>P. pastoris</i> - Transformanten mit den Primern P5AOX1 und PSN	52
Abb. 3.18: Einfluß des pH-Wertes auf die BPA-Sorption von <i>P. pastoris</i> pPIKA	54

Abb. 3.19: Vergleich der BPA-Sorption des Ausgangsstammes <i>P. pastoris</i> GS 115 und des neuen Stammes <i>P. pastoris</i> pPIKA in gepufferter wäßriger Lösung bei pH 9,3	56
Abb. 3.20: Auftragung der Zellzahl von <i>P. pastoris</i> pPIKA gegen die Zeit in Ansätzen mit pH 9,3 ohne Kohlenstoffquelle	58
Abb. 3.21: Auftragung der BPA-Sorption von <i>P. pastoris</i> pPIKA gegen die Zeit bei geringem Trockengewicht	59
Abb. 3.22: Auftragung der BPA-Sorption von <i>P. pastoris</i> pPIKA gegen die Zeit bei hohem Trockengewicht	60
Abb. 3.23: Auftragungen der BPA-Sorption von <i>P. pastoris</i> pPIKA gegen die BPA-Endkonzentration (Sorptionisothermen nach Langmuir).....	62
Abb. 3.24: Doppelt reziproke Auftragungen der BPA-Sorption q gegen die BPA-Endkonzentration c_f	63
Abb. 3.25: Auftragung der Steigungen der in Abb. 3.24 dargestellten Sorptionisothermen gegen die in den Versuchen eingesetzten Trockengewichte.....	64

Tabelle:

Tab.3.1: Zahl der gebundenen BPA-Moleküle pro Zelle	65
---	----

1 Einleitung

1.1 Östrogene und Xenoöstrogene

Östrogene sind Hormone, die Zellteilung und Genexpression im weiblichen Genitaltrakt regulieren (Soto et al., 1991). Diese Regulation läuft ab wie folgt: Das Östrogen (z.B. das natürliche Östrogen 17 β -Östradiol) gelangt in die Zelle und bindet dort an ein Protein, das als Östrogen-Rezeptor (ER) bezeichnet wird. Die Bindung von Östrogen führt zu Bildung von ER-Östrogen-Komplexen, die aus dem Östrogen und einem ER-Dimer bestehen. Da zwei ER-Subtypen (ER α und ER β) existieren, können Homo- und Heterodimere gebildet werden. Der Östrogen-ER-Komplex wird in den Zellkern transportiert und bindet dort an Östrogen-Responsive Elemente (ERE) der DNA. Diese ERE befinden sich im 5'-Bereich der östrogen-regulierten Gene. Die Bindung des Östrogen-ER-Komplexes an die ERE bewirkt die Aktivierung der Transkription der Gene. Zusätzlich reagiert der ER-Östrogen-Komplex auch mit weiteren Transkriptionsfaktoren, um die Gentranskription zu modulieren (Gould et al., 1998; Sheeler et al., 2000; Witorsch, 2000).

Neben der oben beschriebenen „direkten“ Wirkung von Östrogenen besteht noch ein „indirekter“ Weg, bei dem der ER-Östrogen-Komplex lediglich mit bestimmten Transkriptionsfaktoren interagiert und nicht an die DNA bindet (Klinge, 2001). Außerdem wurden nicht-genomische Effekte von Östrogenen (und Xenoöstrogenen) bei bestimmten Fischen beobachtet, die möglicherweise auf einen cytoplasmatischen ER zurückzuführen sind (Loomis & Thomas, 2000).

Neben den Östrogenen existiert eine große Gruppe von Verbindungen mit sehr unterschiedlichen chemischen Strukturen, welche die Bildung, Verteilung oder Funktion des natürlichen Östrogens 17 β -Östradiol blockieren oder verändern bzw. den Metabolismus des natürlichen Hormons beeinflussen. Diese Substanzen bezeichnet man als Xenoöstrogene (Soto et al., 1995; Witorsch, 2000; SETAC, 2000; Ahmed, 2000). Zu den Xenoöstrogenen zählen synthetische Verbindungen aus Kunststoffen (Bisphenol A, Phthalate), Detergentien (Octylphenol, Nonylphenol), Pestiziden (DDT), Industriechemikalien (Polychlorierte Biphenyle), aber auch natürliche Verbindungen wie Phytoöstrogene (Genistein, Coumestrol) und Mykoöstrogene (Zearalenon) (Ahmed, 2000). Das Fehlen schädlicher Effekte von Phytoöstrogenen auf Tiere könnte durch eine sehr langsame gegenseitige Anpassung von

Pflanzen und Tieren durch Co-Evolution erklärt werden. Werden Tiere plötzlich Phytoöstrogenen ausgesetzt, die in ihrer natürlichen Umgebung nicht vorkommen, können auch diese schädliche Effekte hervorrufen (Sonnenschein & Soto, 1998).

Die erste Chemikalie, bei der eine xenoöstrogene Wirkung sicher nachgewiesen wurde, ist das Insektizid DDT, welches zu abnormaler Entwicklung der Fortpflanzungsorgane bei Möwenembryos führt (Singer, 1949; zit. in Sonnenschein & Soto, 1998). Synthetische Xenoöstrogene in der Umwelt werden seitdem mit verminderter Fruchtbarkeit von Vögeln und Fischen, Verweiblichung von männlichen Fischen, Vögeln und Säugetieren sowie Veränderungen im Immunsystem von Vögeln und Säugetieren in Verbindung gebracht (Colborn et al., 1993). Obwohl Xenoöstrogene im Allgemeinen nur 1/1000 bis 1/1000000 der Wirkung des natürlichen Östrogens 17 β -Östradiol zeigen, sind doch viele von ihnen chemisch stabil und akkumulieren im Fettgewebe, aus dem sie in Phasen des Nahrungsmangels wieder freigesetzt werden können (Ahmed, 2000; Witorsch, 2000). Darüber hinaus gibt es synergistische Wirkungen von Mischungen aus natürlichen Östrogenen und Xenoöstrogenen, die die Summe der individuellen Wirkungen übersteigen (Soto et al., 1995; Rajapakse et al., 2001).

In Großbritannien wurde nachgewiesen, daß die meisten Kläranlagenabläufe eine östrogene Wirkung besitzen, die sich auch noch mehrere Flußkilometer unterhalb der Einlaufstelle nachweisen läßt. Diese Abläufe bewirken eine Verweiblichung männlicher Fische, die sich durch Bildung von Vitellogenin (ein Eidotterprotein, das normalerweise nur von weiblichen Fischen gebildet wird) bei männlichen Fischen, die Entwicklung zwittriger Keimdrüsen und Mißbildungen der männlichen Keimdrüsen äußert. Als hauptsächliche östrogene Bestandteile wurden in den Abläufen die natürlichen Östrogene 17 β -Östradiol und Östron sowie das synthetische Kontrazeptivum 17 α -Ethynylöstradiol nachgewiesen (Jobling et al., 1998; Rodgers-Gray et al., 2000).

Neben den oben genannten Substanzen wurden in Kläranlagenabläufen, Flüssen, Flußmündungen, im Trinkwasser und im Gewebe wildlebender Fische Alkylphenole gefunden (Rodgers-Gray et al., 2000). Diese Substanzen sind die Abbauprodukte einer Gruppe von Detergentien, der Alkylphenol-Ethoxylate. Während die eigentlichen Detergentien keine oder nur sehr geringe östrogene Wirkungen besitzen, zeigen die Alkylphenole deutliche xenoöstrogene Effekte (Soto et al., 1991; Routledge & Sumpter, 1996).

Zur Zeit gibt es keine gesicherten Daten über den Zusammenhang zwischen Xenoöstrogenen und reduzierter Fruchtbarkeit oder erhöhter Krebsrate bei Menschen (Ben-Jonathan & Steinmetz, 1998). Die Rolle von Xenoöstrogenen bei der Entstehung von Mißbildungen des männlichen Fortpflanzungstraktes bei Menschen ist lediglich hypothetisch (Carlsen et al., 1995). Mit Ausnahme der berufsbedingten Aufnahme schädlicher Chemikalien und dem früheren klinischen Gebrauch des Kontrazeptivums Diethylstilbestrol konnte bisher kein kausaler Zusammenhang zwischen dem Einfluß hormonell aktiver Xenobiotika und nachteiligen Effekten auf die menschliche Gesundheit bewiesen werden (Degen & Bolt, 2000). Auch Juberg (2000) hält die derzeit vorliegenden Belege für eine schädliche Wirkung von Xenoöstrogenen auf die menschliche Gesundheit für zu schwach. Vielmehr deuten die vorhandenen Belege daraufhin, daß es sich bei den endokrinen Störungen durch Xenoöstrogene hauptsächlich um ein ökotoxikologisches Problem handelt (Nilsson 2000).

1.2 Das Xenoöstrogen Bisphenol A

Bisphenol A (BPA) ist der Trivialname der Verbindung 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-propan (Falbe & Regitz, 1989) (Abb. 1.1).

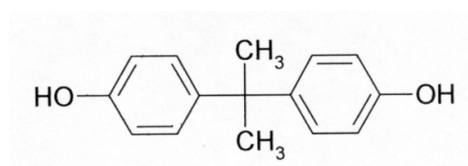


Abb. 1.1: Strukturformel des BPA (nach Fürhacker et al., 2000)

BPA wird durch eine säurekatalysierte Reaktion von Phenol und Aceton hergestellt und besitzt zwei phenolische Benzolringe. Im Jahr 1996 wurden in den USA über 725000 t/a (mit einer jährlichen Steigerung von 5-6%) hergestellt, in Westeuropa 1993 347000 t/a und in Japan 1994 200000 t/a (Ben-Jonathan & Steinmetz, 1998; Fürhacker et al., 2000; Hanioka et al., 2000). Der größte Teil des BPA wird für die Herstellung von Polycarbonat-Kunststoffen (60%) und Epoxidharzen (30%) verwendet, die restlichen 10% für Polyesterharze und die

Herstellung von Thermalpapieren (Ben-Jonathan & Steinmetz, 1998; Fürhacker et al., 2000). Polycarbonat erhält man durch die Kondensation von BPA mit Phosgen (Krishnan et al., 1993). Es besitzt viele wünschenswerte Eigenschaften wie Durchsichtigkeit, Formbarkeit und hohe Stoßfestigkeit. Epoxidharze, die BPA-Diglycidylether (BADGE) enthalten, werden zum Beschichten und Bekleben von Oberflächen verwendet (Ben-Jonathan & Steinmetz, 1998; Fürhacker et al., 2000).

BPA gelangt hauptsächlich über die Abwässer von Industriebetrieben (z.B. Papierindustrie) ins Abwasser und von dort in die Kläranlagen (Wenzel et al., 1998; Fürhacker et al., 2000). Eine weitere Quelle für BPA in Gewässern stellt die Auslaugung aus Kunststoffabfällen dar (Yamamoto & Yasuhara, 1999).

Über den Abbau von BPA in Kläranlagen gibt es unterschiedliche Angaben: In manchen Anlagen wurde in 28 Tagen weniger als 1% des BPA abgebaut (Howard, 1989; zit. in Oehlmann et al., 2000), in Kläranlagen mit adaptierten Mikroorganismen dagegen bis zu 90% (Fürhacker et al., 2000). Genauere Untersuchungen über die Abbaubarkeit von BPA wurden durch Ike et al. (2000) mit Mikroskosmen durchgeführt, die mit Belebtschlamm bzw. mit Flußwasser gefüllt waren. Im Belebtschlamm mit vorher adaptierten Mikroorganismen wurde das BPA innerhalb 24 h komplett abgebaut. Dagegen dauerte der Abbau in Klärschlamm, dessen Mikroorganismen nicht adaptiert waren, 58-56 h und begann erst nach einer 35-40 h dauernden lag-Phase. Die Dauer des Abbaus im Belebtschlamm sowohl mit adaptierten als auch mit nicht-adaptierten Mikroorganismen überschreitet deutlich die Verweilzeit des Wassers im aktiven Bereich von kommunalen Kläranlagen, die bei etwa 5 h liegt (Ike et al., 2000). In Mikroskosmen mit Flußwasser wurde nur ein unvollständiger Abbau des BPA zu stabilen Metaboliten beobachtet (Ike et al., 2000).

BPA läßt sich in Kläranlagenabläufen und in Oberflächengewässern nachweisen. Die in Kläranlagenabläufen gemessenen Konzentrationen liegen in Bereichen von 10-1080 ng/l in Kanada (Lee & Peart, 2000), 10-1000 ng/l in Südwestdeutschland (Spengler et al.; 2001), 0-2500 ng/l in Niederösterreich (Fürhacker et al., 2000) sowie 2-855 ng/l in den deutschen Bundesländern Nordrhein-Westfalen, Brandenburg, Rheinland-Pfalz und Mecklenburg-Vorpommern (Wenzel et al., 1998). In Oberflächengewässern sind die BPA-Konzentrationen geringer; sie liegen zwischen 0,5 und 229 ng/l (Wenzel et al., 1998) bzw. zwischen 9 und 776 ng/l in der Elbe und ihren Nebenflüssen (Heemken et al., 2001).

BPA ist ein Xenoöstrogen, da es die strukturellen Voraussetzungen erfüllt, die für eine Bindung an den ER notwendig sind (Fang et al., 2001). Die östrogene Aktivität des BPA wurde durch Krishnan et al. (1993) zufällig entdeckt, sie ist 2000 mal schwächer als die des 17 β -Östradiol (Routledge & Sumpter, 1996; Fürhacker et al., 2000). Diese Wirkung wurde in Versuchen mit östrogensensitiven Brustkrebszellen bei Konzentrationen von 2300-23000 ng/l beobachtet (Krishnan et al., 1993; Villalobos et al., 1995). Im Reportergentest mit transformierten Zellen, die ER und EREs in Verbindung mit einem Reportergen enthalten, bewirkte BPA in Konzentrationen über 23000 ng/l die Bildung aktiver ER-Dimere und induzierte die Transkription des ER-abhängigen Reportergens (Sheeler et al., 2000).

In Versuchen mit lebenden Tieren können ebenfalls Wirkungen des BPA festgestellt werden. Bei Süßwasser- und Meeresschnecken (Wirbellosen) führen bereits BPA-Konzentrationen von 1000 ng/l zu Mißbildungen der weiblichen und männlichen Fortpflanzungsorgane (Oehlmann et al., 2000). Eine Injektion von 50 mg BPA/kg Körpergewicht bewirkt bei Regenbogenforellen nach 6 Tagen eine 700fache Erhöhung der Konzentration des weiblichen Eidotterproteins Vitellogenin (Christiansen et al., 2000). Bereits 2 mg BPA/kg Körpergewicht reichen aus, um in männlichen Fischen aus der Gruppe der lebendgebärenden Zahnkarpfen die Synthese von Vitellogenin auszulösen (Kwak et al., 2000).

Bei Säugetieren wurden ebenfalls Wirkungen des BPA beobachtet. In jungen Mäusen (4 bzw. 8 Wochen alt) senken bereits 500 ng BPA/l die Konzentration des männlichen Sexualhormons Testosteron, was bei Jungtieren zu Mißbildungen der Fortpflanzungsorgane führen kann (Takao et al., 1999). Allerdings wird in Säugetieren das meiste aufgenommene BPA in der Leber zu dem nicht östrogen wirksamen Metaboliten BPA-Glucuronid verarbeitet und über die Galle ausgeschieden (Inoue et al., 2001; Matthews et al., 2001). Ein Teil des BPA-Glucuronid gelangt aber von der Leber in den Blutkreislauf und dadurch in bestimmte Organe wie Lunge, Dünndarm oder Plazenta, die eine hohe Glucuronidase-Aktivität besitzen. In diesen Organen wird das BPA-Glucuronid wieder gespalten und BPA freigesetzt. In der Plazenta bewirkt dies, daß der Fötus freiem BPA ausgesetzt wird (Inoue et al., 2001).

Die Wirkungen des BPA beruhen aber nicht nur auf einem schwachen Östrogen-Agonismus. So bewirkt BPA die Bildung einer Konformation des aktivierten Rezeptors ER α , die sich von der durch andere Liganden gebildeten Form deutlich unterscheidet. BPA induziert daher wahrscheinlich eine eigene Gruppe ER α -abhängiger Gene, wodurch sich die

biologische Antwort des BPA von der des Östradiol unterscheidet. Dies wird dadurch belegt, daß BPA in Versuchen mit lebenden Säugern teilweise sogar als Antagonist des 17 β -Östradiol wirkt (Gould et al., 1998). Noch komplexer wird die Wirkung des BPA dadurch, daß es im Gegensatz zum 17 β -Östradiol bevorzugt an den Rezeptor ER β bindet, der sich in seiner Funktion vom Rezeptor ER α unterscheidet (Witorsch, 2000; Matthews et al., 2001).

BPA zeigt aber nicht nur die bisher erläuterten Wirkungen als Einzelsubstanz, sondern interagiert auch mit anderen östrogen wirksamen Verbindungen (vgl. Abschnitt 1.1). So konnten Rajapakse et al. (2001) in Reporterger-Tests additive Effekte von 17 β -Östradiol und BPA feststellen. In lebenden Tieren wurde außerdem ein synergistischer Effekt von BPA und einem anderen Xenoöstrogen, Nonylphenol, beobachtet (Kwak et al., 2000). Da tierische Gewebe von Natur aus eine Vielzahl von Verbindungen mit östrogenen Aktivität enthalten (Rajapakse et al., 2001) und in Flüssen ebenfalls viele östrogen wirksame Stoffe zu finden sind (vgl. Jobling et al., 1998; Rodgers-Gray et al., 2000), erscheint es möglich, daß BPA sowohl durch Interaktion mit körpereigenen Östrogenen als auch mit von außen aufgenommenen (Xeno-)Östrogenen schon in geringen Mengen das hormonelle System beeinflußt.

Neben den bisher beschriebenen xenoöstrogenen Wirkungen zeigt BPA noch weitere Effekte. Bei Säugetieren beeinflußt BPA das Immunsystem, indem es das Anheften der Makrophagen („Freßzellen“) an Fremdstoffe und damit die phagozytische Funktion der Makrophagen blockiert (Ahmed, 2000). In Säugerzellen stört BPA außerdem die Ausbildung des Spindelapparates während der Zellteilung; es besitzt daher ein aneuploidogenes Potential (Pfeiffer et al., 1997). Bei Pankreaszellen wurde eine Wirkung des BPA beobachtet, die über einen membrangebundenen Rezeptor vermittelt wird, der nicht in Zusammenhang mit dem ER steht (Nadal et al., 2000).

Aufgrund der in diesem Abschnitt dargestellten Wirkungen des BPA, insbesondere der synergistischen und der nicht-östrogenen Effekte, stellen bereits die geringen BPA-Konzentrationen in aquatischen Ökosystemen ein Problem dar. Es ist daher notwendig, BPA aus Kläranlagenabläufen zu entfernen. Eine Methode zur Entfernung stellt die Verwendung biologischer Filter dar.

Solche Filter können z.B. aus Hefezellen bestehen, die an ihrer Zellwand BPA binden und es so aus dem Abwasser entfernen. Zur Entfernung von toxischen Metallionen aus Wasser

wurden Hefen bereits erfolgreich angewendet (Zimmermann & Wolf, 2002), zur Entfernung von BPA müssen zunächst rekombinante Hefen hergestellt werden, die BPA-Bindeproteine besitzen. Die Verwendung von Hefen bietet eine Reihe von Vorteilen: Hefen gelten als sichere Mikroorganismen, da sie keine Pyrogene oder viralen Einschlüsse enthalten. Sie sind zudem einfach genetisch zu manipulieren und ihre Kultivierung ist vergleichsweise einfach. Ein weiterer Vorteil der Hefen gegenüber bakteriellen Expressionssystemen besteht darin, daß Hefen als Eukaryonten heterologe Proteine, die aus Eukaryonten stammen, in der richtigen Weise modifizieren (Gellissen et al., 1992; Gellissen, 2000).

1.3 Hefe-Zellwand und GPI-Proteine

Die Zellwand bei Hefen besteht aus den drei Komponenten Glucan, Mannoprotein und Chitin, wobei die äußere Schicht der Zellwand aus Mannoproteinen gebildet wird. Die Mannoproteine bestehen aus zwei Fraktionen: den SDS-extrahierbaren und den Glucanase-extrahierbaren Mannoproteinen. Die Glucanase-extrahierbaren Mannoproteine sind kovalent in der Zellwand verankert und zählen zur Gruppe der Glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Proteine (van der Vaart & Verrips, 1998; Kapteyn et al., 1999).

Die GPI-Proteine besitzen am C-Terminus eine hydrophobe Signalregion. Im Endoplasmatischen Reticulum wird die hydrophobe Region entfernt und durch GPI ersetzt, das vorher aus Phosphatidylinositol, Ethanolamin und Zuckern synthetisiert wurde (Benachour et al., 1999; Gaynor et al., 1999). Die GPI-Proteine werden über den Golgi-Apparat zu ihrem Bestimmungsort in der Zelle transportiert, der von der Sequenz bestimmter Aminosäuren in der sogenannten ω -Region des C-terminalen Bereichs der Proteine abhängt (Hamada et al., 1999). Die meisten GPI-Proteine werden über das GPI in der Plasmamembran verankert (Gaynor et al., 1999). Einige GPI-Proteine gelangen in die Zellwand: Sie werden nur vorübergehend in der Plasmamembran verankert, wo die Fettsäure und das Inositol entfernt werden. Anschließend wird das vom GPI übriggebliebene Glucan kovalent mit dem β 1,6-Glucan der Zellwand verknüpft, wodurch die Proteine in der Zellwand stabil verankert

werden (de Nobel & Lipke, 1994; Lu et al., 1995; Kollár et al., 1997; de Sampaio et al., 1999).

Zu den zellwandgebundenen GPI-Proteinen zählt das Mannoprotein α -Agglutinin ($AG\alpha$) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (van der Vaart & Verrips, 1998). Dieses Protein ist an der sexuellen Adhäsion von Zellen des Paarungstypes α mit Zellen des Paarungstypes **a** beteiligt (Lipke & Kurjan, 1992).

Das α -Agglutinin von *S. cerevisiae* wird durch das Gen *AG α 1* codiert (Lipke et al., 1989). Schreuder et al. (1993) konnten erstmals nachweisen, daß die C-terminale Hälfte des α -Agglutinin verwendet werden kann, um heterologe Proteine in der Zellwand von *S. cerevisiae* zu verankern. Inzwischen wurde dieses Oberflächenverankerungssystem erfolgreich für verschiedene Proteine angewendet, z.B. für die Carboxymethylcellulase aus dem Schimmelpilz *Aspergillus aculeatus* (Murai et al., 1997), das grüne fluoreszierende Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* (Ye et al., 2000; Shibasaki et al., 2001), die Bindungsdomäne des humanen Immunoglobulin G (Nakamura et al., 2001) und den ER der Ratte (Yasui et al., 2002).

GPI-Anker sind in sehr vielen eukaryontischen Organismen zu finden; die Struktur und die Biosynthese des GPI sind hochkonserviert (van der Vaart & Verrips, 1998; Muniz & Riezman, 2000). Daher funktionieren GPI-Signalsequenzen aus Hefe sogar in Pflanzenzellen (Tako et al., 2000). In der methylophilen Hefe *Hansenula polymorpha* existiert ebenfalls ein GPI-System, das möglicherweise zur Oberflächenverankerung heterologer Proteine verwendet werden kann (Kim et al., 2002).

1.4 Östrogen- und phenolbindende Proteine bei Hefen – das Old Yellow Enzyme und verwandte Proteine

Das Old Yellow Enzyme (OYE; EC 1.6.99.1) wurde erstmals durch Warburg & Christian (1933) aus der untergärigen Bierhefe *Saccharomyces carlsbergensis* (*S. carlsbergensis*) isoliert. Es handelt sich beim OYE um eine NADPH-Oxidoreductase, die als prosthetische Gruppe Flavin-Mononucleotid (FMN) enthält (Theorell, 1935; Matthews & Massey, 1968).

Der physiologische Elektronenakzeptor des OYE ist bis heute unbekannt (Matthews & Massey, 1968; Brown et al., 1998).

Im Jahre 1968 beobachteten Matthews & Massey bei der Isolation von OYE aus Hefe eine grüne Verfärbung des normalerweise aufgrund des FMN gelb gefärbten Enzyms, die sie auf die Bindung einer aromatischen Verbindung an das OYE zurückführten. Später wurde diese Verbindung als *p*-Hydroxybenzaldehyd identifiziert (Matthews et al., 1975) und es wurde festgestellt, daß das OYE eine ganze Reihe verschiedener phenolischer Substanzen bindet (Abramovitz & Massey, 1976a). Die Phenole bilden mit dem OYE Komplexe, in denen ein Austausch von Elektronen zwischen dem FMN und dem Phenol stattfindet. Das Phenol wird dabei als Phenolat-Anion an das Enzym gebunden (Abramovitz & Massey, 1976b).

In der untergärigen Bierhefe *S. carlsbergensis* wird das OYE durch das Gen *OYE1* codiert (Saito et al., 1991). In *S. cerevisiae*, einer der Ausgangsstämme der Bierhefe *S. carlsbergensis* (die anderen beiden sind *S. bayanus* und *S. monacensis*, nach Niino et al., 1995), gibt es sogar zwei Gene für das OYE: das mit *OYE1* fast identische Gen *OYE2* und das Gen *OYE3*, welches für ein weiteres OYE-Isozym codiert (Stott et al., 1992; Niino et al., 1995). Das aus *S. cerevisiae* isolierte OYE stellt daher eine Mischung von Homo- und Heterodimeren, die aus den beiden Genen abgeleitet sind, dar (Brown et al., 1998). Da die drei OYE-Gene von *S. carlsbergensis* und *S. cerevisiae* eine hohe Homologie zum östrogenbindenden Protein (EBP) der Hefe *Candida albicans* (*C. albicans*) aufweisen (Niino et al., 1995), ist anzunehmen, daß OYE-Proteine Östrogene, verschiedene Phenole und auch BPA binden können.

Das mit dem OYE verwandte EBP von *C. albicans* wurde erstmals durch Skowronski & Feldman (1989) beschrieben. Es ist dem OYE von *S. cerevisiae* zu 64% identisch, besitzt ebenfalls Oxidoreductase-Aktivität (Madani et al., 1994) und bindet in seinem aktiven Zentrum sowohl 17 β -Östradiol als auch Phenol (Buckman & Miller, 1998). Das EBP spielt möglicherweise eine Rolle für die Virulenz der humanpathogenen Hefe *C. albicans*: Östradiol stimuliert bei diesem Organismus den Übergang von der einzelligen Form zur ins Gewebe eindringenden Mycelform (Madani et al., 1994).

In der Hefe *K. lactis* liegt ein offener Leserahmen (ORF) vor, der erstmals durch Miranda et al. (1995) beschrieben und als Gen *KYE1* (*KYE* steht für *Kluyveromyces* Yellow Enzyme) bezeichnet wurde. Die DNA-Sequenz besitzt 84% Homologie zum Gen *OYE1* von *S. carlsbergensis* und zum Gen *OYE2* von *S. cerevisiae*. Das aus der Gensequenz abgeleitete Protein weist 77% Ähnlichkeit zum EBP von *C. albicans* auf. Das Produkt des Gens *KYE1*

erscheint daher ebenfalls zur Bindung von Östrogenen, Phenolen und BPA geeignet.

Das Genprodukt des *KYE1* besitzt nicht die Nachteile des OYE von *S. cerevisiae* und des EBP von *C. albicans*: Bei *S. cerevisiae* liegen zwei OYE-Isozyme vor, die möglicherweise nur als Dimere funktionsfähig sind, was die Klonierung beider OYE-Gene notwendig machen würde (siehe oben), während bei *K. lactis* nur das eine Gen *KYE1* vorliegt (vgl. Miranda et al., 1995). Eine humanpathogene Wirkung wie bei *C. albicans* kann bei *K. lactis* ausgeschlossen werden, da diese Hefe zu den GRAS-Organismen (GRAS = „generally recognized as safe“) gerechnet wird (Schaffrath & Breunig, 2000).

1.5 Die Hefe *Pichia pastoris*

Als Expressionsorganismus für heterologe Protein ist die Hefe *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) besonders geeignet (vgl. Cereghino & Cregg, 2000). Sie besitzt eine Reihe von Vorteilen, die im weiteren Verlauf dieses Abschnittes näher erläutert werden.

P. pastoris besitzt einen Regulationsmechanismus, der die einfache Induktion der Expression von Fremdproteinen durch die Zugabe von Methanol ermöglicht (Cereghino & Cregg, 2000). Der Grund hierfür besteht darin, daß es sich bei *P. pastoris* um eine methylotrophe Hefe handelt, d.h. sie kann auf Methanol als einziger C-Quelle wachsen. Der erste Schritt der Methanolverwertung besteht in der Oxidation von Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid und wird durch das Enzym Alkoholoxidase (AOX) katalysiert. *P. pastoris* besitzt zwei AOX-Gene: *AOX1* und *AOX2*, wobei das Genprodukt von *AOX1* für den überwiegenden Teil der AOX-Aktivität der Zellen verantwortlich ist (Higgins & Cregg, 1998a). Die Expression des *AOX1* wird durch Methanol auf der Ebene der Transkription reguliert, indem Methanol die Bildung der mRNA des *AOX1* dereprimiert und induziert. Dies führt dazu, daß in Zellen, die auf Methanol kultiviert wurden, etwa 5% der mRNA aus der des *AOX1* bestehen, während in Zellen, die auf anderen C-Quellen kultiviert werden, keine *AOX1*-mRNA nachweisbar ist. Methanol ist daher als C-Quelle unbedingt notwendig, um die Bildung größerer Mengen von methanol-induzierten Proteinen zu bewirken (Cereghino & Cregg, 2000).

Für die Expression von heterologen Proteinen stehen verschiedene Stämme zur Verfügung, die sich hinsichtlich der Methanolverwertung unterscheiden: Die meisten Stämme wachsen auf Methanol mit derselben Rate wie der Wildtyp (Mut^+ = methanol utilization plus).

Bei einigen Stämmen ist das Gen *AOX1* deletiert und Methanol kann nur noch durch das schwächere *AOX2*-Genprodukt verarbeitet werden (Mut^s = methanol utilization slow). Es gibt auch Stämme, bei denen beide *AOX*-Gene deletiert sind und die überhaupt nicht mehr auf Methanol wachsen, diese werden als Mut^- (methanol utilization minus) bezeichnet.

Die Laborstämme von *P. pastoris* besitzen alle eine Deletion im Gen *his4* und sind daher auxotroph für Histidin (Cereghino & Cregg, 2000).

Die Expressionsvektoren für *P. pastoris* wurden alle als *E. coli*-*P. pastoris* „shuttle“-Vektoren konstruiert, d.h. sie enthalten den Replikationsursprung (*ori*) für die Klonierung in *Escherichia coli* (*E. coli*) und genetische Marker *E. coli* und *P. pastoris*. Als genetischer Marker für *E. coli* dient in vielen Vektoren das Gen der β -Lactamase, welche die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vermittelt. Als Marker für *P. pastoris* dient häufig das intakte Gen *HIS4*, wodurch die Laborstämme nach Integration des Expressionsvektors ins Genom prototroph für Histidin werden (Cereghino & Cregg, 2000). Die meisten Vektoren besitzen eine Expressionskassette aus einem 0,9 kB-Fragment des *AOX1*-Promotors und einem zweiten kurzen *AOX1*-Fragment, das für die Termination der Transkription notwendig ist (Cereghino & Cregg, 2000). Die meisten rekombinanten Stämme von *P. pastoris* erhält man durch die Integration des Expressionsplasmids über homologe Rekombination mit einem der beiden *AOX*-Gene oder mit dem Gen *HIS4* (Gellissen et al., 1992). Diese Integration bewirkt z.B. noch nach 83 Generationen die stabile Expression eines Fremdgens (Ohi et al., 1998).

P. pastoris ist sehr gut geeignet, um Fremdproteine zu sekretieren, da sie kaum eigene Proteine ins Medium abgibt (Higgins & Cregg, 1998A). Am erfolgreichsten ist die Sekretion, wenn der Expressionsvektor das Gen des α -Faktor-präpro-Peptids von *S. cerevisiae* enthält. Das Peptid besteht aus einer Signalsequenz von Aminosäuren (prä), gefolgt von einer Sequenz aus 66 Aminosäuren (pro), die drei N-Glykosylierungsstellen und eine Kex2-Endopeptidase-Prozessierungsstelle enthält (Julius et al., 1984; Cereghino & Cregg, 2000).

Die Hefe *P. pastoris* führt post-translationale Modifikationen von Proteinen durch, wie sie auch in höheren Eukaryonten vorkommen. Dazu gehören das Prozessieren von Signalsequenzen, die Faltung von Proteinen, die Bildung von Disulfid-Brücken, die Addition

von Lipiden und die O- und N-Glykosylierung der Proteine (Cereghino & Cregg, 2000; Gellissen, 2000).

Die Prozessierung der Proteine stellt bei der Proteinexpression ein wichtiges Problem dar: So werden bei *S. cerevisiae* rekombinante Proteine in hohem Ausmaß hyperglykosyliert, wodurch die extrazelluläre Sekretion erschwert wird, und mit langen α -1,3-terminalen Mannoseketten versehen. Da diese Mannoseketten beim Menschen Immunreaktionen auslösen können, machen sie eine pharmazeutische Anwendung solcher Proteine nahezu unmöglich. In *P. pastoris* kommt es dagegen nicht zu einer Hyperglykosylierung, es werden auch keine immunogenen α 1,3-Mannoseketten gebildet, das rekombinante Protein wird in großen Mengen korrekt glykosyliert gebildet und effektiv sekretiert (Gellissen et al., 1992; Kang et al., 1998; Cereghino & Cregg, 2000). Im Allgemeinen weisen methylotrophe Hefen für heterologe Proteine eine höhere Produktivität als *S. cerevisiae* auf (Hollenberg & Gellissen, 1997; Müller et al., 1998).

Bisher wurden in *P. pastoris* über 200 Fremdproteine von Bakterien, Pilzen, Protisten, Pflanzen, Tieren (einschließlich Menschen) und Viren exprimiert (vgl. die entsprechenden Listen in Higgins & Cregg, 1998b und Cereghino & Cregg, 2000). Zu diesen Proteinen zählen z.B.: Hirudin aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* (Rosenfeld et al., 1996), Lipase aus dem Schimmelpilz *Geotrichum candidum* (Holmquist et al., 1997), aus dem Menschen: α 1-Antitrypsin (Kang et al., 1998), Chymase (Nakakubo et al., 2000) und Collagen Typ I (Nokelainen et al., 2001). Besonders zu erwähnen ist hier die Expression der Acetylcholinesterase der Ratte in *P. pastoris*, da die Hefe die C-terminale GPI-Signalsequenz dieses Proteins korrekt prozessiert (Morel & Massoulié, 1997).

1.6 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Hefezellen konstruiert werden, die in ihrer Zellwand ein nach außen gerichtetes Protein besitzen, welches die Bindung des Xenoöstrogens BPA bewirkt.

Hierzu sollte ein BPA-Bindeprotein mit Hilfe des in Schreuder et al. (1993) beschriebenen AG α -Oberflächenexpressionssystems in der Zellwand verankert werden. Das Gen des Bindeproteins sollte zu diesem Zweck auf molekulargenetischem Wege mit der 3'-Hälfte des

Gens *AG α 1* fusioniert werden, die für den C-terminalen Bereich des α -Agglutinin codiert (vgl. Abschnitt 1.3).

Als BPA-Bindeprotein sollte das Genprodukt des Gens *KYE1* aus *K. lactis* verwendet werden. Aufgrund seiner Homologie zum EBP und zum OYE sowie weiterer Vorteile (Abschnitt 1.4) erscheint dieses Protein zur Bindung phenolischer Xenoöstrogene geeignet.

Als Expressionsorganismus sollte aufgrund der Abschnitt 1.5 erläuterten Vorteile die Hefe *P. pastoris* verwendet werden und zwar der Laborstamm *P. pastoris* GS 115 His⁻ Mut⁺ (Cereghino & Cregg, 2000). Als Expressionsvektor wurde der „shuttle“-Vektor pPIC9K ausgewählt (siehe Abb. 3). In diesem Vektor sollte das Fusionsgen hinter dem *AOX1*-Promotor-Fragment und dem Gen für den α -präpro-Faktor und vor dem *AOX1*-Terminatorfragment inseriert werden. Das Fusionsgen aus 3'-*AG α 1* und *KYE1* wird infolgedessen unter der Kontrolle des starken *AOX1*-Promotors stehen, wodurch die Transkription durch Zugabe von Methanol ins Medium induziert werden wird (siehe Abschnitt 1.5). Der präpro- α -Faktor sollte das Produkt des Fusionsgens vom Endoplasmatischen Reticulum nach außen (d.h. in Richtung der Zellwand) dirigieren und die C-terminale Hälfte des α -Agglutinin soll dieses Produkt über den in Abschnitt 1.3 beschriebenen GPI-Mechanismus in der Zellwand von *P. pastoris* verankern (vgl. Julius et al., 1984; Cereghino & Cregg, 2000). Dadurch sollte das BPA-Bindeprotein stabil in der Zellwand befestigt werden. Die Integration des Vektors mit dem *KYE1*-3'-*AG α 1*-Fusionsgen ins Genom sollte über das Gen *HIS4* durchgeführt werden. Dadurch sollte ein neuer, BPA-bindender Hefestamm entstehen.

Zur quantitativen Analyse der BPA-Sorption des neuen BPA-bindenden Hefestammes sollte eine Methode zur Extraktion und Quantifizierung von BPA aus wässrigen Lösungen entwickelt werden.

Mit Hilfe dieser Methode sollte die BPA-Sorption des neuen Stammes mit der des Ausgangsstammes *P. pastoris* pPIKA verglichen werden. In Anlehnung an die Versuche zur Metallsorption durch *S. cerevisiae* (Avery & Tobin, 1992), durch *Citrobacter* (Puranik & Paknikar, 1999) und durch verschiedene Arten von Schimmelpilzen (Mogollón et al., 1998) sowie zur Sorption von organischen Farbstoffen durch verschiedene Hefearten (Aksu & Dönmez, 2003) sollten folgende Parameter der BPA-Sorption des neuen *P. pastoris*-Stammes charakterisiert werden: der zeitliche Verlauf der Sorption, die Abhängigkeit der Sorption vom pH-Wert der BPA-Lösung und der Zusammenhang zwischen der BPA-Sorption und der

BPA-Konzentration. Diese Zusammenhänge ermöglichen Schlüsse auf den Mechanismus der BPA-Sorption des neuen Hefestammes (Fourest & Roux, 1992; Avery & Tobin, 1992).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mikroorganismen

Bakterien

E. coli DH5 α [*F'*, *endA1*, *hsdR17* (*R_K*, *m_K*⁺), *supE44*, *thi-1*, λ , *recA1*, *gyrA96*, Δ *lacU196*, *F80lacZ Δ M1*] Herkunft: Stammsammlung Biologie IV (Aachen)

Durch Transformation wurden in dieser Arbeit aus *E.coli* DH5 α folgende Stämme erzeugt:

<i>E. coli</i> pUC19	(enthält Plasmid pUC19)
<i>E. coli</i> pPIC9K	(enthält Plasmid pPIC9K)
<i>E. coli</i> pUA	(enthält Plasmid pUA277-1)
<i>E. coli</i> pUK	(enthält Plasmid pUK278-9)
<i>E. coli</i> pUKA	(enthält Plasmid pUKA356-5)
<i>E. coli</i> pPIKA	(enthält Plasmid pPIKA373-2)

Hefen

<i>K. lactis</i> CBS 2359 (= NRRL Y-1140)	Herkunft: Stammsammlung Biologie IV (Aachen)
<i>P. pastoris</i> GS 115 <i>his4</i> Mut ⁺	Herkunft: Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
<i>S. cerevisiae</i> 41 α <i>ade2</i> , <i>trp5</i> , <i>ilv1</i>	Herkunft: Stammsammlung Biologie IV (Aachen)

Durch Transformation wurde in dieser Arbeit aus *P. pastoris* GS 115 der Stamm *P. pastoris* pPIKA (enthält das Plasmid pPIKA373-2) erzeugt.

2.1.2 Oligonukleotide und Plasmide

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Fa. Amersham Pharmacia hergestellt. In untenstehender Liste sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme unterstrichen.

Als Quelle für die Sequenzen der Gene diente die Datenbank Nucleotide des National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Primer für KYE1

Primer PYE: Sequenz: 5'-aaa aaa gaa ttc tac gca atg tcg ttt atg aac-3'; mit *EcoRI*-Schnittstelle; Bereich hinter der Schnittstelle identisch mit den Basen 364-384 des Locus YSKKYE1A (Acc.-Nr. L37452) von *K. lactis*; Vorwärts-Primer für die PCR des Gens *KYE1*

Primer PYX: Sequenz: 5'-aaa aaa ccc ggg ttt ctt gta acc ctt ggc-3'; mit *XmaI*-Schnittstelle; Bereich hinter der Schnittstelle komplementär zu den Basen 1563-1546 des Locus YSKKYE1A (Acc.-Nr. L37452) von *K. lactis*; Rückwärts-Primer für die PCR des Gens *KYE1*

Primer für die 3'-Hälfte des AG α 1

Primer PX-N: Sequenz: 5'-aaa aaa ccc ggg tac gct acg caa ttc tcg-3'; mit *XmaI*-Schnittstelle; Bereich hinter der Schnittstelle identisch mit den Basen 4577-4595 des Locus YSCAGA1A (Acc.-Nr. M28164) von *S. cerevisiae*; Vorwärts-Primer für die PCR der 3'-Hälfte des AG α 1

Primer PSN: Sequenz: 5'-aaa aaa gca tgc ggc cgc cga ctc aat gta cta act-3'; mit *SphI*- und *NotI*-Schnittstelle; Bereich hinter den Schnittstellen komplementär zu den Basen 5637-5620 des Locus YSCAGA1A (Acc.-Nr. M28164) von *S. cerevisiae*; Rückwärts-Primer für die PCR der 3'-Hälfte des AG α 1

Primer zur Überprüfung der pPIKA-Integration

Primer P5AOX1: Sequenz 5'-taa gct tgc aca aac gaa ct-3'; Sequenz identisch mit den Basen 1-20 des AOX1-Promotors im pPIC9K; zur Überprüfung der Integration des pPIKA373-2 ins Genom von *P. pastoris*

Plasmide

Als Grundlage aller in dieser Arbeit konstruierten Plasmide dienten der *E. coli*-Vektor pUC 19 (nach Sambrook et al., 1989; siehe Abb. 2.1) und der *E. coli*-*P. pastoris* „shuttle“-Vektor pPIC9K (Sreekrishna & Kropp, 1996; siehe Abb. 2.2).

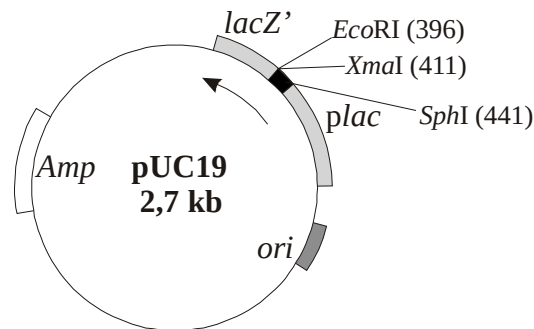


Abb. 2.1: Vektor pUC19 (nach Sambrook et al., 1989).

Abkürzungen (im Uhrzeigersinn): *lacZ'*, Fragment des β -Galactosidase-Gens; *plac*, Promotor des β -Galactosidase-Gens; *ori*, Replikationsursprung aus *E. coli*; *Amp*, Gen für die β -Lactamase aus *E.coli*, die Resistenz gegen Ampicillin bewirkt.

Es sind nur die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsschnittstellen eingezeichnet. Das schwarze Segment kennzeichnet die „polycloning site“. Der Pfeil bezeichnet die Expressionsrichtung des *lacZ'*-Gens.

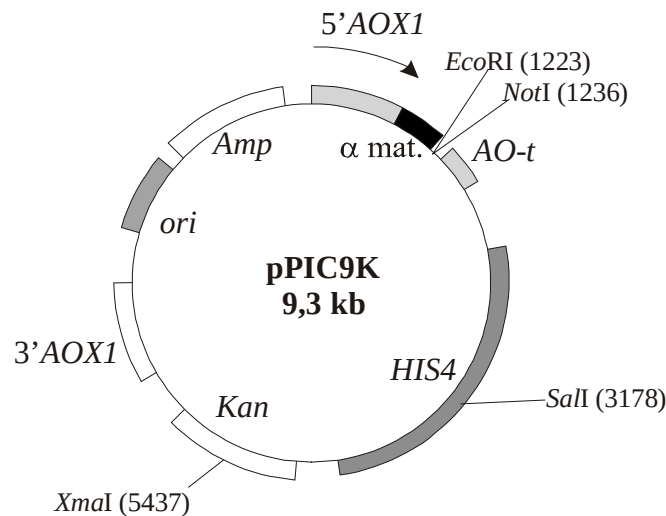


Abb. 2.2: Vektor pPIC9K (nach Sreekrishna & Kropp, 1996).

Abkürzungen (im Uhrzeigersinn): 5'AOX1, 750 bp-Fragment des Alkoholoxidase-Promotors; α mat., Gen des α -Faktor-präpro-Peptids; AO-t, 300 bp-Fragment der Alkoholoxidase-Terminatorsequenz; HIS4, 2,8-kb-Fragment des Histidinol-Dehydrogenase-Gens aus *P. pastoris* zur Komplementation des defekten *his4*-Gens in *P. pastoris* GS 115; Kan, Gen aus *E. coli*, das Resistenz gegen Kanamycin vermittelt; 3'AOX1, 650 bp-Fragment aus der 3'-Region des Gens AOX1; ori, Replikationsursprung aus *E. coli*; Amp, Gen für die β -Lactamase aus *E. coli*, die Resistenz gegen Ampicillin bewirkt.

Es sind nur die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsschnittstellen eingezeichnet. Der Pfeil bezeichnet die Expressionsrichtung der vom AOX1-Promotor regulierten Gene.

2.1.3 Nährmedien

Medien für *E. coli* und *E. coli*-Transformanten

Als Nährmedium für *E. coli* DH5 α wurde Luria-Bertani-(LB-)Medium (Vollmedium aus Hefeextrakt, Pepton und Natriumchlorid; nach Ausubel et al. 1991) verwendet. Zur Kultivierung von Transformanten mit pUC19 und Derivaten wurden dem Medium Ampicillin (100 μ g/ ml) zugesetzt. Für die Blau-Weiß-Selektion (siehe Abschnitt 2.2.4) wurden 100 μ g/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid (X-Gal) und 4 mM Isopropylthio- β -D-Galactosid (IPTG) zugegeben.

Medien für Hefe

Hefen wurden im allgemeinen in YPD-Medium (Vollmedium aus Hefeextrakt, Pepton und Glucose; nach Sreekrishna & Kropp, 1996) kultiviert. Für Bindungsversuche wurde *P. pastoris* in MD (Minimalmedium mit Hefeextrakt, Biotin, Hefe-Stickstoffbasis und 2,0% Glucose als Kohlenstoffquelle; nach Sreekrishna & Kropp, 1996) bzw. in MM (Minimalmedium mit derselben Zusammensetzung wie MD, statt Glucose 0,5% Methanol als Kohlenstoffquelle; nach Sreekrishna & Kropp, 1996) kultiviert. MD oder MM zur Kultivierung von *P. pastoris* GS115 wurden außerdem 4×10^{-3} % L-Histidin zugefügt.

2.1.4 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien

Es wurden einmal destillierte Lösemittel (Aceton, Toluol, Methanol, Ethylacetat) verwendet. Für die HPLC wurde Acetonitril "HPLC gradient grade" der Fa. Roth eingesetzt.

Es wurde BPA der Fa. Merck Schuchardt verwendet, hiervon wurde eine Stammlösung in unvergälltem 96% Ethanol mit der Konzentration 100 µg BPA/l hergestellt.

Für die Derivatisierung von BPA wurde 5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid (Dansyl-Cl) der Fa. Fluka verwendet.

Enzyme

Die Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

T4-DNA-Ligase: Roche; Proteinase K: Merck;

Restriktions-Endonucleasen: *EcoRI*: Roche; *NotI*: New England Biolabs;

Sall: Roche; *SphI*: New England Biolabs; *XmaI*: New England Biolabs;

Shrimp Alkaline Phosphatase: United States Biochemical;

Taq-DNA-Polymerase: Promega

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmide aus Bakterien wurden zur einfachen Überprüfung durch Restriktion mit Hilfe der in Sambrook et al. (1989) beschriebenen Zell-Lyse durch Kochen isoliert. Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurde die Plasmid-DNA mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Fa. QIAGEN nach den Angaben des Herstellers isoliert und gereinigt.

2.2.2 Isolation genomischer DNA aus Hefe

Genomische DNA aus Hefe wurde mit der Methode von Hoffman & Winston (1987) isoliert. Die Zellen wurden dazu mit Glasperlen unter Zusatz von Phenol-Chloroform aufgeschlossen; anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt und durch eine weitere Fällung gereinigt.

2.2.3 PCR-Amplifikation

Als DNA-Template wurde genomische DNA aus Hefe eingesetzt (Isolation: siehe Abschnitt 2.2.2). Das Reaktionsvolumen der PCR betrug 50 µl, die mit Mineralöl („mineral oil“ der Fa. Sigma) überschichtet wurden. Der nach den Herstellerangaben verdünnte Reaktionspuffer (siehe Abschnitt 2.1.4) enthielt neben der Template-DNA und 2 U *Taq*-Polymerase folgende Bestandteile: 2,0 mM MgCl₂, 0,4 mM Lösung aller vier DNA-Nucleotide (dNTP), 0,1 mM des jeweiligen Primerpaares.

Die zur Amplifikation der Gene *KYE1* und *AGα1* verwendeten Primer bestehen aus einem zur DNA komplementären Bereich und einem nicht-komplementären Bereich mit den Restriktionsschnittstellen (siehe Abschnitt 2.1.2). Aufgrund dessen besteht bei der PCR mit genomischer DNA die Gefahr der Bildung unspezifischer Produkte. Um dies zu verhindern, wurde die sogenannte „step-down-PCR“ verwendet. Bei der „step-down-PCR“ lagern sich während der ersten fünf Zyklen der PCR nur die Teile der Primer an die Template-DNA an, die dem zu amplifizierenden Gen identisch oder komplementär ist. In den folgenden Zyklen

steigt die Menge an PCR-Amplifikaten allmählich an. An diese Amplifikate lagern sich nun die gesamten Primer (einschließlich der nicht-komplementären Bereiche) an.

Zur Durchführung der „step-down-PCR“ wurden zunächst für jeden Primer der Schmelzpunkt T_m berechnet:

$$T_m = 69,3^{\circ}\text{C} + (0,41 \times \text{GC-Gehalt in \%}) - (650/\text{Länge des Primers in Basenpaaren})$$

Danach wurde für jeden der beiden Primer einer PCR zwei Annealingtemperaturen berechnet: Die eine lag 2°C über dem Schmelzpunkt des komplementären Bereiches des Primers; die andere lag 5°C unter dem Schmelzpunkt des gesamten Primers. Die niedrigere der beiden ersten Annealingtemperaturen wurde als Annealingtemperatur T1, die niedrigere der beiden zweiten Annealingtemperaturen als Annealingtemperatur T2 für die PCR eingesetzt.

Der typische Verlauf einer „step-down-PCR“ war: Prädenaturierung 5 min 92°C ; Erste fünf Zyklen: Denaturierung 1 min 92°C , Annealing 1 min T1, Elongation 2 min 72°C ; nächste 25 Zyklen: Denaturierung 92°C 1 min, Annealing 1 min T2, Elongation 2 min 72°C .

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ der Fa. Roche nach den Anweisungen des Herstellers gereinigt.

2.2.4 Klonierung von DNA

Vor der Ligation wurden Plasmide mit Restriktionsenzymen geschnitten, gleichzeitig mit „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (siehe Abschnitt 2.1.2) dephosphoryliert und danach durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (nach Sambrook et al., 1989) von den Enzymen gereinigt. Gereinigte PCR-Fragmente wurden geschnitten und danach ebenfalls durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion gereinigt. Durch Restriktion von Plasmiden gewonnene Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.6) separiert und dann durch die „Freeze-Squeeze“-Methode (nach Schillberg, 1994) aus dem Gel isoliert. Hierbei wurde die gewünschte Bande aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, zerkleinert und mit Phenol vermischt. Anschließend wurde dieses Gemisch gefroren, die Reste der Agarose durch Zentrifugation abgetrennt und die freigesetzte DNA mit Ethanol ausgefällt.

Die Ligation erfolgte mittels T4-Ligase nach Angaben des Herstellers. Bei der Ligation eines Vektors mit einem Insert betrug das molare Verhältnis von Vektor zu Insert 1:1 bis 1:3. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurde das Reaktionsgemisch mittels Temperaturschock in *E. coli* transformiert (Standardmethode nach Sambrook et al., 1989).

E. coli-Transformanten, die den Vektor pUC19 mit der zu klonierenden Fremd-DNA enthalten, wurden durch Blau-Weiß-Selektion auf Medium mit X-Gal und IPTG (siehe Abschnitt 2.1.3) isoliert (nach Sambrook et al., 1989). Durch diese Methode wurden Transformanten, die lediglich das „leere“ pUC19 enthielten, blau gefärbt; während Transformanten, die pUC19 mit Insert enthielten, weiß blieben (näheres in Sambrook et al., 1989).

2.2.5 Transformation in *P. pastoris* GS115

Die Herstellung kompetenter Zellen von *P. pastoris* GS 115 und die Transformation von Plasmiden in diesen Stamm wurde mit dem „*Pichia* EasyComp Kit“ der Fa. Invitrogen nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Vor der Transformation wurde das Plasmid pPIKA373-2 bzw. pPIC9K mit dem Restriktionsenzym *SalI* linearisiert.

Nach der Transformation wurden durch Ausplattieren auf MDH und MD Histidin-prototrophe Transformanten isoliert. Bei den HIS⁺-Transformanten wurde das Plasmid pPIKA373-2 bzw. pPIC9K ins Genom integriert (siehe Abschnitt 1.5).

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Zur Herstellung von Gelen wurde (soweit nicht anders angegeben) 0,8% (w/v) Agarose-Lösung in Tris-Acetat-EDTA-Puffer verwendet. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Gele mit wässriger Ethidiumbromid-Lösung (0,8 mg/l) angefärbt und unter UV-Licht photographiert.

Es wurden folgende DNA-Größenmarker verwendet:

Marker λ *EcoRI*/ *HindIII* (DNA des Phagen λ , geschnitten mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*/ *HindIII*): DNA-Banden von 21 kb; 5,1/ 5,0 kb; 4,3 kb; 3,5 kb; 2,0 kb; 1,9 kb; 1,5 kb; 1,4 kb; 0,9 kb; 0,8 kb und 0,6 kb (=Kilobasen = 1000 Basenpaare).

Marker λ *HindIII* (λ -DNA, geschnitten mit dem Restriktionsenzym *HindIII*): DNA-Banden von 23 kb; 9,4 kb; 6,6 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,0 kb und 0,6 kb.

Marker 2 (DNA des Plasmids pUC18-*Eco4*, geschnitten mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI*): DNA-Banden bei 7,5 kb; 5,1 kb; 2,7 kb und 0,3 kb.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Fa. Sequiserve durchgeführt.

2.3 Analytische Methoden

Die im Abschnitt 2.3.1 unter „Derivatisierung des BPA mit Dansyl-Cl“, „HPLC-Messung des Dansyl-BPA“, „Berechnung der BPA-Konzentration“ und „Präparative Derivatisierung des BPA“ beschriebenen Methoden wurden gemeinsam mit Markus Naaßner (Institut für Biologie V der RWTH Aachen) erarbeitet.

2.3.1 Extraktion und Quantifizierung von BPA

Extraktion des BPA aus wässriger Lösung

Zur Extraktion des BPA aus den wässrigen Proben wurde die Festphasenextraktion (SPE) eingesetzt. Die hierfür verwendeten Säulen (Volumen: 6 ml) waren mit „endcapped Octadecyl-Silica“ (Macherey-Nagel) gefüllt; sie wurden unmittelbar vor Gebrauch mit 6 ml Methanol und anschließend mit 6 ml Wasser konditioniert. Das BPA wurde dann aus der wässrigen Probe (Volumen: 10 oder 20 ml) extrahiert und anschließend mit 2 ml Aceton eluiert.

Derivatisierung des BPA mit Dansyl-Cl

Die Methode zur Dansylierung von BPA wurde in Anlehnung an die durch Cassidy et al. (1974) und Lawrence (1979) beschriebenen Methoden entwickelt. Das acetonische BPA-Eluat wurde mit 0,5 M Natriumcarbonat-Lösung und mit Dansyl-Cl in Pulverform (in mindestens 10fachem Überschuß) versetzt. Für die Reaktion wurden die Ansätze 1 h bei 45°C inkubiert. Anschließend wurde das Aceton im Stickstoffstrom abgeblasen, der Rückstand wurde in Toluol aufgenommen. Das Toluol wurde im Vakuum-Rotationsverdampfer entfernt, das zurückgebliebene Derivat wurde in 2 ml Acetonitril („HPLC gradient grade“) aufgenommen und partikelfrei filtriert.

HPLC-Messung des dansylierten BPA

Das HPLC-System bestand aus einem Injektor der Fa. Rheodyne mit einer 100 µl-Schleife, einem Pumpensystem „Beckman System Gold Programmable Solvent Module 125“, einem Shimadzu RF-551 spektrofluorometrischen Detektor und der Steuer- und Auswertesoftware System Gold Nouveau der Fa. Beckman. Es wurde eine ET 259/ 4 Nucleosil 100-5 C₁₈-Säule (250 X 4 mm, Macherey-Nagel) verwendet. Als mobile Phase wurden destilliertes Wasser (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B) in folgendem Gradientenprogramm verwendet: A-B (50:50, v/v) für 5 min; linearer Gradient von A-B (50:50, v/v) zu A-B (0:100, v/v) innerhalb von 15 min; A-B (0:100, v/v) für 10 min; Rückkehr zu A-B (50:50, v/v) innerhalb von 5 min; A-B (50:50, v/v) für 5 min. Die Chromatographie wurde bei einer Temperatur von 25°C, einer Flußrate von 1 ml/ min und einem Injektionsvolumen von 100 µl durchgeführt. Die Fluoreszenz-Bedingungen waren: Anregungswellenlänge 354 nm, Emissionswellenlänge 545 nm.

Berechnung der BPA-Konzentration

Aus der in der HPLC-Fluoreszenz-Messung erhaltenen Peakfläche A wurde die theoretische Menge an underivatisiertem BPA in der HPLC berechnet (vgl. Abschnitt 3.1.3) m_{BPA} [ng] berechnet.

Die BPA-Menge wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$m_{\text{BPA}} = \frac{A - 9354}{81740,7} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Nach einer Reparatur des Fluoreszenz-Detektors wurde eine neue Kalibrierung durchgeführt; die Formel änderte sich wie folgt:

$$m_{\text{BPA}} = \frac{A - 5102,6}{19264,5} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Bei einem Probenvolumen von 10 ml erhielt man die Konzentration an BPA in der Lösung durch:

$$c_{\text{BPA}} [\mu\text{g/l}] = m_{\text{BPA}} \times 2000 \quad (\text{Gleichung 3})$$

Bei einem Probenvolumen von 20 ml erhielt man die BPA-Konzentration in der Lösung durch:

$$c_{\text{BPA}} [\mu\text{g/l}] = m_{\text{BPA}} \times 1000 \quad (\text{Gleichung 4})$$

Präparative Derivatisierung des BPA

Zur Aufnahme von Fluoreszenz-Spektren und von NMR-Spektren des dansylierten BPA wurde eine größere Menge an sehr reinem Produkt benötigt. Dazu wurden 100 mg BPA mit 1 g Dansyl-Cl unter Zugabe von 100 ml 0,5 M Na_2CO_3 in Aceton umgesetzt (Durchführung der Synthese und Reinigung mit Toluol: siehe Unterabschnitt „Derivatisierung des BPA“). Nach der Entfernung des Lösemittels wurde das derivatisierte BPA durch präparative Dünnschicht-Chromatographie (Platten: SIL G-100 UV₂₅₄ der Fa. Macherey-Nagel) mit Toluol-Methanol (1:1, v/v) als mobiler Phase gereinigt. Danach wurde das gereinigte Produkt mit Acetonitril eluiert.

2.3.2 Bestimmung der BPA-Sorption

Der Hefestamm *P. pastoris* pPIKA wurde in 20 ml MD (in 50 ml-Erlenmeyerkolben) vorkultiviert. Für die Hauptkultur wurden 100 ml MD oder MM (in 300 ml-Erlenmeyerkolben) mit je 10 ml der Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde über Nacht bei 28°C unter Schütteln bis zu einer Zellzahl von $8,0 \times 10^7$ bis $2,0 \times 10^8$ Zellen/ml inkubiert.

Für den Bindungsversuch wurden aus der Hauptkultur 15 ml entnommen, zweimal mit aq.demin. (demineralisiertes Wasser) gewaschen und in 15 ml 50 mM Carbonat/ Bicarbonat-Puffer pH 9,3 aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde zu 85 ml einer über Nacht äquilibrierten Lösung von BPA in 50 mM Carbonat/ Bicarbonat-Puffer pH 9,3 gegeben (Anfangskonzentration: 2 µg BPA/l). Für Versuche, die bei pH-Werten unter 9,0 durchgeführt wurden, wurde 100 mM Natriumphosphat-Puffer verwendet.

Die Bindungsansätze (Volumen: 100 ml, in 300 ml-Erlenmeyerkolben) wurden bei 25°C geschüttelt. Zum Zeitpunkt 0 und zu bestimmten weiteren Zeiten wurden je 10 ml oder 20 ml Probe entnommen. Die in den Proben enthaltenen Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert und dann verworfen, der Überstand wurde auf seinen BPA-Gehalt hin analysiert.

Neben den Zellen für die Bindungsversuche wurden aus der Hauptkultur noch weitere 5 ml entnommen, zweimal mit aq.demin. gewaschen und zur Bestimmung des Trockengewichtes der Zellen eingesetzt.

Aus den BPA-Konzentrationen der Probe vom Zeitpunkt 0 und der zu einem weiteren Zeitpunkt entnommenen zweiten Probe wurde die Konzentrationsdifferenz Δc_{BPA} [µg/l] berechnet. Aus der Konzentrationsdifferenz, dem Volumen des Bindungsansatzes ($V = 0,1$ l) und dem Trockengewicht (TG) der eingesetzten Zellen S wurde die BPA-Sorption q berechnet (nach Volesky & May-Phillips, 1995; Ashkenazy et al., 1999 und Jalali et al., 2002):

$$q \text{ [µg/g TG]} = \frac{\Delta c \text{ [µg/l]} \times V \text{ [l]}}{S \text{ [g]}} \quad (\text{Gleichung 5})$$

2.3.3 Behandlung von BPA-bindenden Zellen mit Proteinase K

Es wurden Zellen von *P. pastoris* pPIKA in MM mit Methanol als C-Quelle kultiviert (siehe Abschnitt 2.3.1). Nach der Anzucht wurden die Zellen gewaschen und in 10 mM Tris-EDTA-Puffer pH 9,5 aufgenommen. Es wurden 7,5 mg Proteinase K hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen 24 h bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Die Zellen für den Kontrollansatz wurden ebenso behandelt, jedoch wurde keine Proteinase K zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen, in 50 mM Carbonat/ Bicarbonat-Puffer pH 9,3 aufgenommen und in Bindungsansätzen mit BPA eingesetzt.

2.3.4 Berechnung der gebundenen BPA-Moleküle pro Zelle

Zunächst wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) die Zellzahl [Zellen/ml] der für den Bindungsansatz eingesetzten Hauptkultur bestimmt (OD₆₀₀ 0,1 entspricht $5,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Da in jedem Bindungsansatz 15 ml der Hauptkultur eingesetzt wurden, wurde die Zellzahl mit 15 multipliziert, um die Zahl der tatsächlich im Bindungsansatz eingesetzten Zellen zu erhalten.

Die aus den zu den Zeitpunkten 1 min und 3 h gemessenen BPA-Konzentrationen errechnete Differenz der BPA-Konzentration [$\mu\text{g/l}$] wurde auf das tatsächliche Volumen des Bindungsansatzes (100 ml) bezogen. Aus der so erhaltenen BPA-Menge [μg] wurde die Stoffmenge [pmol] an gebundenem BPA und daraus mit Hilfe der Loschmidtschen Zahl die Zahl der gebundenen BPA-Moleküle berechnet. Der Division der Zahl der gebundenen BPA-Moleküle durch die Anzahl der Zellen im Ansatz ergab die Zahl der gebundenen BPA-Moleküle pro Zelle.

3 Ergebnisse

3.1 BPA-Analytik

Im Rahmen dieser Arbeit sollten BPA-bindenden Hefezellen konstruiert werden (siehe Abschnitt 1.6). Zur Untersuchung der BPA-Sorption dieser Zellen war eine größere Anzahl zu analysierender Proben zu erwarten. So erfordert z.B. eine Versuchsreihe zum Vergleich der BPA-Sorption des Ausgangsstammes *P. pastoris* GS 115 mit einem neuen BPA-bindenden Hefestamm die Messung von 30 Proben: Die Untersuchung zweier Stämme, jeweils auf Glucose und Methanol kultiviert, und einer Kontrolle ohne Zellen, ergibt fünf Ansätze. Zur Ermittlung der BPA-Konzentrationsdifferenz, die zur Berechnung der Sorption benötigt wird, müssen aus jedem Ansatz zwei Proben genommen werden. Für einen Stammvergleich sind also 10 Proben notwendig. Da von einem Stammvergleich drei Parallelversuche durchgeführt werden sollen, sind also $3 \times 10 = 30$ Proben zu bearbeiten.

Wegen dieser erwarteten Anzahl zu analysierender Proben sollte die Methode zur BPA-Quantifizierung mit geringem apparativem und zeitlichem Aufwand durchführbar sein.

Eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von BPA stellt die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) dar, die bereits in mehreren Fällen für die Analyse von BPA aus Wasser und Abwasser eingesetzt wurde (siehe Bolz et al., 2000; Jeannot et al., 2002; Braun et al., 2003; Zafra et al., 2003). Die GC/MS wurde jedoch als zu aufwendig angesehen, um eine größere Zahlen von Proben zu vermessen, die nur aus BPA und anorganischem Puffer bestanden, bei denen also eine Identifizierung des BPA durch MS unnötig war (siehe Abschnitt 4.1).

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von BPA ist die Messung der natürlichen Fluoreszenz des BPA. Dazu werden organische Extrakte entweder direkt (del Olmo et al., 2000) oder nach Trennung des Analyten von Begleitsubstanzen durch HPLC vermessen (Tsuda et al., 2000). In Vorversuchen wurden organische Standardlösungen von BPA mit einer an Tsuda et al. (2000) angelehnten Methode aus HPLC und Messung der natürlichen Fluoreszenz analysiert, jedoch war die Quantifizierung durch eine hohe Störanfälligkeit der natürlichen Fluoreszenz nahezu unmöglich.

Es wurde daher dazu übergegangen, die Fluoreszenz des BPA durch Derivatisierung mit dem fluorigenen Reagens 5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid (Dansyl-Cl) zu

verbessern. Die Dansylierung ist vergleichsweise einfach durchführbar und führt zur Bildung stabiler, fluoreszierender Derivate (Bencsik et al., 1998). Die Reaktion ist im Gegensatz zur Derivatisierung für die GC/MS unempfindlich gegen Wasserreste in der Reaktionslösung (vgl. Jeannot et al., 2002; Frei & Lawrence, 1973).

Die Dansylierung wird vielfach zur Messung von Aminoverbindungen eingesetzt, z.B. zur Bestimmung verschiedener aliphatischer und aromatischer Amine (Davis, 1978; Bartzatt, 2001), von Polyaminen (Leuchter, 1999; Fontaniella et al., 2001), aber auch von Aminosäuren (Levina & Nazimov, 1984) und Nitrosaminen (Cárdenes et al., 2002).

Zur Messung phenolischer Verbindungen wird Dansylierung ebenfalls verwendet, so z.B. für Hydroxybiphenyle (Frei & Lawrence, 1973; Cassidy et al., 1974), Phenol, Alkylphenole, Nitrophenole und Chlorphenole (Lawrence, 1979; Kwakman et al., 1991).

Für die Xenoöstrogene BPA und 4-Nonylphenol existierte bisher keine Methode zur Dansylierung und Quantifizierung durch Messung der Dansyl-Derivate. Daher wurde ausgehend von Frei & Lawrence (1973), Cassidy et al. (1974) und Lawrence (1979) gemeinsam mit Markus Naaßner (Institut für Biologie V) eine Methode zur Dansylierung, HPLC der Dansylderivate und Quantifizierung von BPA und 4-Nonylphenol entwickelt. Die Methode besteht aus der Derivatisierung des BPA oder 4-Nonylphenol mit Dansyl-Cl, Reinigung der Derivate, Separierung der Derivate durch HPLC und Fluoreszenz-Detektion (siehe Naassner et al., 2002). Der Einsatz dieser Methode zur Bestimmung von BPA wird in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Die Ergebnisse der Überprüfung und Kalibrierung der Methode für BPA werden in den Abschnitten 3.1.1-3.1.3 dargestellt. Für die Beschreibung der Anwendung und Überprüfung der Methode für 4-Nonylphenol wird auf die Dissertation von Markus Naaßner verwiesen.

Durch die Umsetzung von BPA mit Dansyl-Cl entsteht zweifach dansyliertes BPA (in dieser Arbeit als „Bis-Dansyl-BPA“ bezeichnet). In Abb. 3.1 ist die Dansylierungsreaktion mit den Strukturformeln schematisch dargestellt.

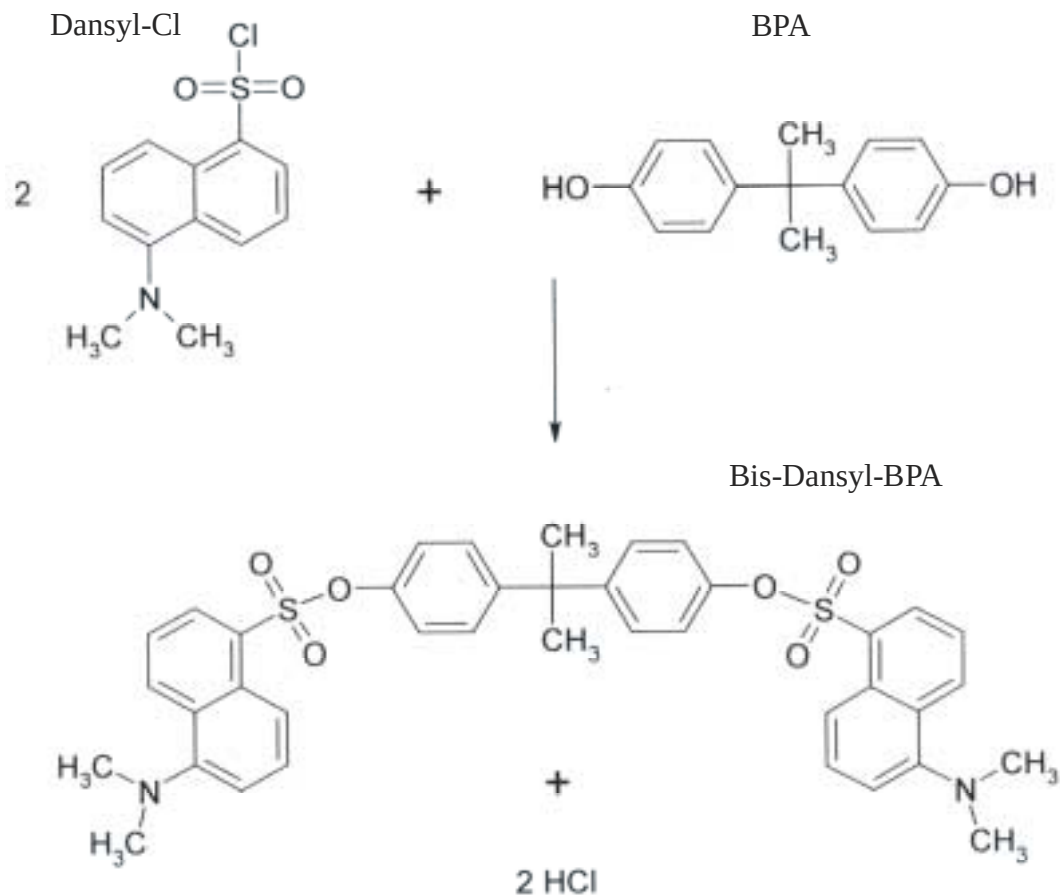


Abb. 3.1: Schema der Dansylierung des BPA

Durch die Umsetzung von 1 mol BPA mit 2 mol Dansyl-Cl entstehen 1 mol Bis-Dansyl-BPA und 2 mol HCl. Die eigentliche Reaktion findet dabei zwischen den zwei phenolischen Hydroxylgruppen des BPA und den Sulfonylgruppen der beiden Dansyl-Cl-Moleküle statt, wobei HCl abgespalten wird.

3.1.1 Fluoreszenz des dansylierten BPA

Zur Detektion des fluoreszierenden Derivates Bis-Dansyl-BPA mußten durch Aufnahme von Fluoreszenz-Anregungs- und -Emissionsspektren die geeigneten Wellenlängen festgestellt werden.

Dazu wurde eine präparative Herstellung und Reinigung von Bis-Dansyl-BPA durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.1). Von dem gereinigten und in Acetonitril gelösten Bis-Dansyl-BPA wurden Anregungs- und Emissionsspektren der Fluoreszenz aufgenommen (Abb. 3.2 und 3.3). Dazu wurde ein Spektrofluorometer FP-750 der Fa. Jasco verwendet.

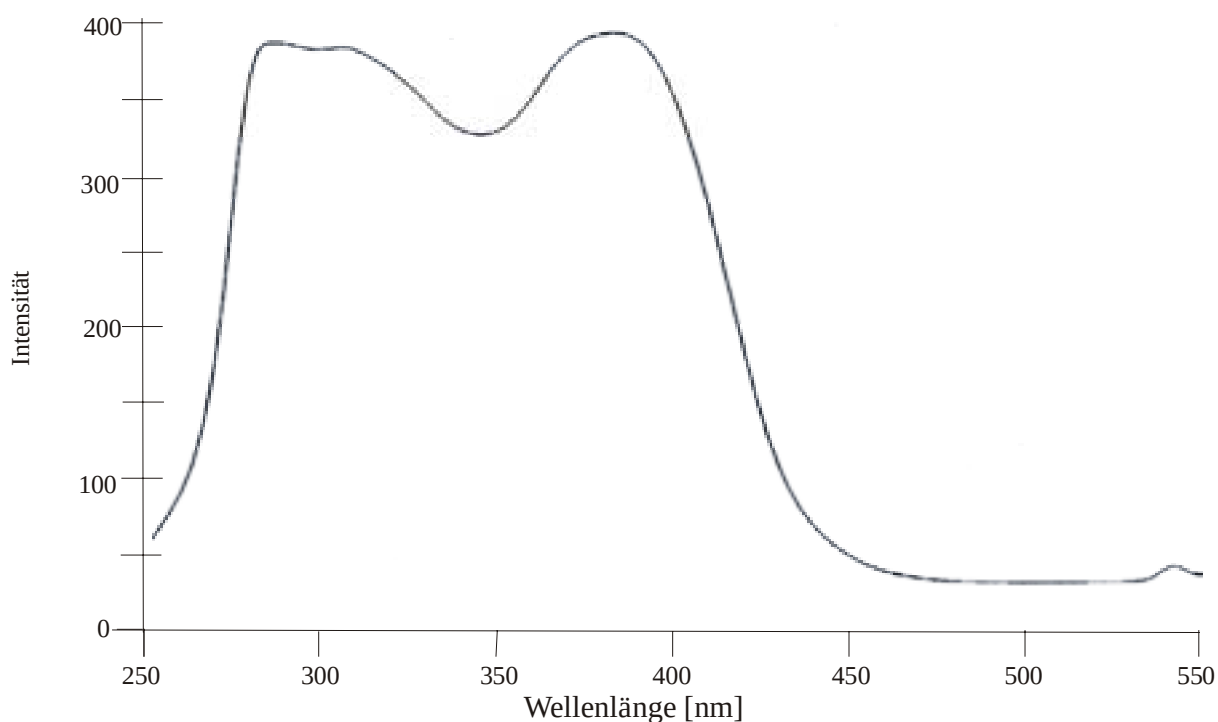


Abb. 3.2: Fluoreszenz-Anregungsspektrum des Bis-Dansyl-BPA

Die Anregung wurde bei einer Emissionswellenlänge von 543 nm gemessen.

Das Anregungsspektrum des Bis-Dansyl-BPA verläuft in Form eines Doppelpeaks mit Maxima bei 280 und 385 nm und einem „Sattel“ bei 350 nm.

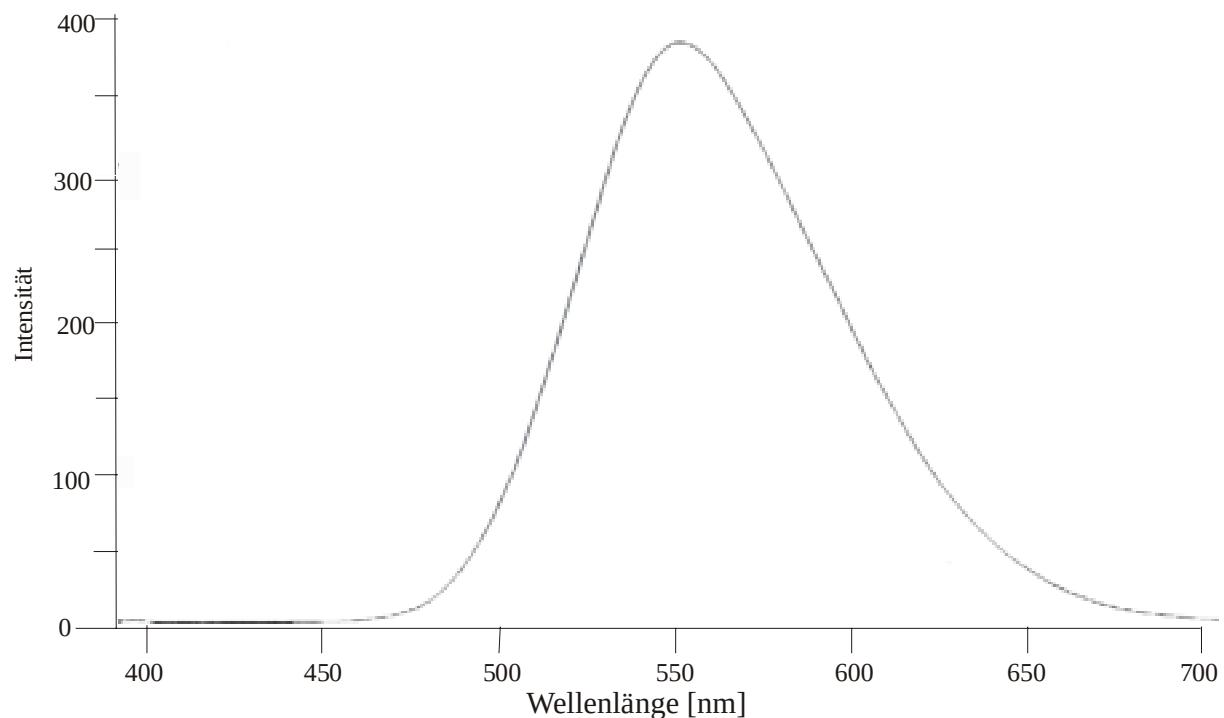


Abb. 3.3: Fluoreszenz-Emissionsspektrum des Bis-Dansyl-BPA

Die Emission wurde bei einer Anregungswellenlänge von 545 nm gemessen.

Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum des Bis-Dansyl-BPA zeigt ein eindeutiges Maximum bei 543 nm.

Nach den Spektren in Abb. 3.2 und 3.3 waren die zur Fluoreszenzdetektion des Bis-Dansyl-BPA geeigneten Wellenlängen die der Maxima des Anregungs- und Emissionsspektrums (385 und 543 nm).

Da mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode ggf. BPA und 4-Nonylphenol in einer Probe bestimmt werden sollten, wurde zur Detektion eine Anregungswellenlänge von 354 nm verwendet. Es handelte sich hierbei um das Anregungsmaximum des Dansyl-4-Nonylphenol. Nach dem in Abb. 3.2 gezeigten Spektrum ist Bis-Dansyl-BPA ebenfalls bei einer Anregungswellenlänge von 354 nm meßbar. Die Messung von Bis-Dansyl-BPA wurde demnach bei einer Anregungswellenlänge von 354 nm und einer Emissionswellenlänge von 545 nm durchgeführt.

Neben den Fluoreszenzspektren wurden auch ^1H und ^{13}C -NMR-Spektren von präparativ hergestellten und gereinigtem Bis-Dansyl-BPA aufgenommen. Damit konnte eindeutig bestätigt werden, daß bei der Reaktion von BPA und Dansyl-Cl als einziges Reaktionsprodukt Bis-Dansyl-BPA entstanden war. (vgl. Abb. 3.1).

3.1.2 Chromatographie von Bis-Dansyl-BPA

In der HPLC werden Substanzen durch ihre Retentionszeiten identifiziert. Zur Ermittlung der Retentionszeit des Bis-Dansyl-BPA wurde eine acetonische Standardlösung von BPA mit Dansyl-Cl derivatisiert (siehe Abschnitt 2.3.1). Die derivatisierte Lösung wurde in die HPLC injiziert und mit dem Fluoreszenz-Detektor (Anregungswellenlänge: 354 nm; Emissionswellenlänge: 545 nm) gemessen. Ein Ausschnitt des dadurch erhaltenen HPLC-Chromatogramms des Bis-Dansyl-BPA ist in Abb. 3.4 dargestellt.

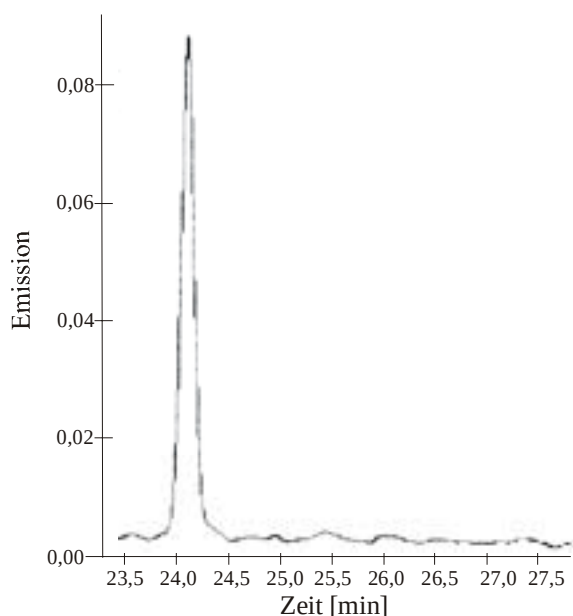


Abb. 3.4: Ausschnitt des HPLC-Chromatogramms von Bis-Dansyl-BPA.

In Abb. 3.4 erkennt man deutlich den scharfen (etwa 0,5 min breiten) Peak des Bis-Dansyl-BPA mit einer Retentionszeit von 24,1 min. Neben diesem scharfen Peak erschien im Chromatogramm zwischen 3 und 10 min noch eine durch Reagenzien und Lösemittel verur-

sachte Gruppe von Peaks (hier nicht abgebildet). Die Chromatographie belegte, daß bei der Dansylierung von BPA Bis-Dansyl-BPA als einziges Reaktionsprodukt entstanden war.

Von der Menge an Bis-Dansyl-BPA kann man daher eindeutig auf die eingesetzte BPA-Menge schließen.

3.1.3 Kalibrierung der BPA-Analytik

In der Dansylierungsreaktion wird das Dansyl-Cl gegenüber dem BPA in mindestens zehnfachem Überschuß eingesetzt (siehe Abschnitt 2.3.1), wobei das BPA vollständig zum Bis-Dansyl-BPA (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2) reagiert. Dadurch sollte die Menge an gebildetem fluoreszierenden Bis-Dansyl-BPA nur von der Mengen an eingesetztem BPA abhängen und die Intensität der Fluoreszenz (gemessen als Peakfläche) sollte der Menge an eingesetztem BPA proportional sein.

Zur Überprüfung dieses Zusammenhanges und zur Kalibrierung der BPA-Analytik wurden in einer Verdünnungsreihe acetonsche Standardlösungen von BPA mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,0 µg/ml hergestellt. Diese Lösungen wurden mit Dansyl-Cl umgesetzt und mit HPLC und dem Fluoreszenz-Detektor (siehe Abschnitt 2.3.1) vermessen. Es wurden drei solche Versuche durchgeführt.

Vor der Messung wurden für jede zu messende BPA-Standardlösung die Konzentration an unterivatisiertem BPA auf das Injektionsvolumen der HPLC (100 µl) umgerechnet, wodurch man die (theoretische) Menge an BPA [ng] in der HPLC erhielt. In Abb. 3.5 sind die so errechneten BPA-Mengen der Standardlösungen gegen die gemessenen Peakflächen aufgetragen.

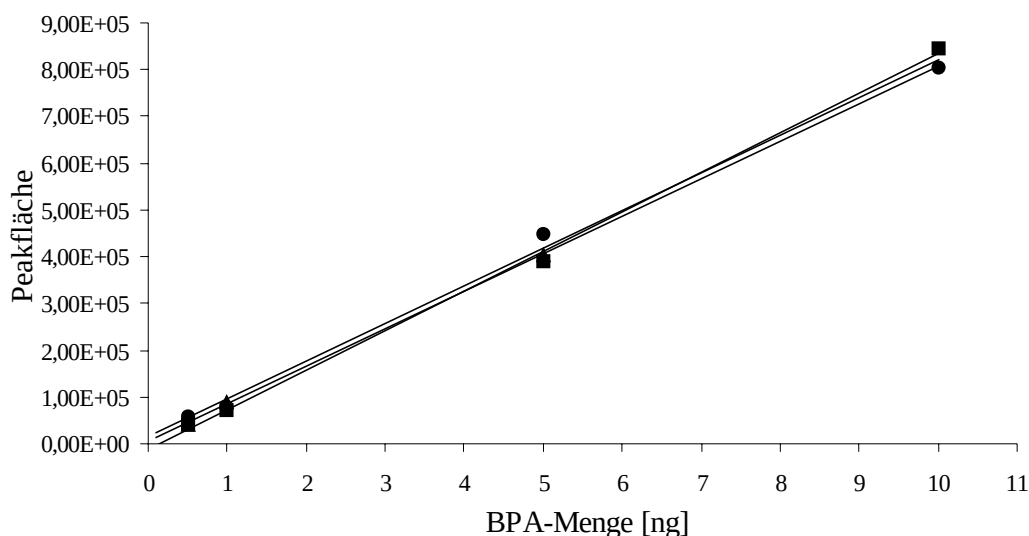


Abb. 3.5: Auftragung der gemessenen Peakfläche gegen die theoretische BPA-Menge in der HPLC.

In Abb. 3.5 ist deutlich erkennbar, daß in allen drei Versuchen die Auftragung der Peakfläche als Maß für die Fluoreszenz gegen die BPA-Menge Geraden ergab. Die Gleichungen und die Korrelationskoeffizienten R^2 dieser Geraden betrugen:

$$y = 84716x - 11712; R^2 = 0,9981$$

$$y = 80138x + 5057; R^2 = 0,9995$$

$$y = 80366x + 16009; R^2 = 0,9960$$

Nach Abb. 3.5 ist die entstandene Fluoreszenz (gemessen als Peakfläche) eindeutig proportional zur BPA-Menge. Aus der gemessenen Peakfläche läßt sich daher die eingesetzte BPA-Menge berechnen. Die in dieser Arbeit beschriebene analytische Methode ist demnach zur Quantifizierung von BPA geeignet.

Zur Quantifizierung des BPA wurde aus den drei Geradengleichungen die Gleichung (1) zur Berechnung der BPA-Menge aus der Peakfläche abgeleitet (siehe Abschnitt 2.3.1). Nach einer Reparatur des Fluoreszenz-Detektors wurde auf dieselbe Weise wie in diesem Abschnitt beschrieben eine erneue Kalibrierung durchgeführt (Diagramm nicht abgebildet); es ergaben sich folgende Geradengleichungen und Korrelationskoeffizienten:

$$y = 21107x + 479,9; R^2 = 0,9959$$

$$y = 17422x + 9725,3; R^2 = 0,9877$$

Aus diesen Geradengleichungen wurde die Gleichung (2) (siehe Abschnitt 2.3.1) abgeleitet.

Die Detektionsgrenze der in diesem Abschnitt beschriebenen Methode lag bei einer BPA-Menge von 0,1 ng; das Signal-Rausch-Verhältnis betrug 5,1. Eine Quantifizierung des BPA war bei einer Menge von über 0,5 ng möglich (Vergleiche zu anderen Methoden: siehe Abschnitt 4.1).

3.1.4 Überprüfung der BPA-Extraktion aus wässriger Lösung

In den vorausgegangenen Abschnitten wurden die Versuche zur Überprüfung und Kalibrierung der Methode zur BPA-Quantifizierung beschrieben. In diesen Versuchen wurden acetonische BPA-Standardlösungen eingesetzt.

Da in dieser Arbeit die BPA-Sorption durch Hefezellen in wässrigen Lösungen untersucht werden sollte, mußte eine geeignete Methode zur Extraktion des BPA aus wässrigen Lösungen gefunden werden. In Vorversuchen wurde zunächst die Flüssig-Flüssig-Extraktion (in Anlehnung an Cassidy et al., 1974) des BPA überprüft: Es wurden 20 ml umfassende wässrige Proben mit Ethylacetat ausgeschüttelt (pro Probe etwa 20 min), dann wurde das Ethylacetat im Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand wurde in Aceton aufgenommen, dansyliert und anschließend vermessen. Der Nachteil der Flüssig-Flüssig-Extraktion lag im Arbeitsaufwand, der sich besonders bei der Messung einer größeren Zahl Proben bemerkbar machte, sowie in der Fehleranfälligkeit der Methode (beim Ausschütteln und beim Entfernen des Ethylacetat mit anschließendem Aufnehmen in Aceton). In drei Versuchen betrug die Wiederfindung dieser Extraktion durchschnittlich $83 \pm 4\%$.

Sajiki et al. (1999) verwendeten zur Extraktion von BPA aus verdünntem Blutserum die Festphasenextraktion (SPE). Daher wurde die SPE als zweite Extraktionsmethode untersucht (Methode beschrieben in Abschnitt 2.3.1). Bei der SPE wird die wässrige Probe durch eine mit einer festen Phase (Silika) gefüllte Säule gesaugt, wobei der Analyt (BPA) an der festen Phase adsorbiert. Anschließend wird der Analyt mit organischem Lösungsmittel eluiert.

Zur Überprüfung der Extraktion des BPA aus wässriger Lösung mit SPE wurden drei wässrige BPA-Lösungen mit einer Konzentration von je 2 µg/l und einem Volumen von je 100 ml hergestellt. Von jeder Lösung wurden 20 ml entnommen; die Proben wurden durch die SPE-Säulen gesaugt, anschließend wurde das BPA mit Aceton eluiert.

Die acetonische Lösung wurde direkt mit Dansyl-Cl derivatisiert. Mit der HPLC und der Fluoreszenz-Detektion wurde anschließend die BPA-Konzentration bestimmt (Methode: siehe Abschnitt 3.2.1). Es wurden folgende Konzentrationen (Berechnung mit Gleichung (1)) gemessen: $1,8 \pm 0,1 \mu\text{g/l}$. Daraus ergab sich eine BPA-Wiederfindung von $90 \pm 5\%$.

Die SPE wies im Vergleich zur Flüssig-Flüssig-Extraktion folgende Vorteile auf: höhere Wiederfindung, geringerer Zeitaufwand (das Konditionieren einer SPE-Säule mit anschließender Extrahieren einer Probe und Elution des BPA dauerte höchstens 5 min), und eine geringere Fehleranfälligkeit, da das BPA nach der Elution bereits in Aceton vorlag und direkt derivatisiert werden konnte. Aufgrund dieser Vorteile wurde für die Sorptionsversuche die in Abschnitt 2.3.1 beschriebene SPE zur Extraktion von BPA aus wässrigen Lösungen verwendet.

Mit der SPE, der Dansylierung, der HPLC und der Fluoreszenz-Detektion, deren Überprüfung und Kalibrierung in diesem Abschnitt dargestellt wurde, wurden nach der Konstruktion des Stammes *P. pastoris* pPIKA (Abschnitt 3.2) Sorptionsversuche mit BPA durchgeführt (Abschnitt 3.3).

3.2 Konstruktion des BPA-bindenden Hefestammes *P. pastoris* pPIKA

In diesem Abschnitt wird die molekularbiologische Konstruktion des BPA-bindenden Hefestammes *P. pastoris* pPIKA beschrieben. Dazu wurden das Gen *KYE1* (siehe Abschnitt 1.4) und die 3'-Hälfte des Gens *AG α 1* (siehe Abschnitt 1.3) amplifiziert und anschließend fusioniert. Das entstandene Fusionsgen wurde über einen Expressionsvektor in die Hefe *P. pastoris* (siehe Abschnitt 1.5) transformiert, wodurch der Stamm *P. pastoris* pPIKA entstand.

3.2.1 PCR-Amplifikation und Klonierung des Gens *KYE1*

Das Gen *KYE1* aus *K. lactis* wurde durch PCR (siehe Abschnitt 2.2.3) amplifiziert. Als Template dient isolierte genomische DNA der Hefe *K. lactis*. Als Primer wurden die Oligonukleotide PYE und PYX (siehe Abschnitt 2.1.2) verwendet, wodurch das Amplifikat

am 5'-Ende eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine *XmaI*-Schnittstelle erhielt. Das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung des PCR-Ansatzes zur Amplifikation des *KYE1* ist in Abb. 3.6 dargestellt.

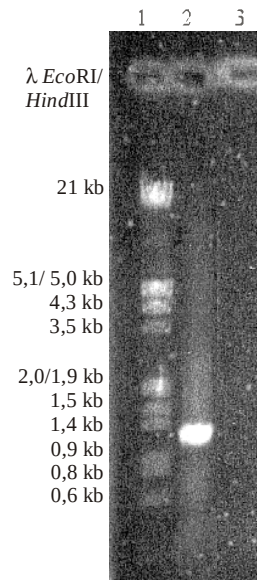


Abb. 3.6: Gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Ansatzes zur Amplifikation des Gens *KYE1*.

Bahn 1: Marker λ *EcoRI*/ *HindIII*; Bahn 2: PCR des *KYE1*; Bahn 3: PCR-Kontrolle ohne Template.

Im PCR-Ansatz ist deutlich sichtbar die Bande eines 1200 Basenpaare = 1,2 Kilobasen (kb) umfassenden DNA-Fragmentes sichtbar (Abb. 3.6). Dieses Fragment ist das Amplifikat des Gens *KYE1*.

Die Klonierung des Gens *KYE1* wurde wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Dazu wurde das *KYE1*-Amplifikat mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XmaI* in den Vektor pUC19 (Abb. 2.1) eingefügt, wodurch das neue Plasmid pUK278-9 (Abb. 3.7) entstand. Die beiden Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XmaI* wurden im Hinblick auf den späteren Einbau des *KYE1* in den *P. pastoris*-Expressionsvektor pPIC9K ausgewählt. Die Verwendung des *EcoRI* machte aufgrund des Vorhandenseins einer *EcoRI*-Schnittstelle im *KYE1* (etwa 300 Basenpaare vom 3'-Ende entfernt, siehe Abb. 3.7) einen partiellen Restriktionsschnitt notwendig, um das Zerschneiden des *KYE1* durch *EcoRI* zu verhindern. Dies wurde durch die Reduzierung der Inkubationszeit von 2 h auf 40 min erreicht.

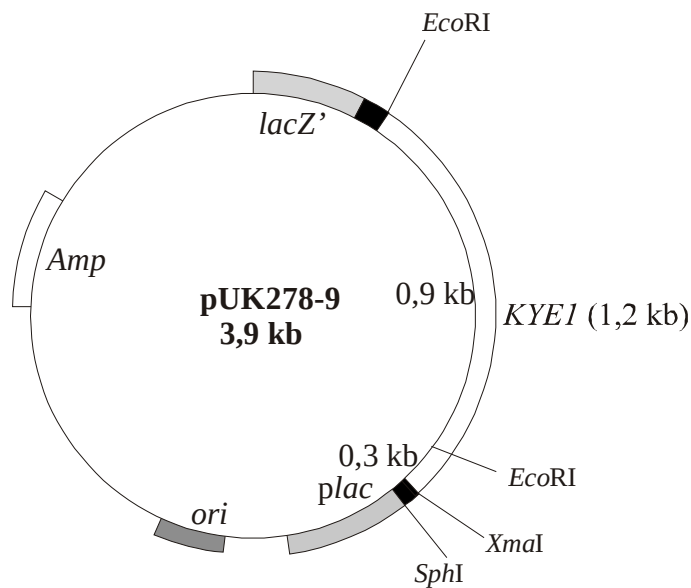


Abb. 3.7: Plasmid pUK278-9 (pUC19 mit *KYE1*).

Die Abkürzungen bedeuten (im Uhrzeigersinn): *lacZ'*, Fragment des β -Galactosidase-Gens aus *E. coli*; *KYE1*, Gen *KYE1*; *plac*, Promotor des β -Galactosidase-Gens; *ori*, Replikationsursprung aus *E. coli*; *Amp*, Gen für die β -Lactamase aus *E. coli*, die Resistenz gegen Ampicillin bewirkt.

Es sind nur die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsschnittstellen eingezeichnet. Das schwarze Segment kennzeichnet die „polycloning site“.

Das Plasmid pUK278-9 wurde in *E. coli* DH5 α transformiert (Transformation und Blau-Weiß-Selektion: siehe Abschnitt 2.2.4). Aus sechs weißen Transformanten wurde zur weiteren Überprüfung die Plasmid-DNA isoliert.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XmaI*, die auch zur Insertion des *KYE1* verwendet wurden, sowie mit dem Enzym *SphI* geschnitten. Nach der Restriktion wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.8).

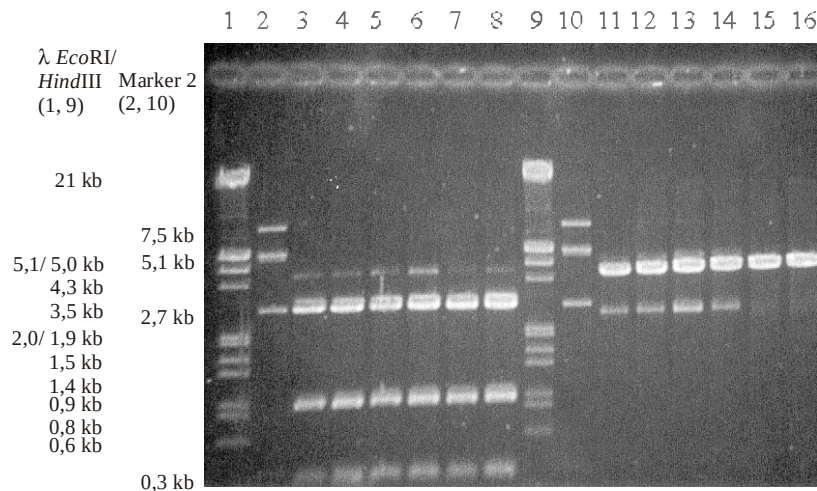


Abb. 3.8: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze von sechs Isolaten des Plasmids pUK278-9 (pUC19 mit *KYE1*).

Bahn 1: Marker λ *EcoRI/HindIII*; Bahn 2: Marker 2; Bahn 3: Isolat 1, *EcoRI/XmaI*; Bahn 4: Isolat 2, *EcoRI/XmaI*; Bahn 5: Isolat 3, *EcoRI/XmaI*; Bahn 6: Isolat 4, *EcoRI/XmaI*; Bahn 7: Isolat 5, *EcoRI/XmaI*; Bahn 8: Isolat 6, *EcoRI/XmaI*; Bahn 9: λ *EcoRI/HindIII*; Bahn 10: Marker 2; Bahn 11: Isolat 1, *SphI*; Bahn 12: Isolat 2, *SphI*; Bahn 13: Isolat 3, *SphI*; Bahn 14: Isolat 4, *SphI*; Bahn 15: Isolat 5, *SphI*; Bahn 16: Isolat 6, *SphI*

Durch die *EcoRI/XmaI*-Restriktion (Abb. 3.8) entstanden aus allen sechs Isolaten DNA-Fragmente von 3,9 kb, 2,7 kb, 0,9 kb und 0,3 kb Größe. Diese Fragmente waren das 3,9 kb umfassende ungeschnittene Plasmid pUK278-9 (siehe Abb. 3.7), der leere Vektor pUC19 mit 2,7 kb, sowie die beiden 0,9 und 0,3 kb umfassenden Fragmente des Gens *KYE1*. Diese beiden Fragmente sind durch Schnitte an beiden *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen des *KYE1*-Amplifikates entstanden. Das Erscheinen beider *KYE1*-Fragmente belegt die vollständige Insertion des Gens *KYE1* in pUC19.

Die Linearisierung des pUK278-9 durch einfachen *SphI*-Schnitt ergab bei allen sechs Plasmid-Isolaten ein deutlich sichtbares Fragment von 3,9 kb, was der Größe des pUK278-9 entsprach. Die schwächer sichtbare DNA-Bande bei etwas weniger als 2,7 kb wurde von ungeschnittenem Plasmid pUK278-9 in der superhelicalen Form verursacht.

Das neue Plasmid pUK278-9 wurde sequenziert (siehe Abschnitt 2.2.7). Der Vergleich der *KYE1*-Sequenz im pUK278-9 mit der Sequenz des *KYE1* aus der NCBI-Nucleotide-Datenbank ergab folgendes: Im klonierten *KYE1* lagen zwei „stumme“ Basenaustausche vor (d.h. Basenaustausche, die zu Triplets führten, die für dieselbe Aminosäure codierten) sowie

ein Basenaustausch, der einen Wechsel von der Aminosäure Valin zum chemisch ähnlichen Glycin bewirkte. Das Gen *KYE1* wurde demnach weitgehend korrekt amplifiziert und kloniert.

3.2.2 PCR-Amplifikation und Klonierung der 3'-Hälfte des Gens *AG α 1*

Die 3'-Hälfte des Gens *AG α 1* aus *S. cerevisiae* wurde durch PCR (siehe Abschnitt 2.2.3) amplifiziert. Als Template diente isolierte genomische DNA der Hefe *S. cerevisiae*. Als Primer wurden die Oligonukleotide PX-N und PSN (siehe Abschnitt 2.1.2) verwendet, wodurch das Amplifikat am 5'-Ende eine *Xma*I-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine *Not*I- und eine *Sph*I-Schnittstelle erhielt. Das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung des PCR-Ansatzes ist in Abb. 3.9 dargestellt.

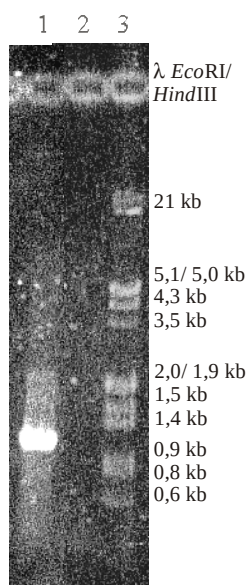


Abb. 3.9: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze zur Amplifikation der 3'-Hälfte des Gens *AG α 1*.

Bahn1: PCR des 3'-*AG α 1*; Bahn 2: PCR-Kontrolle ohne Template; Bahn 3: Marker λ *Eco*RI/ *Hind*III.

In Abb. 3.9 ist im PCR-Ansatz deutlich die Bande eines 1,0 kb umfassenden DNA-Fragmentes sichtbar. Es handelt sich hierbei um das Amplifikat der 3'-Hälfte des Gens *AG α 1*.

Das 3'-AG α 1-Amplifikat wurde wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben kloniert. Dazu wurde es mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Xma*I und *Sph*I in den Vektor pUC19 (Abb. 2.1) inseriert, wodurch das neue Plasmid pUA277-1 (Abb. 3.10) entstand.

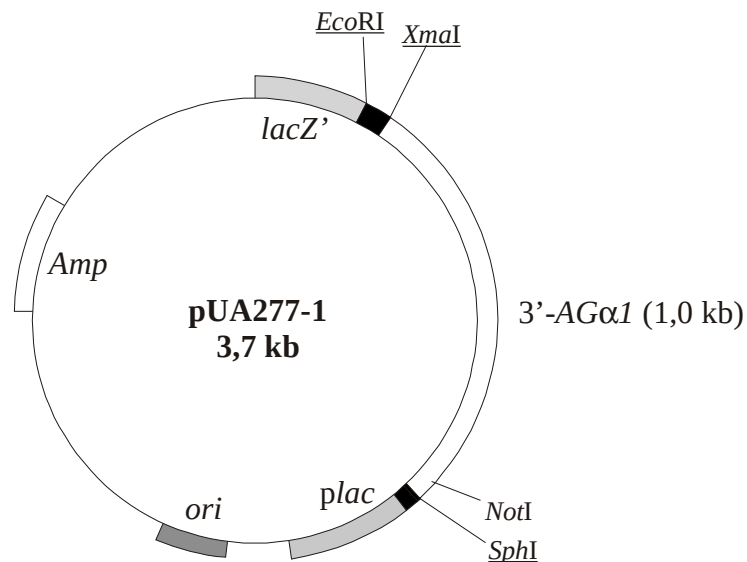


Abb. 3.10: Plasmid pUA277-1 (pUC19 mit 3'-AG α 1).

Die Abkürzungen bedeuten (im Uhrzeigersinn): *lacZ'*, Fragment des β -Galactosidase-Gens aus *E. coli*; 3'-AG α 1, 3'-Hälfte des Gens AG α 1; *plac*, Promotor des β -Galactosidase-Gens; *ori*, Replikationsursprung aus *E. coli*; *Amp*, Gen für die β -Lactamase aus *E. coli*, die Resistenz gegen Ampicillin bewirkt.

Es sind nur die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsschnittstellen eingezeichnet. Das schwarze Segment kennzeichnet die „polycloning site“. Die für die Überprüfung der Insertion wichtigen Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Das Plasmid pUA277-1 wurde in *E. coli* DH5 α transformiert (Transformation und Blau-Weiß-Selektion: siehe Abschnitt 2.2.4). Aus drei weißen Transformanten wurde zur weiteren Überprüfung die Plasmid-DNA isoliert.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Xma*I und *Sph*I, die auch zur Insertion des 3'-AG α 1 verwendet wurden, sowie mit dem Enzym *Eco*RI geschnitten. Nach der Restriktion wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.11).

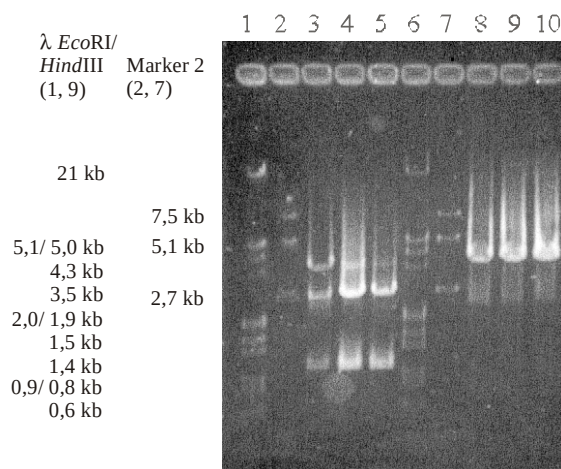


Abb. 3.11: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze von drei Isolaten des Plasmids pUA277-1 (pUC19 mit 3'-AG α 1).

Bahn 1: Marker λ *EcoRI*/ *HindIII*; Bahn 2: Marker 2; Bahn 3: Isolat 1, *XmaI*/ *SphI*; Bahn 4: Isolat 2, *XmaI*/ *SphI*; Bahn 5: Isolat 3, *XmaI*/ *SphI*; Bahn 6: Marker λ *EcoRI*/ *HindIII*; Bahn 7: Marker 2; Bahn 8: Isolat 1, *EcoRI*; Bahn 9: Isolat 2, *EcoRI*; Bahn 10: Isolat 3, *EcoRI*

Die *XmaI*/ *SphI*-Restriktion (Abb. 3.11) ergab für alle drei isolierten Plasmide DNA-Fragmente von 3,7, 2,7 und 1,0 kb Größe. Diese Fragmente waren das ungeschnittene Plasmid pUA277-1, das aus dem 1,0 kb großen 3'-AG α 1 und dem 2,7 kb umfassenden pUC19 entstanden war und das folglich 3,7 kb umfaßte, der leere Vektor pUC19 mit 2,7 kb sowie das 1,0 kb umfassende Fragment des 3'-AG α 1. Die Restriktion belegt, daß es sich bei pUA277-1 um pUC19 mit der inserierten 3'-Hälfte des Gens AG α 1 handelte.

Die Linearisierung des pUA277-1 durch einfachen *EcoRI*-Schnitt (Abb. 3.11) ergab bei allen drei Plasmid-Isolaten eine deutliche Bande von 3,7 kb, was der Größe des pUA277-1 entsprach. In denselben Ansätzen war auch eine schwächere Bande von etwas über 2,0 kb zu beobachten, die vom ungeschnittenen Plasmid pUA277-1 in der superhelicalen Form verursacht wurde.

Das neue Plasmid pUA277-1 wurde sequenziert. Der Vergleich der Sequenz der 3'-Hälfte des AG α 1 im pUA277-1 mit der Sequenz des AG α 1 aus der NCBI-Nucleotide-Datenbank (siehe Abschnitt 2.1.1) ergab, daß im klonierten 3'-AG α 1 lediglich ein „stummer“ Basenaustausch vorlag. Die 3'-Hälfte des Gens AG α 1 wurde demnach weitgehend korrekt amplifiziert und kloniert.

3.2.3 Fusion der Gene *KYE1* und 3'-*AGα1*

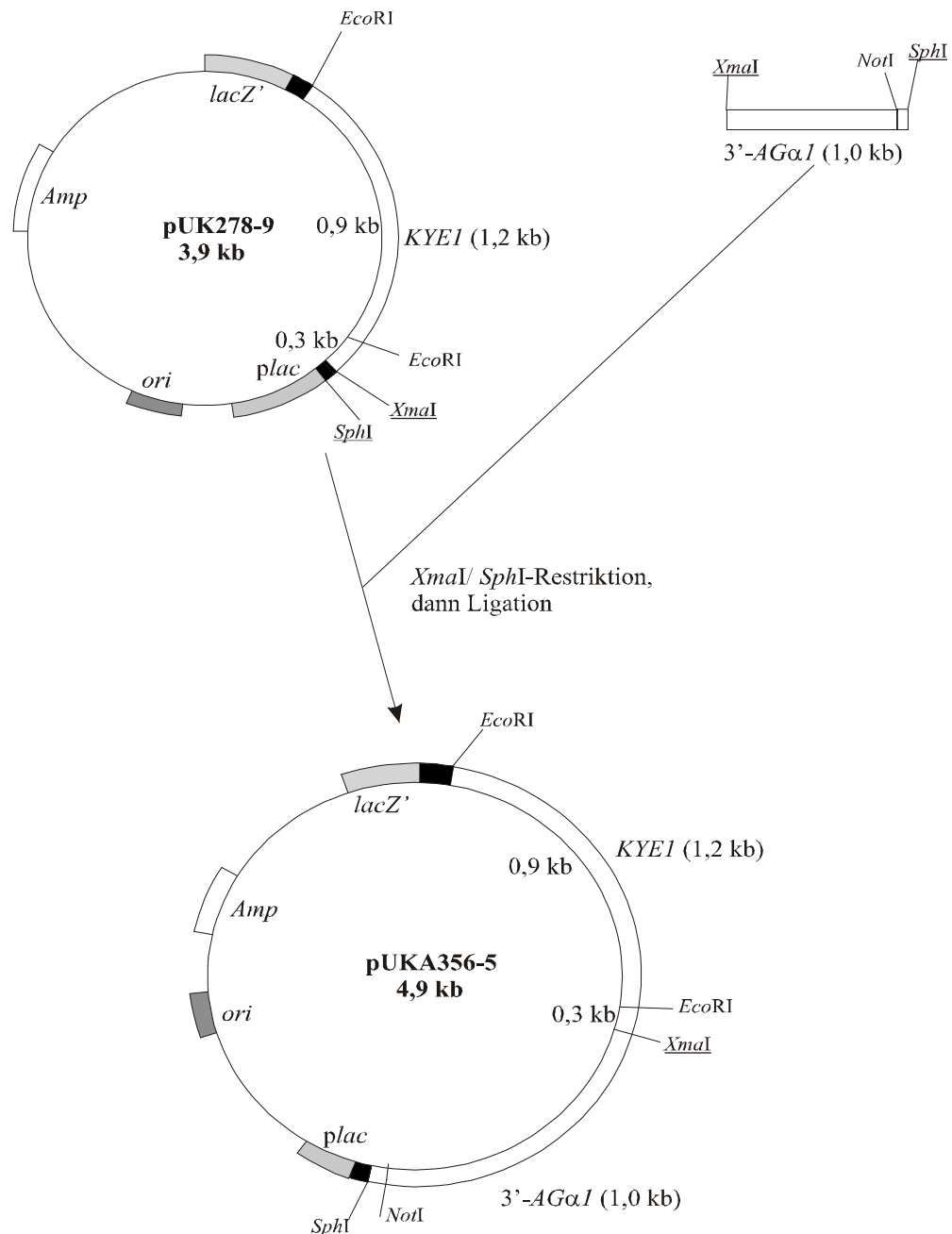


Abb. 3.12: Schema der Konstruktion des Plasmids pUKA356-5 (pUC19 mit *KYE1* und 3'-*AGα1*) zur Fusion der Gene *KYE1* und 3'-*AGα1*.

Abkürzungen im pUKA356-5 (im Uhrzeigersinn): *lacZ'*, Fragment des β -Galactosidase-Gens aus *E. coli*; *KYE1*, Gen *KYE1*; 3'-*AGα1*, 3'-Hälfte des Gens *AGα1*; *plac*, Promotor des β -Galactosidase-Gens; *ori*, Replikationsursprung aus *E. coli*; *Amp*, Gen für die β -Lactamase aus *E. coli*, die Resistenz gegen Ampicillin bewirkt. Die für die Genfusion verwendeten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Das schwarze Segment kennzeichnet die „polycloning site“ des pUK278-9.

Die Fusion des Gens *KYE1* mit der 3'-Hälfte des Gens *AGα1* ist in Abb. 3.12 schematisch dargestellt.

Vor Beginn der Fusion der beiden Gene wurde zunächst das Plasmid pUA277-1 aus *E. coli* DH5α reisoliert und mit den Restriktionsenzymen *SphI* und *XmaI* geschnitten. Die bei dieser Restriktion entstandenen Fragmente wurde durch Gelelektrophorese voneinander getrennt und das 1,0 kb-Fragment des 3'-*AGα1* (3'-*AGα1* in Abb. 3.12) wurde aus dem Gel isoliert und gereinigt (Methode: siehe Abschnitt 2.2.4).

Das Plasmid pUK278-9 (Abb. 3.12) wurde mit *XmaI* und *SphI* hinter dem Insert *KYE1* aufgeschnitten (Schnittstellen in Abb. 3.12 unterstrichen). Durch Insertion des 3'-*AGα1* an dieser Stelle entstand ein pUC19-Derivat, das die Fusion der beiden Gene *KYE1* und 3'-*AGα1* enthielt und als pUKA356-5 bezeichnet wurde (siehe Abb. 3.12).

Das Plasmid pUKA356-5 wurde in *E. coli* DH5α transformiert (Transformation und Blau-Weiß-Selektion: siehe Abschnitt 2.2.4). Aus vier weißen Transformanten wurde zur weiteren Überprüfung die Plasmid-DNA isoliert.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI*, *EcoRI* und *SphI* sowie *XmaI* und *SphI* geschnitten. Zur Kontrolle wurde das Plasmid pUK278-9 auf dieselbe Weise geschnitten. Nach der Restriktion wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.13).

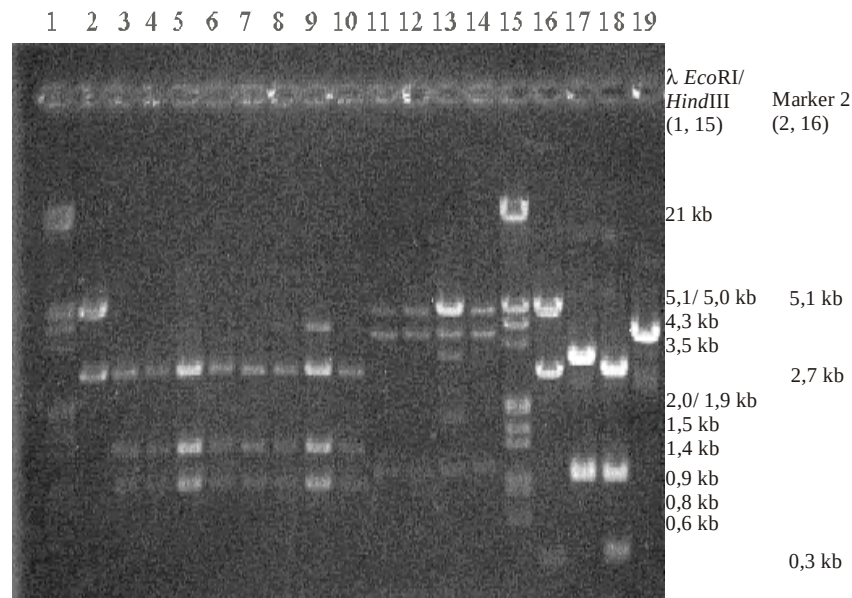


Abb. 3.13: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze von vier Isolaten des Plasmids pUKA356-5 (pUC19 mit *KYE1* und 3'-*AGα1*) und einem Isolat des Plasmids pUK278-9 (pUC19 mit *KYE1*).

Bahn 1: Marker λ *EcoRI*/ *HindIII*; Bahn 2: Marker 2; Bahn 3: Isolat 1 (pUKA356-5), *EcoRI*/ *NotI*; Bahn 4: Isolat 2 (pUKA356-5), *EcoRI*/ *NotI*; Bahn 5: Isolat 3 (pUKA356-5), *EcoRI*/ *NotI*; Bahn 6: Isolat 4 (pUKA356-5), *EcoRI*/ *NotI*; Bahn 7: Isolat 1 (pUKA356-5), *EcoRI*/ *SphI*; Bahn 8: Isolat 2 (pUKA356-5), *EcoRI*/ *SphI*; Bahn 9: Isolat 3 (pUKA356-5), *EcoRI*/ *SphI*; Bahn 10: Isolat 4 (pUKA356-5), *EcoRI*/ *SphI*; Bahn 11: Isolat 1 (pUKA356-5), *XmaI*/ *SphI*; Bahn 12: Isolat 2 (pUKA356-5), *XmaI*/ *SphI*; Bahn 13: Isolat 3 (pUKA356-5), *XmaI* / *SphI*; Bahn 14: Isolat 4 (pUKA356-5); *XmaI*/ *SphI*; Bahn 15: Marker 1 *EcoRI*/ *HindIII*; Bahn 16: Marker 2; Bahn 17: pUK278-9, *EcoRI*/ *NotI*; Bahn 18: pUK278-9, *EcoRI*/ *SphI*; Bahn 19: pUK278-9, *XmaI*/ *SphI*

Durch die *EcoRI*/ *NotI*-Restriktion (Abb. 3.13) entstanden aus den vier Isolaten des Plasmids pUKA356-5 DNA-Fragmente von 2,7 kb, 1,3 kb und 0,9 kb. Das Plasmid pUKA356-5 wurde demnach in drei Teile zerschnitten: den leeren Vektor pUC19 (2,7 kb), ein aus dem 3'-*AGα1* (1,0 kb) und dem 0,3 kb-Abschnitt des *KYE1* bestehendes Fragment von 1,3 kb sowie das 0,9 kb-Fragment des *KYE1* (siehe auch das Schema in Abb. 3.12).

Die *EcoRI*/ *SphI*-Restriktion ergab für die vier untersuchten Isolate Fragmente, die 2,7 kb, 1,3 kb und 0,9 kb umfaßten. Es handelte sich um das leere Plasmid pUC19 (2,7 kb), das 3'-*AGα1*-0,3 kb-*KYE1*-Fragment und das 0,9 kb-Fragment des *KYE1*.

Durch die *Xma*I/ *Sph*I-Restriktion des isolierten pUKA356-5 entstanden Fragmente von 4,9 kb, 3,9 kb und 1,0 kb Größe. Diese waren das von einem der beiden Enzyme linearisierte pUKA356-5 (2,7 kb des pUC19 zusammen mit 1,2 kb des *KYE1* und 1,0 kb des 3'-*AGα1*), das Plasmid pUK378-9 (2,7 kb des pUC19 mit 1,2 kb des *KYE1*) ohne das 3'-*AGα1*-Insert und das 1,0 kb umfassende 3'-*AGα1*-Insert (siehe auch Abb. 3.12)

Das als Kontrolle eingesetzte Plasmid pUK278-9 (pUC19 mit *KYE1*; Abb. 3.7) wurde im Restriktionsansatz mit *Eco*RI und *Not*I durch *Eco*RI in das leere pUC19 (2,7 kb) und die beiden Fragmente des *KYE1* (0,9 und 0,3 kb) zerschnitten. Eine *Not*I-Schnittstelle existiert im pUK278-9 nicht. Durch die Restriktion des pUK278-9 mit *Eco*RI und *Sph*I-Restriktion entstanden ebenfalls die drei Fragmente von 2,7 kb, 0,9 kb und 0,3 kb. Die Restriktion mit *Xma*I und *Sph*I ergab eine einfache Linearisierung des 3,9 kb großen Plasmids pUK278-9.

Die Ergebnisse der Restriktion des pUKA356-5 und der Vergleich mit dem als Kontrolle eingesetzten pUK278-9, das nicht die 3'-Hälfte des *AGα1* enthält, belegen, daß das Plasmid pUKA356-5 aus pUC19 mit der Fusion aus dem Gen *KYE1* und der 3'-Hälfte des Gens *AGα1* besteht.

3.2.4 Insertion des *KYE1*-3'-*AGα1* in den *P. pastoris*-Expressionsvektor pPIC9K

Zur Expression des *KYE1*-3'-*AGα1*-Fusionsgens in der Hefe *P. pastoris* wurde das *KYE1*-3'-*AGα1*-Fusionsgen in den Expressionsvektor pPIC9K (siehe Abschnitte 1.5 und 2.1.2) inseriert. Dafür wurde das Plasmid pUKA356-5 aus *E. coli* DH5α reisoliert und mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I geschnitten. Um ein Zerschneiden des Fusionsgens durch *Eco*RI an der Schnittstelle innerhalb des *KYE1* (siehe Schema des Plasmids pUKA356-5 in Abb. 3.12) zu verhindern, wurde eine Partialrestriktion mit *Eco*RI durchgeführt. Die bei dieser Restriktion entstandenen Fragmente wurden durch Gelelektrophorese voneinander getrennt und das 2,2 kb-Fragment des *KYE1*-3'-*AGα1*-Fusionsgens wurde aus dem Gel isoliert und gereinigt (Methode: siehe Abschnitt 2.2.4).

Der Vektor pPIC9K (Abb. 2.2) wurde ebenfalls mit *Eco*RI und *Not*I geschnitten und das *KYE1*-3'-*AGα1*-Fusionsgen wurde zwischen dem Gen des α-Faktor-präpro-Peptids und der

AOX1-Terminatorsequenz inseriert. Das auf diese Weise entstandene neue Plasmid wurde als pPIKA373-2 bezeichnet (Abb. 3.14).

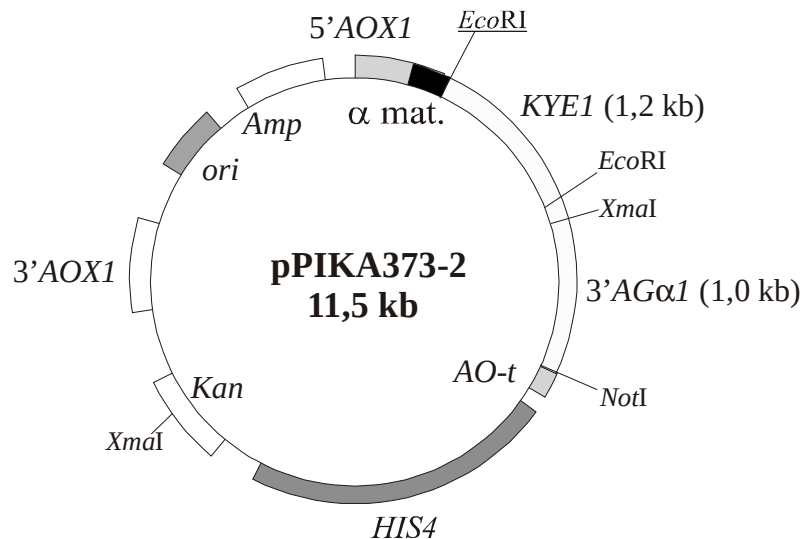


Abb. 3.14: Plasmid pPIKA373-2 (pPIC9K mit *KYE1* und 3'-*AGα1*).

Abkürzungen (im Uhrzeigersinn): 5'AOX1, 750 bp-Fragment des Alkoholoxidase-Promotors; α mat., Gen des α-Faktor-präpro-Peptids; *KYE1*: Gen *KYE1*; 3'-*AGα1*, 3'-Hälfte des Gens 3'-*AGα1*; AO-t, 300 bp-Fragment der Alkoholoxidase-Terminatorsequenz; *HIS4*, 2,8-kb-Fragment des Histidinol-Dehydrogenase-Gens aus *P. pastoris* zur Komplementation des defekten *his4* Gens in *P. pastoris* GS 115; *Kan*, Gen aus *E. coli*, das Resistenz gegen Kanamycin vermittelt; 3'AOX1, 650 bp-Fragment aus der 3'-Region des Gens *AOX1*; *ori*, Replikationsursprung aus *E. coli*; *Amp*, Gen für die β-Lactamase aus *E. coli*, die Resistenz gegen Ampicillin bewirkt. Es sind nur die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsschnittstellen eingezeichnet.

Das Plasmid pPIKA373-2 wurde in *E. coli* DH5α transformiert (Transformation und Blau-Weiß-Selektion: siehe Abschnitt 2.2.4). Aus zwei weißen Transformanten wurde zur weiteren Überprüfung die Plasmid-DNA isoliert.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI*, *EcoRI*, *NotI* sowie *XmaI* geschnitten. Nach der Restriktion wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.15).

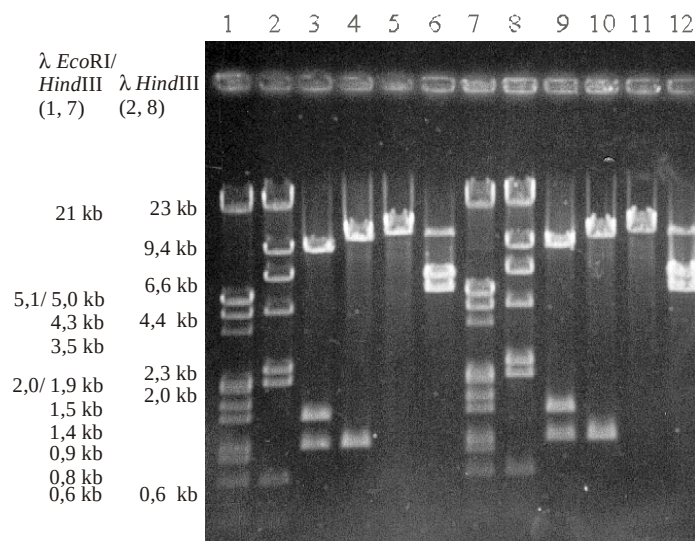


Abb. 3.15: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktionsansätze von zwei Isolaten des Plasmids pPIKA373-2 (pPIC9K mit *KYE1*-3'-*AG α 1*-Fusionsgen)

Bahn 1: Marker λ *EcoRI*/*HindIII*; Bahn 2: Marker λ *HindIII*; Bahn 3: Isolat 1, *EcoRI*/*NotI*; Bahn 4: Isolat 1, *EcoRI*; Bahn 5: Isolat 1, *NotI*; Bahn 6: Isolat 1, *XmaI*; Bahn 7: Marker λ *EcoRI*/*HindIII*; Bahn 8: Marker λ *HindIII*; Bahn 9: Isolat 2, *EcoRI*/*SphI*; Bahn 10: Isolat 2, *EcoRI*; Bahn 11: Isolat 2, *NotI*; Bahn 12: Isolat 2, *XmaI*.

Durch die *EcoRI*/*NotI*-Restriktion entstanden aus den Plasmidisolaten DNA-Fragmente von 9,3 kb, 1,3 kb und 0,9 kb. Dies waren das leere Plasmid pPIC9K (9,3 kb), ein Fragment aus 3'-*AG α 1* (1,0 kb) und dem 0,3 kb-Teil des *KYE1* und das 0,9 kb-Fragment des *KYE1* (siehe auch Abb. 3.14).

Die *EcoRI*-Restriktion führte zur Entstehung eines 9,6 kb großen Fragments aus pPIC9K (9,3 kb) mit dem 0,3 kb-Abschnitt des *KYE1* und des 0,9 kb-Fragments des *KYE1*.

Die Restriktionen mit *NotI* ergaben für beide Isolate Fragmente von 11,5 kb. Dies entsprach der Größe des linearisierten pPIKA373-2: 9,3 kb pUC19 mit 1,2 kb *KYE1* und 1,0 kb 3'-*AG α 1*.

Durch die Restriktion mit *XmaI* entstanden Fragmente von 11,5 kb, 6,3 kb und 5,2 kb. Die beiden kleineren Fragmente entstanden durch *XmaI*-Schnitte im Fusionsgen (zwischen *KYE1* und 3'-*AG α 1*) und im vom pPIC9K stammenden Gen Kan (siehe Abb. 3.14). Bei dem 11,5 kb-Fragment handelte es sich um pPIKA373-2, in dem aufgrund der großen Menge an DNA das Enzym *XmaI* nur an einer der beiden möglichen Stellen geschnitten hat.

Die Restriktionen belegen, daß das *KYE1-3'-AG α 1*-Fusionsgen erfolgreich in den Vektor pPIC9K inseriert wurde. Dies wurde besonders durch die Restriktion mit *XmaI* nachgewiesen. Während nämlich pPIC9K nur eine *XmaI*-Schnittstelle (im Gen *Kan*) hat, besitzt das Plasmid pPIKA 373-2 zwei: die im Gen *Kan* und die im Fusionsgen (vgl. Abb. 3.14).

3.2.5 Transformation des pPIKA373-2 in *P. pastoris*

Die Transformation des Plasmids pPIKA373-2 in den Hefestamm *P. pastoris* GS115 wurde wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle wurde das Plasmid pPIC9K in den Stamm GS115 transformiert.

Nach der Transformation sollte das Plasmid pPIKA373-2 über das Gen *HIS4* ins Genom der Hefe integrieren. Die Integration ist schematisch in Abb. 3.16 dargestellt.

Nach der Transformation mit pPIKA373-2 wurden zwei Histidin-prototrophe Kolonien isoliert, aus denen zur Überprüfung der Integration die genomische DNA isoliert wurde. Die Integration des Plasmids pPIKA373-2 ins Genom von *P. pastoris* wurde mit Hilfe der PCR unter Verwendung der Oligonukleotide P5AOX1 und PSN als Primer überprüft (Abb. 3.16).

Im Falle einer Integration des Plasmids pPIKA373-2 sollte durch die PCR ein 3,4 kb umfassendes Amplifikat des Bereiches aus AOX1-Promotor, Gen des präpro- α -Faktors und des *KYE1-3'-AG α 1*-Fusionsgens entstehen (Abb. 3.16).

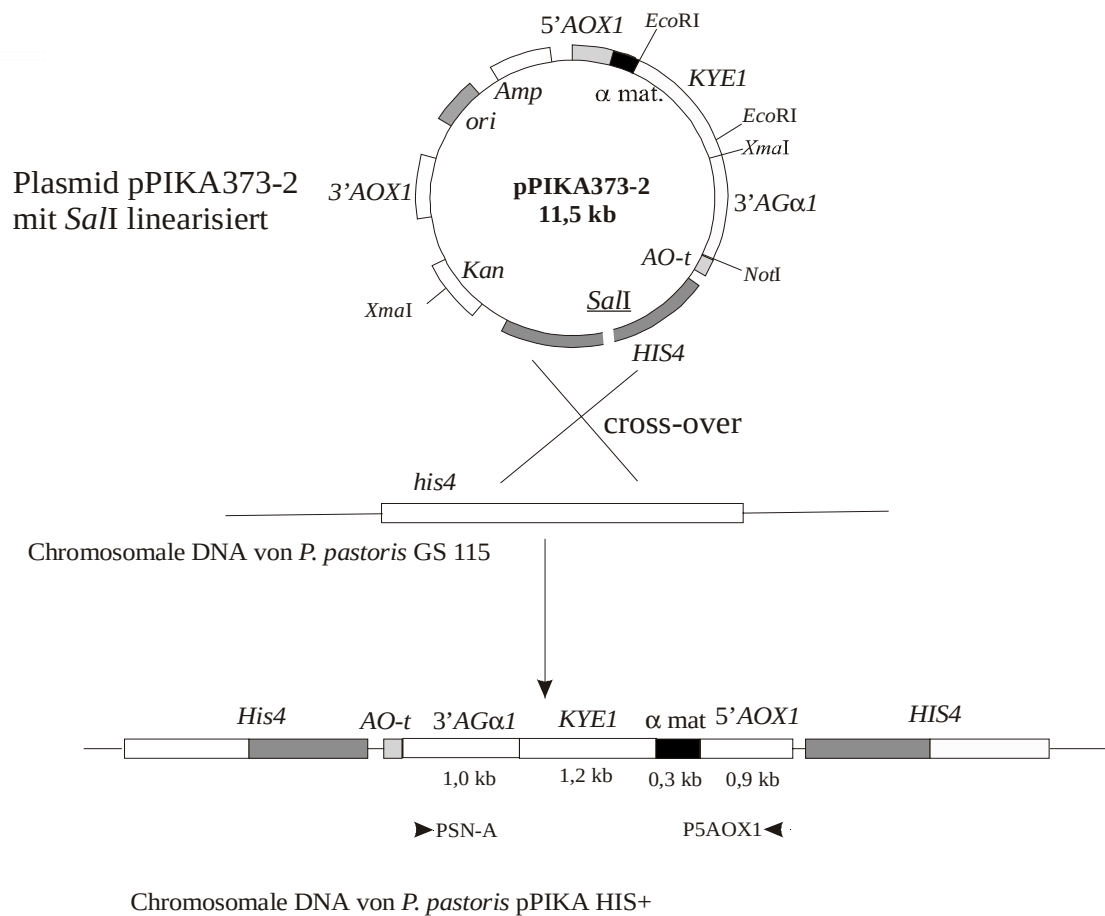


Abb. 3.16: Schema der Integration des Plasmids pPIKA373-2 über das *HIS4*-Gen ins Genom von *P. pastoris* GS 115.

Abkürzungen im pPIKA373-2: siehe Abb. 3.14.

his4, das defekte Histidinol-Dehydrogenase-Gen des Stammes *P. pastoris* GS 115; P5AOX1 und PSN-A bezeichnen die Primer, die zur Überprüfung der Integration verwendet wurden.

Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese der P5AOX1/ PSN-PCR mit genomischer DNA aus zwei pPIKA-Transformanten, einer pPIC9K-Transformante als Kontrolle und aus *P. pastoris* GS115 ohne integriertes Plasmid ist in Abb. 3.17 dargestellt.

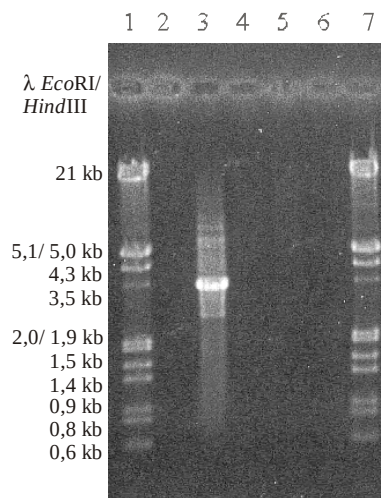


Abb. 3.17: Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte der PCR von genomischer DNA zweier *P. pastoris*- Transformanten mit den Primern P5AOX1 und PSN.

Bahn 1: Marker λ EcoRI/ HindIII; Bahn 2: PCR mit DNA der Transformante 1; Bahn 3: PCR mit DNA der Transformante 3; Bahn 4: PCR der Kontrolltransformante mit pPIC9K; Bahn 5: PCR des Stammes *P. pastoris* GS115; Bahn 6: PCR-Kontrolle ohne Template; Bahn 7: Marker λ EcoRI/ HindIII

Das Ergebnis der PCR (Abb. 3.17) entsprach den Erwartungen: Während in den Ansätzen mit der DNA des Stammes *P. pastoris* GS 115 und der pPIC9K-Kontrolltransformante kein Amplifikat zu beobachten war, ergab die PCR mit der DNA der Transformante 2 das gesuchte 3,4 kb umfassende Produkt. Es handelt sich hierbei um das Amplifikat des Bereiches aus dem AOX1-Promotor, dem Gen des präpro- α -Faktors, *KYE1* und 3'-AG α 1 (siehe Abb. 3.16). Demnach ist bei der Transformante 2 das Plasmid pPIKA373-2 ins Genom integriert worden.

Die Transformante ist der neue Hefestamm *P. pastoris* pPIKA. Die Versuche zur BPA-Sorption dieses neuen Stammes sind in Abschnitt 3.3 beschrieben.

3.3 BPA-Sorption des neuen Stammes *P. pastoris* pPIKA

In diesem Abschnitt werden die Versuche zur BPA-Sorption des neuen Stammes *P. pastoris* pPIKA, dessen Herstellung in Abschnitt 3.2 erläutert wurde, beschrieben.

Die BPA-Konzentrationen wurden mit den in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen und in den Versuchen des Abschnittes 3.1 überprüften Methoden (SPE, Dansylierung, HPLC und Fluoreszenzdetektion) gemessen. Die BPA-Sorptionen wurde mit den in Abschnitt 2.3.1 angegebenen Formeln berechnet. Die in den Versuchen dieses Abschnittes häufig verwendete BPA-Anfangskonzentration von 2 µg/l wurde gewählt, da sie mit der in den Abschnitten 2.3.1 und in 3.1 beschriebenen Methode gut meßbar ist; außerdem liegt sie noch im Bereich der geringen, in der Umwelt vorkommenden BPA-Konzentrationen (vgl. Abschnitt 1.2).

3.3.1 pH-Abhängigkeit der BPA-Sorption des Stammes *P. pastoris* pPIKA

Die Sorption von Metallionen an lebenden Hefen, Schimmelpilzen und Bakterien wird durch den pH-Wert beeinflusst (Blackwell et al., 1995). Es ist daher zu erwarten, daß auch die BPA-Sorption durch die Zellen des neuen Stammes *P. pastoris* pPIKA vom pH-Wert abhängt.

Zur Messung von reproduzierbaren und mit der Literatur vergleichbaren Sorptionswerten ist es notwendig, den für die Sorption optimalen pH-Wert zu kennen. Dies erforderte die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der BPA-Sorption des neuen Stammes und dem pH-Wert der wäßrigen BPA-Lösung.

Für die Versuche wurde *P. pastoris* pPIKA mit Methanol als Kohlenstoffquelle kultiviert, da die Expression des durch den AOX1-Promotor kontrollierten *KYE1-3'-AGα1*-Fusionsgens in Abhängigkeit von Methanol erfolgen sollte (Cereghino & Cregg, 2000). Es wurden Bindungsansätze bei vier verschiedenen pH-Werten durchgeführt: 7,0; 8,0; 9,3 und 10,2. Die Versuchsreihe wurde dreimal mit jeweils unterschiedlichen eingesetzten Trockengewichten wiederholt (siehe Abb. 3.18). In allen Versuchen wurden 2 µg BPA/l als Anfangskonzentration eingesetzt, das Probenvolumen betrug 20 ml und die BPA-Konzentrationen wurden mit der Gleichung (2) berechnet. Probenahme erfolgte nach 1 min und 3 h. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.18 dargestellt.

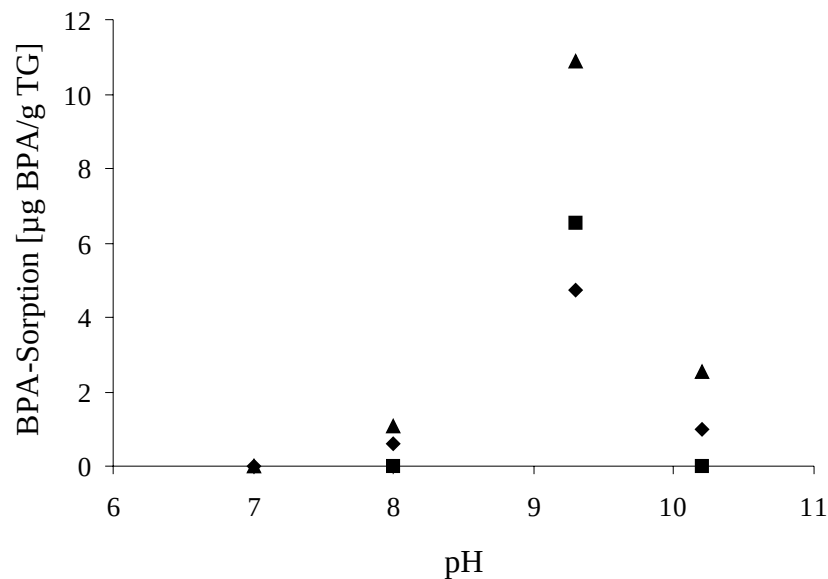


Abb. 3.18: Einfluß des pH-Wertes auf die BPA-Sorption von *P. pastoris* pPIKA.

Jede Punktdarstellung (Raute, Quadrat, Dreieck) steht für eine Versuchsreihe. Die eingesetzten Trockengewichte betragen: Raute: 21,6 mg, Quadrat: 6,9 mg, Dreieck: 12,3 mg.

In einer Versuchsreihe (Quadrat) wurde die Sorption bei pH 7,0 nicht gemessen.

In allen Versuchen wurde unabhängig vom eingesetzten Trockengewicht bei pH 7,0; 8,0 und 10,2 keine oder nur eine schwache Sorption gemessen, während bei pH 9,3 stets die höchste BPA-Sorption gemessen wurde (Abb. 3.18). Dieser pH-Wert liegt im Bereich des pH-Optimums der Bindung von Chlorphenol durch isoliertes OYE (ein Homologes des *KYE1*-Genproduktes; Abramovitz & Massey, 1976B). Diese Ähnlichkeit der pH-Optima wird in Abschnitt 4.3.1 ausführlicher diskutiert.

Alle folgenden Sorptionsversuche wurden bei dem optimalen pH-Wert von 9,3 durchgeführt.

3.3.2 Vergleich der BPA-Sorption von *P. pastoris* pPIKA mit der des Ausgangsstammes *P. pastoris* GS 115

Durch den Vergleich der BPA-Sorption des Stammes *P. pastoris* pPIKA mit der des Ausgangsstammes *P. pastoris* GS 115 sollte nachgewiesen werden, daß der neue Stamm eine höhere BPA-Sorption besitzt als der Ausgangsstamm. Für die Sorptionsvergleiche wurde der pH-Wert von 9,3 verwendet (siehe Abschnitt 3.3.1).

Der Stamm *P. pastoris* GS 115 und der neue Stamm *P. pastoris* pPIKA mit dem *KYE1-3'-AG α 1*-Fusionsgen unter der Kontrolle des methanolregulierten *AOX1*-Promotors wurden beide jeweils mit Glucose und Methanol als Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Stämme wurden in BPA-Sorptionsversuchen eingesetzt. Zusätzlich wurden Kontrollversuche ohne Zellen angesetzt, um eine mögliche unspezifische Bindung des BPA durch Glas zu bestimmen.

Die Versuche wurden wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden Versuche mit jeweils unterschiedlichen Trockengewichten (siehe Legende der Abb. 3.19) durchgeführt. Die Anfangskonzentration von BPA betrug 2 µg BPA/l; der pH der Lösung wurde mit Puffer bei 9,3 gehalten. Im ersten Versuch (graue Säulen in Abb. 3.19) betrug das Probenvolumen 20 ml und die BPA-Konzentrationen wurden mit der Gleichung (1) berechnet. In den beiden anderen Versuchsreihen (schwarze und punktierte Säulen in Abb. 3.19) betrug das Probenvolumen 10 ml und die BPA-Konzentrationen wurden nach Gleichung (2) berechnet. Probenahmen erfolgten nach 1 min und 3 h. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 3.19 dargestellt.

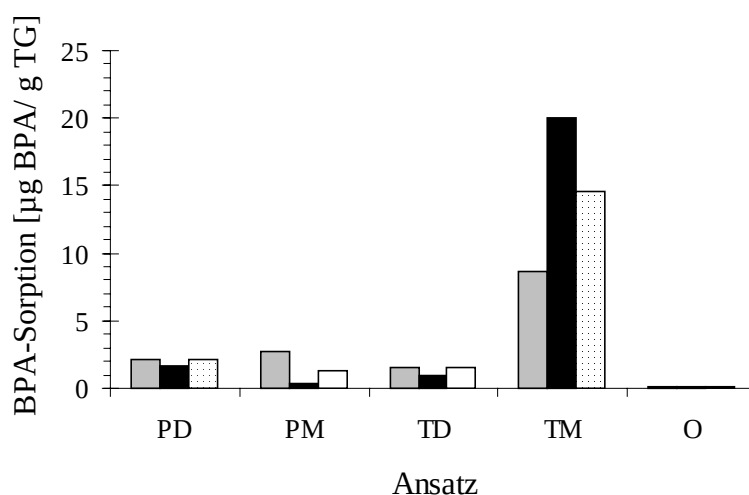


Abb. 3.19: Vergleich der BPA-Sorption des Ausgangsstammes *P. pastoris* GS 115 und des neuen Stammes *P. pastoris* pPIKA in gepufferter wässriger Lösung bei pH 9,3

Jedes Säulenmuster (grau, schwarz und punktiert) steht für eine Versuchsreihe.

PD: Bindungsversuche mit *P. pastoris* GS 115, die mit Glucose kultiviert wurde

eingesetzte Trockengewichte: 63,9 mg; 28,3 mg; 22,5 mg

PM: Bindungsversuche mit *P. pastoris* GS 115, die mit Methanol kultiviert wurde

eingesetzte Trockengewichte: 21,6 mg; 10,2 mg; 8,7 mg

TD: Bindungsversuche mit *P. pastoris* pPIKA, die mit Glucose kultiviert wurde (schwarz: q = 0)

eingesetzte Trockengewichte: 50,4 mg; 39,3 mg; 30,3 mg

TM: Bindungsversuche mit *P. pastoris* pPIKA, die mit Methanol kultiviert wurde

eingesetzte Trockengewichte: 25,5 mg; 6,0 mg; 8,4 mg

O: Kontrollversuche ohne Zellen (in allen Versuchen q = 0)

Das Ergebnis war in allen Versuchsreihen ähnlich: Der Ausgangsstamm *P. pastoris* GS 115 zeigte nur eine schwache BPA-Sorption mit Werten unter 3 µg BPA/g Trockengewicht, unabhängig davon, ob die Zellen mit Methanol oder Glucose kultiviert worden waren (Abb. 3.19). Der neue Stamm *P. pastoris* pPIKA, der mit Glucose kultiviert worden war, zeigte ebenfalls nur eine schwache BPA-Sorption (Abb. 3.19). Derselbe Stamm, auf Methanol kultiviert, zeigte dagegen deutlich erhöhte BPA-Sorptionen mit Werten von 8 µg BPA/ g Trockengewicht bis 20 µg BPA/ g Trockengewicht.

Die unterschiedlichen Werte der BPA-Sorption des Stammes *P. pastoris* pPIKA (Abb. 3.19) hingen mit den unterschiedlichen eingesetzten Trockengewichten zusammen: je geringer das eingesetzte Trockengewicht, desto höher war die BPA-Sorption. Diese Erscheinung wird in Abb. 3.3.5 näher erläutert.

In Abb. 3.19 wird deutlich, daß die BPA-Sorption des neuen Stammes höher ist als die des Ausgangsstammes und daß die Fähigkeit des neuen Stammes zur BPA-Sorption erwartungsgemäß (vgl. Cereghino & Cregg, 2000) von der Kultivierung mit Methanol abhängt. Dies bedeutet, daß die BPA-Sorption von dem *KYE1-3'-AG α 1*-Fusionsgen verursacht wurde, da dieses vom methanolregulierten *AOX1*-Promotor kontrolliert wird (weiteres hierzu: siehe Abschnitt 4.3.2).

3.3.3 Überleben der Zellen bei pH 9,3 ohne Kohlenstoffquelle

In diesem Versuch sollte nachgewiesen werden, daß die Zellen von *P. pastoris* pPIKA auch nach über 6 h bei pH 9,3 ohne Kohlenstoffquelle noch lebensfähig waren. Damit sollte belegt werden, daß es sich bei der BPA-Sorption um einen Vorgang an lebenden Zellen handelt.

Die Einflüsse des pH-Wertes von 9,3, von BPA und des Mangels an Kohlenstoffquelle auf das Überleben der Zellen wurden durch Versuche überprüft, in denen die Zellen bis zu 23 h bei pH 9,3 ohne Kohlenstoffquelle inkubiert wurden; einem der Ansätze wurde 2 µg BPA/l zugegeben. Es wurden nach 1 min, 1 h, 3 h, 6 h und 23 h Proben genommen. Die Proben wurden 1:100 bzw. 1:200 verdünnt, von jeder Verdünnung wurden anschließend 100 µl auf YPD-Vollmedium ausplattiert. Nach einer Inkubation der Platten von 2 Tagen bei 28°C wurde die Zahl der Kolonien auf den Platten bestimmt und daraus die Zellzahl in den Ansätzen berechnet. Die Entwicklung der Zellzahlen in den Ansätzen ist in Abb. 3.20 dargestellt.

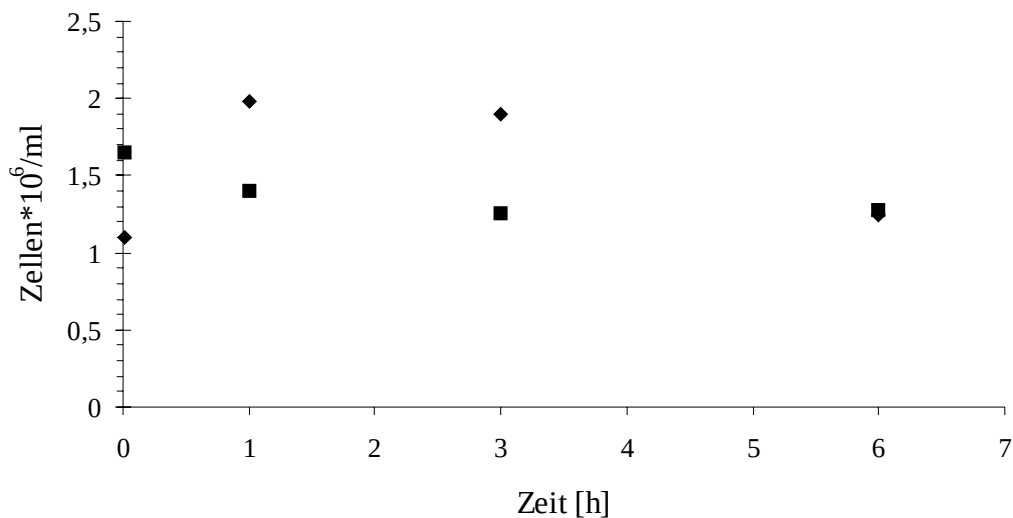


Abb. 3.20: Auftragung der Zellzahl von *P. pastoris* pPIKA gegen die Zeit in Ansätzen mit pH 9,3 ohne Kohlenstoffquelle.

Der durch eine Raute gekennzeichnete Ansatz enthielt kein BPA, der durch ein Quadrat gekennzeichnete 2 µg BPA/l.

In Abb. 3.20 zeigen sich zwar deutliche Schwankungen der Zellzahlen, aber keine Tendenz nach oben oder unten. Auch nach 23 h veränderten sich die Zellzahlen nicht (nicht dargestellt). Ein Unterschied zwischen dem Ansatz mit BPA und dem Ansatz ohne BPA konnte nicht festgestellt werden.

Die Zellen in den Ansätzen bei pH 9,3 ohne C-Quelle waren noch lebensfähig, zeigten aber weder ein Wachstum noch starben sie ab. Eine BPA-Konzentration von 2 µg/l beeinflusste demnach die Lebensfähigkeit der Zellen nicht.

3.3.4 Kinetik der BPA-Sorption

Die Kinetiken (Sorption in Abhängigkeit von der Zeit) zeigen, wie schnell die Sorption verläuft und ob die BPA-Sorption durch *P. pastoris* pPIKA eine Sorption an der Zelloberfläche oder eine Aufnahme von BPA in die Zellen darstellt (vgl. Mogollón et al., 1998; Puranik & Paknikar, 1999).

Kinetik bei geringem Trockengewicht

Die hier beschriebenen Versuche wurden bei pH 9,3 und einer Anfangskonzentration von 2 µg BPA/l mit *P. pastoris* pPIKA durchgeführt, die mit Methanol kultiviert worden war. Die eingesetzten Trockengewichte (Maß für die eingesetzte Zellmasse) lagen zwischen 5,3 und 7,7 mg; Proben wurden nach 1 min, 10 min, 30 min, 1 h, 3 h und 6 h entnommen. Die BPA-Konzentrationen zur Berechnung der Sorption wurden mit der Gleichung (2) berechnet, das Probenvolumen war 10 ml. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. In Abb. 3.21 ist die Sorption gegen die Zeit aufgetragen (Sorptionskinetik).

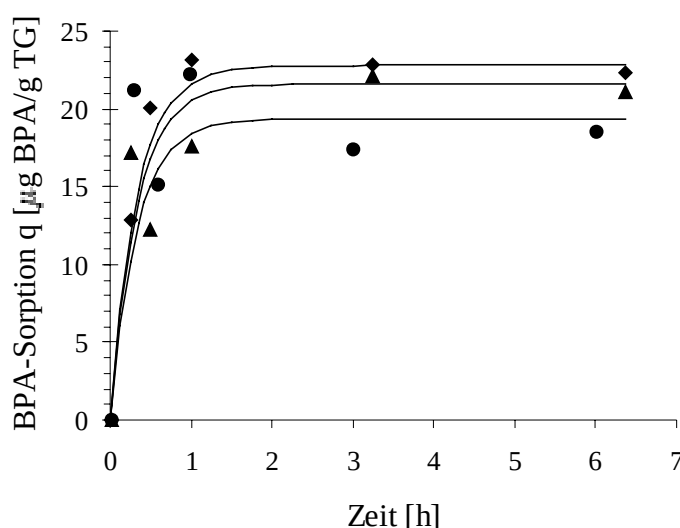


Abb. 3.21: Auftragung der BPA-Sorption von *P. pastoris* pPIKA gegen die Zeit bei geringem Trockengewicht.

Jede Punktreihe (Quadrate, Dreiecke, Rauten) ist eine Versuchsreihe. Die Trockengewichte (TG) betrugen: Quadrat 7,7 mg; Dreieck: 5,3 mg; Raute: 7,1 mg.

Die Kinetik der BPA-Sorption zeigt nach Abb. 3.21 folgenden Verlauf: In den ersten 30 min stieg die BPA-Sorption sehr stark an. In diesem Bereich fanden 75-88% der gesamten BPA-Sorption statt. Danach stieg die Sorption nur noch sehr schwach an, bis nach 2 h keine Veränderung mehr beobachtet wurde. Nach spätestens 2 h war demnach das Gleichgewicht erreicht.

Kinetik bei hohem Trockengewicht

Nach Puranik & Paknikar (1999) wird die Sorption von gelösten Substanzen durch lebende Zellen von der eingesetzten Zellmasse beeinflusst.

Da sich bei der Messung der BPA-Sorptionen von *P. pastoris* pPIKA (Abb. 3.19) ebenfalls solch ein Zusammenhang andeutete, wurde in dieser Arbeit der Einfluß der Zellmasse (gemessen und angegeben als Trockengewicht) auf die BPA-Sorptionskinetiken untersucht. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurden zusätzliche Versuche zur Sorptionskinetik durchgeführt, in denen höhere Trockengewichte eingesetzt wurden. Die Versuche wurden bei pH 9,3 und einer Anfangskonzentration von 2 µg BPA/l und mit *P. pastoris* pPIKA (mit Methanol kultiviert) durchgeführt. Die eingesetzten Trockengewichte lagen zwischen 25,5 und 40,5 mg; Proben (10 ml) wurden nach 1 min, 10 min, 1 h und 3 h entnommen. Der Versuch wurde zweimal wiederholt. Die BPA-Konzentrationen zur Ermittlung der Sorption wurden mit Gleichung (2) berechnet. In Abb. 3.22 ist die Sorption gegen die Zeit aufgetragen.

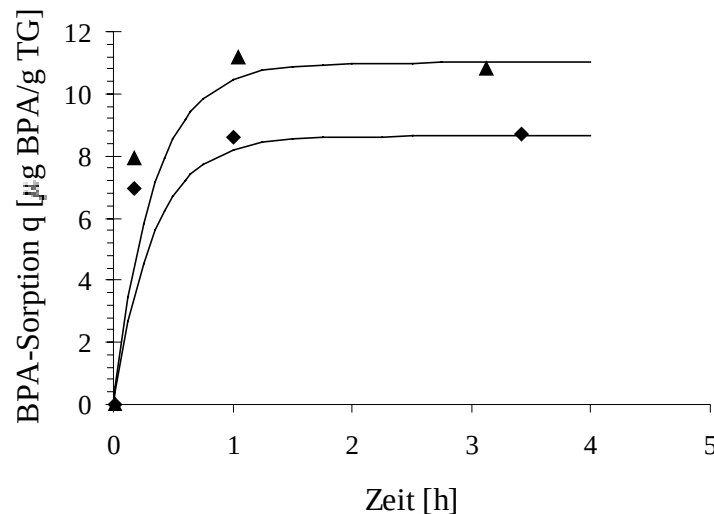


Abb. 3.22: Auftragung der BPA-Sorption von *P. pastoris* pPIKA gegen die Zeit bei hohem Trockengewicht

Jede Punktreihe (Dreiecke, Rauten) ist eine Versuchsreihe. Die Trockengewichte (TG) betrugen: Dreieck: 40,5 mg; Raute: 25,5 mg.

Die Sorptionskinetiken verlaufen in den Bindungsansätzen mit hohem Trockengewicht (Abb. 3.23) ähnlich wie in den Versuchen mit niedrigem Trockengewicht (Abb. 3.21): Innerhalb der ersten 30 min findet ca. 75% der gesamten BPA-Sorption statt und nach 1-2 h war das Gleichgewicht erreicht. In Abb. 3.22 ist allerdings die Sorption insgesamt geringer (vgl. die Maßstäbe der Ordinaten in Abb. 3.21 und 3.22). Dies deutet daraufhin, daß die BPA-Sorption [$\mu\text{g BPA/ g Trockengewicht}$] bei geringem Trockengewicht (geringer Zellmasse) höher ist als bei hohem Trockengewicht (hohe Zellmasse). In Abb. 3.21 und 3.22 wird deutlich, daß die BPA-Sorption mit zunehmender Zellmasse (gemessen als Trockengewicht) sinkt. Daraus folgt: Je höher die eingesetzte Zellmasse [mg oder g Trockengewicht] ist, desto geringer ist die BPA-Sorption q [$\mu\text{g BPA/ g Trockengewicht}$].

Dieser Befund wurde durch die Beobachtungen im nächsten Abschnitt untermauert (siehe Abb. 3.24). Am Ende des Abschnitts 3.3.6 werden hierzu weitere Untersuchungen erläutert (siehe Abb. 3.24).

3.3.5 Einfluß des proteinspaltenden Enzyms Proteinase K auf die BPA-Sorption

Dieser Versuch diente zur Überprüfung, ob die BPA-Sorption von einem an der Oberfläche der Zellen befindlichen Protein (dem Genprodukt des *KYE1-3'-AG α 1*-Fusionsgen) verursacht wurde. Dazu wurden intakte Zellen mit dem proteinspaltenden Enzym Proteinase K inkubiert, wodurch die Oberflächenproteine zerstört wurden.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben mit Proteinase K behandelt. Sie wurden in Bindungsansätzen mit BPA ($\text{pH } 9,3$; Anfangskonzentration $2 \mu\text{g/l}$, verwendetes Trockengewicht $24,9 \text{ mg}$; Probenahme nach 0 und 23 h) eingesetzt.

Es ergaben sich folgende BPA-Sorptionen:

Ansatz mit Proteinase K-behandelten Zellen: keine Sorption ($q = 0$)

Kontrolle (Zellen ohne Proteinase K): BPA-Sorption $q = 3,37 \mu\text{g/ g Trockengewicht}$

Während beim Kontrollansatz die BPA-Sorption durch die Behandlung der Zellen (pH -Wert, Hitze) herabgesetzt wurde, führte die Behandlung der Zellen mit Proteinase K zum völligen Verschwinden der BPA-Sorption. Das proteinspaltende Enzym Proteinase K unterbindet demnach die BPA-Sorption.

3.3.6 Konzentrationsabhängigkeit der BPA-Sorption

Die Sorption von chemischen Substanzen durch Mikroorganismen ist abhängig von der eingesetzten Konzentration dieser Substanzen (Avery & Tobin, 1992; Puranik & Paknikar, 1999; Wong et al., 2001). Zur Überprüfung, ob auch für die Sorption von BPA ein solcher Zusammenhang vorliegt, wurden vier Versuche mit verschiedenen BPA-Anfangskonzentrationen zwischen 0,5 und 100 µg/l und jeweils unterschiedlichen eingesetzten Trockengewichten durchgeführt. Es wurde *P. pastoris* pPIKA verwendet, die mit Methanol als Kohlenstoffquelle kultiviert worden war. Die BPA-Sorptionen wurden gegen die BPA-Endkonzentrationen in Form einer Sorptionsisotherme nach Langmuir (1918) aufgetragen (Abb. 3.23).

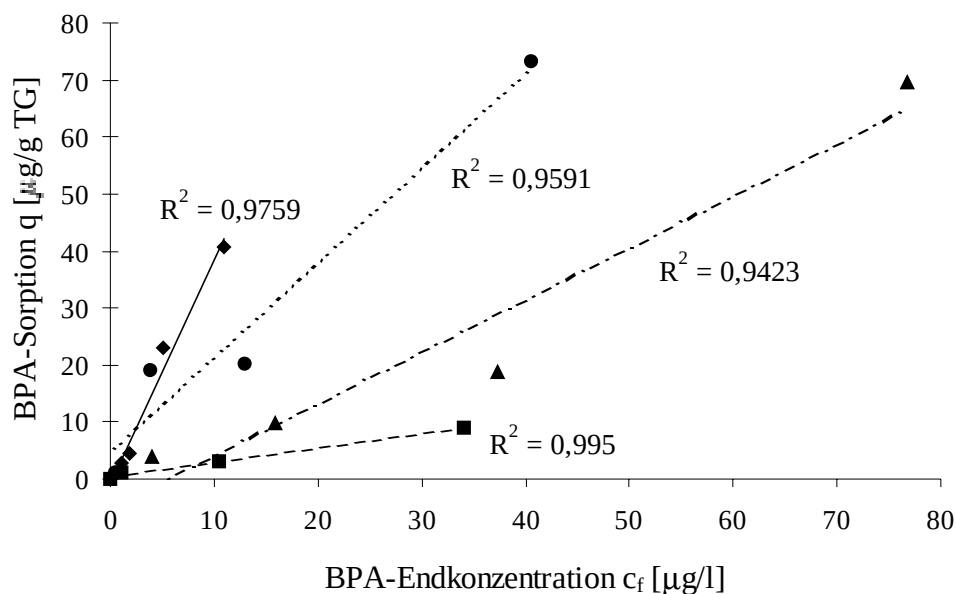


Abb. 3.23: Aufragungen der BPA-Sorption von *P. pastoris* pPIKA gegen die BPA-Endkonzentration (Sorptionsisothermen nach Langmuir) bei verschiedenen Trockengewichten.

Die vier Versuche sind durch folgende Linien und Punkte bezeichnet.

Raute mit Linie: Probe = 20 ml, Trockengewicht 14,1 mg

Kreis mit punktierter Linie: Probe = 10 ml, Trockengewicht 21,3 mg

Dreieck mit punktiert-gestrichelter Linie: Probe = 20 ml, Trockengewicht: 24,2 mg

Quadrat mit gestrichelter Linie: Probe = 20 ml, Trockengewicht: 48,9 mg

In Abb. 3.23 ist eine lineare Abhängigkeit der Sorption von der BPA-Konzentration zu erkennen, wobei die Sorption mit steigender BPA-Konzentration zunimmt.

Sorptionsisothermen laufen meist gegen einen Sättigungswert (siehe z.B. Avery & Tobin, 1992; Puranik & Paknikar, 1999). Die Linearität der gemessenen Isothermen in Abb. 3.24 deutet daraufhin, daß die verwendeten BPA-Konzentrationen sich noch in dem Bereich befinden, in dem die Sorption proportional zur Konzentration ist (Langmuir, 1918).

Die Überprüfung, ob die in Abb. 3.23 aufgetragenen Daten dem Langmuir-Modell folgen, wurde folgendermaßen vorgenommen: Nach Langmuir (1918) und Avery & Tobin (1992) ergeben Isothermen, die dem Langmuir-Modell folgen, in einer doppelt reziproken Auftragung eine Gerade. Daher wurden die BPA-Sorption und die BPA-Endkonzentration in ein doppelt reziprokes Diagramm ($1/q$ gegen $1/c_f$) übertragen. Dieses Diagramm ist in Abb. 3.24 dargestellt.

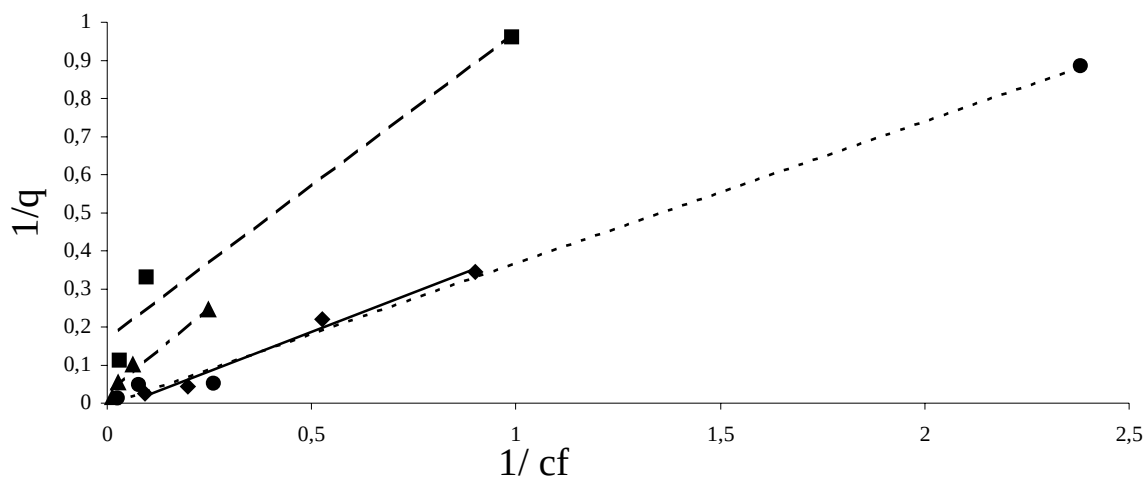


Abb. 3.24: Doppelt reziproke Auftragungen der BPA-Sorption q gegen die BPA-Endkonzentration c_f .

Die Markierungen der vier Versuche entsprechen denen in Abb. 3.24.

Die Korrelationskoeffizienten der Geraden: durchgehende Linie: $R^2 = 0,9861$; punktierte Linie: $R^2 = 0,09957$; punktiert-gestrichelte Linie: $R^2 = 0,9709$; gestrichelte Linie: $R^2 = 0,9657$

Die Abb. 3.24 zeigt einen deutlichen linearen Zusammenhang zwischen den reziproken Werten der BPA-Sorption q und der Endkonzentration c_f . Danach entsprach die Abhängigkeit der BPA-Sorption von der BPA-Konzentration dem Langmuir-Modell (vgl. Langmuir, 1918; Avery & Tobin, 1992). In Abschnitt 4.3.3 wird der daraus abgeleitete Sorptionsmechanismus diskutiert.

Der in Abb. 3.23 sichtbare lineare Zusammenhang zwischen BPA-Sorption und Konzentration fiel um so ausgeprägter aus, je weniger Trockengewicht (Zellmasse) in den Versuchen eingesetzt wurde. Durch eine Auftragung der Steigungen der Isothermen in Abb. 3.24 gegen das eingesetzte Trockengewicht wird dies verdeutlicht (Abb. 3.25).

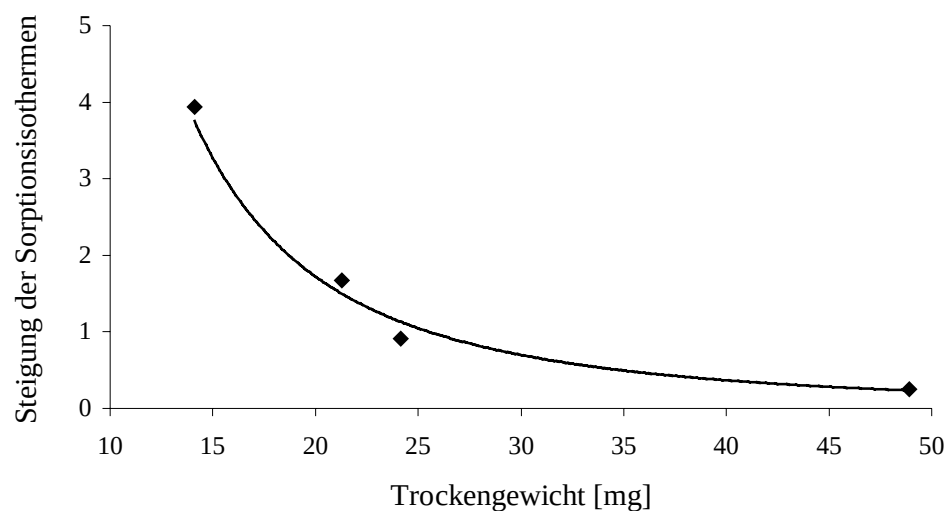


Abb. 3.25: Auftragung der Steigungen der in Abb. 3.24 dargestellten Sorptionsisothermen gegen die in den Versuchen eingesetzten Trockengewichte.

In Abb. 3.26 wird deutlich, daß die Steigung der BPA-Sorption in Abhängigkeit von der Konzentration mit zunehmendem Trockengewicht (Zellmasse) sinkt. Dies bestätigte die Beobachtung, daß die BPA-Sorption vom eingesetzten Trockengewicht abhing (siehe Abschnitt 3.3.4).

3.3.7 Anzahl der von einer Zelle gebundenen BPA-Moleküle

Zum Vergleich von *P. pastoris* pPIKA mit anderen Hefezellen, die an ihrer Oberfläche Bindeproteine besitzen, wurde die Zahl der pro Zelle gebundenen BPA-Moleküle berechnet. Die Berechnung erfolgte wie in Abschnitt 2.34 beschrieben. In Tab. 3.1 sind die Zahlen aus drei Versuchen angegeben: die Zahl der Zellen/ml, die Zahl der Zellen im Bindungsansatz, die in einem Ansatz gebundene BPA-Menge, die Zahl der gebundenen BPA-Moleküle und die Zahl der gebundenen Moleküle pro Zelle.

Tab. 3.1: Zahl der gebundenen BPA-Moleküle pro Zelle

	Vers.1	Vers. 2	Vers. 3
Zellen/ ml	$6,97 \times 10^7$	$6,70 \times 10^7$	$7,70 \times 10^7$
Zellen pro Ansatz	$1,05 \times 10^9$	$1,00 \times 10^9$	$1,16 \times 10^9$
gebundenes BPA in 100 ml [mg]	0,221	0,117	0,163
Zahl der gebundenen BPA-Moleküle	$6,03 \times 10^{14}$	$3,20 \times 10^{14}$	$4,45 \times 10^{14}$
BPA-Moleküle/ Zelle	$5,74 \times 10^5$	$3,20 \times 10^5$	$3,84 \times 10^5$

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Zahl der von einer Zelle gebundenen BPA-Moleküle um 400000 (4×10^5) lag. Dieser Wert lag etwas über der Zahl an Östradiol-Molekülen, die durch die von Yasui et al. (2002) konstruierte *S. cerevisiae*-Zellen mit dem ER der Ratte auf der Zelloberfläche gebunden wurden.

4 Diskussion

4.1 Analytik des BPA

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Quantifizierung von BPA aus wäßrigen Lösungen durch HPLC und Fluoreszenz-Detektion entwickelt.

Die empfindlichste Methode zur Messung von BPA aus Wasser und Abwasser stellt die GC/ MS mit Detektionsgrenzen im unteren pg-Bereich dar (vgl. Bolz et al., 2000). Sie wurde jedoch für die Vermessung einer größeren Zahl an Proben, die nur aus BPA und anorganischem Puffer bestehen, in denen also die Substanz BPA nicht identifiziert werden muß, als zu aufwendig angesehen. Die Gründe hierfür sind folgende: Um in der GC/MS meßbar zu sein, muß das BPA durch Methylierung (Bolz et al., 2000) oder durch Silylierung (Jeannot et al., 2002; Braun et al., 2003, Zafra et al., 2003) derivatisiert werden. Diese Derivatisierungen müssen streng wasserfrei durchgeführt werden. Nach der Überführung des Analyten in organisches Lösemittel ist daher eine Trocknung notwendig (Braun et al., 2003; Zafra et al., 2003). Dies bewirkt bei einer hohen Anzahl an Proben eine wesentliche Erhöhung des Arbeitsaufwandes. Eine weitere Erhöhung des Aufwandes ergibt sich durch die vergleichsweise langen Retentions- und Meßzeiten; so beträgt nach Jeannot et al. (2002) die Retentionszeit für BPA 39 min bei einer Meßzeit von 60 min (zum Vergleich: Retentionszeit des dansylierten BPA ca. 24 min bei einer Meßzeit von 40 min).

Die in dieser Arbeit entwickelte und verwendete Methode zur Messung von BPA besteht aus der Extraktion des BPA aus wäßrigen Proben durch SPE, Derivatisierung mit Dansyl-Cl sowie Messung des Derivates mit HPLC und Fluoreszenz-Detektion. Durch die Extraktion der Proben durch SPE und die anschließende Elution wurde das Probevolumen bis zur Messung von 10 bzw. 20 ml auf 2 ml, d.h. um das 5 bzw. 10fache verringert (vgl. Abschnitt 2.3.1).

Bei der Reaktion von BPA mit Dansyl-Cl entsteht Bis-Dansyl-BPA als einziges Reaktionsprodukt (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2). Die Fluoreszenzmaxima des Bis-Dansyl-BPA liegen bei 385 nm (Anregung) und 545 nm (Emission) (siehe Abschnitt 3.1.1). Sie befinden sich damit in einem Bereich, der für die Fluoreszenz von dansylierten Aminen und Phenolen typisch ist. So wurden z.B. für dansylierte Aminosäuren Fluoreszenzmaxima

bei 365 und 530 nm gemessen (Frei & Lawrence, 1973), für Dansyl-Polyamine bei 340 und 515 nm (Bencsik et al., 1998), für dansylierte Nitrosamine bei 339 und 532 nm (Cárdenes et al., 2002) und für Dansyl-Phenol bei 355 und 500 nm (Lawrence, 1979).

Das Bis-Dansyl-BPA wurde durch die HPLC deutlich von den Resten der Reagenzien und Lösemittel getrennt (siehe Abschnitt 3.1.2). Eine chemische Zerstörung von überschüssigem Dansyl-Cl, wie sie durch Kwakman et al. (1991) durchgeführt wurde, war daher unnötig.

Bei der Kalibrierung der BPA-Analytik ergab sich ein deutlicher linearer Zusammenhang zwischen der Menge an eingesetztem BPA und der Intensität der Fluoreszenz (gemessen als Peakfläche) (siehe Abb. 3.5). Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen. Bei der Quantifizierung von Steroiden, Aminen und Phenole mit Hilfe der Dansylierung wurden nämlich ebenfalls lineare Zusammenhänge zwischen der Menge an eingesetztem Analyten und der Fluoreszenz festgestellt, so bei der Bestimmung von Ethinylöstradiol (De Ruiter et al., 1987), Phenol (Kwakman et al., 1991), Polyaminen (Fontaniella et al., 2001) und Nitrosaminen (Cárdenes et al., 2002). Die Linearität der Kalibrierung belegt, daß die Menge an gebildetem Bis-Dansyl-BPA aufgrund des eingesetzten Überschusses an Dansyl-Cl allein von der eingesetzten Menge an BPA abhängt (vgl. Lawrence, 1979).

Die Detektionsgrenze der in Abschnitt 3.1 beschriebenen Methode lag bei einer theoretischen BPA-Menge von 0,1 ng auf der Säule (siehe Abschnitt 3.1.3), was einer BPA-Konzentration in der Lösung von 0,1 µg/l entsprach. BPA-Mengen über 0,5 ng (0,5 µg/l in der Lösung) konnten quantifiziert werden, d.h. die Bestimmungsgrenze für BPA lag bei 0,5 ng (siehe Abschnitt 3.1.3).

Die für Dansyl-BPA festgestellte Detektionsgrenze entspricht den Werten, die mit ähnlichen Methoden bei der Messung von dansylierten Phenolen und Aminen festgestellt wurden. So stellten Cassidy et al. (1974) bei der Bestimmung von Dansyl-Hydroxybiphenyl mit High Speed Liquid Chromatography (HSLC) eine Detektionsgrenze von 0,1 ng fest. Levina & Nazimov (1984) maßen bei der HPLC-Bestimmung von dansylierten Aminosäuren ebenfalls eine Detektionsgrenze von 0,1 ng, ebenso De Ruiter et al. (1987) bei der Messung von Dansyl-Ethinylöstradiol durch HPLC. Bei der Messung von dansyliertem Phenol mit HPLC und Fluoreszenz-Detektor wurde mit 0,4 µg/l eine Detektionsgrenze in demselben Bereich festgestellt (Kwakman et al., 1991).

Durch Dansylierung wird für BPA eine Detektionsgrenze erreicht, die ohne Dansylierung nur durch HPLC-MS oder HPLC-ED erreichbar ist (vgl. Sajiki et al., 1999; Penalver et al.,

2002). Die Messung des BPA mit Hilfe der Dansylierung ist daher empfindlicher als die Messung des BPA durch Detektion der natürlichen Fluoreszenz. Zwar erreichten del Olmo et al. (1999) mit einer solchen Methode eine Detektionsgrenze von 0,11 ng, jedoch lag hier das Probevolumen bei 250 ml, wurde durch Extraktion um das 100fache verringert und das HPLC-Injektionsvolumen war viermal höher als bei der Methode mit SPE und Dansylierung von BPA.

Vergleicht man die BPA-Bestimmung durch Dansylierung und Fluoreszenzdetektion mit der von Tsuda et al. (2000) beschriebenen Methode zur Bestimmung von BPA durch natürliche Fluoreszenz, so zeigt sich ebenfalls deutlich die durch Derivatisierung erreichte höhere Empfindlichkeit. Die Detektionsgrenze der Methode mit Dansylierung ist nämlich 50fach geringer, die Bestimmungsgrenze 100fach geringer und das Signal-Rausch-Verhältnis fast doppelt so hoch als bei der Methode nach Tsuda et al. (2000).

Die Notwendigkeit einer empfindlicheren Methode zur Bestimmung des BPA durch Fluoreszenz wurde auch durch die Entwicklung einer der Dansylierung des BPA ähnlichen Methode durch Watanabe et al. (2001) bestätigt. Dabei wurde das BPA mit dem fluorigenen Reagens 4-(4,5-Diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)benzoylchlorid (DIB-Cl) umgesetzt und ebenfalls mit Hilfe der HPLC quantifiziert. Das DIB-Cl reagiert wie das Dansyl-Cl mit den zwei phenolischen Hydroxylgruppen des BPA. Die Empfindlichkeiten beider Methoden sind ungefähr gleichwertig: die Detektionsgrenze der Methode von Watanabe et al. (2001) liegt mit 0,05 µg/l um die Hälfte niedriger, das Signal-Rausch-Verhältnis ist mit 3 dafür etwas schlechter als das der Messung von Dansyl-BPA (5,1).

Gegenüber der Methode nach Watanabe et al. (2001) besteht der Vorteil der Derivatisierung des BPA mit Dansyl-Cl in einer deutlich höheren Wirtschaftlichkeit, was sich vor allem bei der Messung einer größeren Zahl Proben bemerkbar macht. Das Reagens DIB-Cl wurde durch Watanabe et al. (2001) selbst synthetisiert; laut Katalog der Fa. Fluka kostet 1 g DIB-Cl € 1600,-, während 1 g Dansyl-Cl bereits für € 20,- erhältlich ist.

Die Wiederfindung der im Rahmen dieser Dissertation entwickelten Methode liegt mit 90%+- 5% in demselben Bereich wie die Wiederfindung von 1 µg/l BPA von SPE-Extrakten aus Blutplasma mit 94,2 +- 8,2% (Watanabe et al., 2001). Eine ähnliche Wiederfindung von 95% fand Sajiki (2001) durch SPE von BPA aus Blut und anschließender Messung mit HPLC-ED.

Die in diesem Abschnitt diskutierten Vergleiche der BPA-Messung durch SPE, Dansylierung und Fluoreszenzdetektion mit anderen Meßmethoden zeigen, daß diese Methode sehr gut geeignet ist, um BPA in einer größeren Zahl Proben, die aus BPA in Konzentrationen im unteren $\mu\text{g/l}$ -Bereich und anorganischem Puffer bestehen, zu quantifizieren.

4.2 Molekulargenetische Konstruktion des neuen Hefestammes *P. pastoris* pPIKA

In dieser Arbeit sollte ein Hefestamm konstruiert werden, der an seiner Oberfläche BPA bindet. Hierzu wurde der Hefestamm *P. pastoris* GS 115 in mehreren Schritten mit dem Gen für das BPA-Bindeprotein KYE1 (vgl. Miranda et al., 1995) und der 3'-Hälfte des Gens *AG α 1* (vgl. Schreuder et al., 1993) zur Verankerung des Bindeproteins in der Zellwand versehen.

Zuerst wurden das Gen *KYE1* von *K. lactis* und die 3'-Hälfte des Gens *AG α 1* aus *S. cerevisiae* durch PCR amplifiziert und jeweils in den Klonierungsvektor pUC19 inseriert. Durch Restriktion und Sequenzierung der durch die Insertion entstandenen Plasmide pUK278-9 (pUC19 mit *KYE1*) und pUA277-1 (pUC19 mit 3'-*AG α 1*) wurde die korrekte Amplifikation und Klonierung der Gene *KYE1* und 3'-*AG α 1* nachgewiesen (siehe Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2).

Durch die anschließende Insertion des isolierten 3'-*AG α 1* in das Plasmid pUK278-9 entstand das Plasmid pUKA356-5. Dieses Plasmid enthielt das für die Oberflächenexpression des BPA-Bindeproteins KYE1 notwendige *KYE1*-3'-*AG α 1*-Fusionsgen. Durch Restriktion von pUKA356-5 wurde die korrekte Genfusion bestätigt (siehe Abschnitt 3.2.3).

Um das Fusionsgen in *P. pastoris* exprimieren zu können, wurde es isoliert und in den *P. pastoris*-Expressionsvektor pPIC9K eingefügt, wodurch das Plasmid pPIKA373-2 entstand. Durch Restriktion dieses Plasmids wurde die korrekte Insertion des *KYE1*-3'-*AG α 1*-Fusionsgens nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.2.4). Das Plasmid pPIKA373-2 enthält demnach nach der Insertion ein Fusionsgen aus dem Gen des α -Faktor-präpro-Peptids (mat α)

und dem *KYE1-3'-AG α 1*.

Das Plasmid pPIKA373-2 wurde in den Stamm *P. pastoris* GS 115 transformiert, wodurch der neue Stamm *P. pastoris* pPIKA entstand (siehe Abschnitt 3.2.5). Durch die in Abschnitt 3.2.5 beschriebene PCR wurde nachgewiesen, daß das pPIKA373-2 mit dem *KYE1-3'-AG α 1* ins Genom der Hefe *P. pastoris* integriert worden war. Der neue Stamm *P. pastoris* pPIKA enthielt demnach im Genom das mit α -*KYE1-3'-AG α 1*-Fusionsgen unter Kontrolle des methanolregulierten *AOX1*-Promotors. Das Produkt dieses Fusionsgens wird im Transportsystem der Zelle durch den α -Faktor in Richtung Zellwand dirigiert. Im Laufe des Transportes wird der α -Faktor durch die Kex2-Endopeptidase an der Prozessierungsstelle vor dem KYE1 abgetrennt (siehe Abb. 3.14 und 3.16; Julius et al., 1984; Sreekrishna & Kropp, 1996; Cereghino & Cregg, 2000). Der Signalbereich des AG α 1 bewirkt anschließend die stabile Verankerung des Fusionsgenproduktes in der Zellwand (Schreuder et al., 1993).

Durch eine Kultivierung des Stammes *P. pastoris* pPIKA mit Methanol sollte demnach die Expression der vom *AOX1*-Promotor kontrollierten Fusionsgens induziert werden. Mit Methanol kultivierte Zellen von *P. pastoris* pPIKA sollten daher an ihrer Oberfläche BPA binden.

4.3 BPA-Sorption von *P. pastoris* pPIKA

4.3.1 Zusammenhang zwischen pH-Wert und BPA-Sorption

In Anlehnung an Befunde bei der Sorption von Metallen durch Hefen wurde vermutet, daß auch die BPA-Sorption der Zellen des neuen Stammes *P. pastoris* pPIKA durch den pH-Wert der Lösung beeinflusst wird.

Nach Blackwell et al. (1995) wird die Metallsorption durch lebende Zellen vom pH-Wert der umgebenden Lösung beeinflusst. Beispielsweise nimmt die Sorption von Nickelionen durch lebende Zellen der Hefe *Candida lusitanae* mit dem pH-Wert zu und erreicht im Bereich von pH 6 ein Optimum (Kambe-Honjoh et al., 1997). Im Allgemeinen liegen die pH-Optima der Metallsorption durch lebende Zellen zwischen 4 und 8 (Blackwell et al., 1995). Während die Sorption von Metallen an der Zelloberfläche auf der elektrostatischen

Wechselwirkung zwischen Metallkationen und negativ geladenen funktionellen Gruppen der Zellwand beruht (Gadd, 1993; Brady & Duncan, 1994; Skowronski et al., 2001; Wong et al., 2001), muß die Bindung von BPA auf anderen Mechanismen beruhen, da BPA in wäßriger Lösung nicht als Kation vorliegt (siehe Staples et al., 2000).

Es wurde vermutet, daß der Stamm *P. pastoris* pPIKA (Abschnitt 4.2) ähnliche Bindungseigenschaften wie das dem KYE1-Protein homologe OYE aufwies. Daher wurden zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen pH und BPA-Sorption in Analogie zu den Untersuchungen des OYE durch Abramovitz & Massey (1976b) pH-Werte zwischen 7,0 und 10,2 eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den entsprechenden Versuchen ein deutlicher Einfluß des pH-Wertes mit einem Optimum im Bereich von pH 9,3 (siehe Abb. 3.18). Das pH-Optimum der BPA-Sorption liegt demnach in demselben Bereich wie das pH-Optimum der Bindung von *p*-Chlorphenol durch isoliertes OYE (pH 8,7; Abramovitz & Massey, 1976B). Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, daß die BPA-Sorption des neuen Stammes *P. pastoris* pPIKA durch das dem OYE homologe KYE1-Genprodukt verursacht wird.

BPA hat einen pK_a -Wert von 9,6 (Staples et al., 2000). Beim pH-Wert der optimalen Sorption von 9,3 liegen daher ca. 60% des BPA als undissoziiertes Phenol und ca. 40% als Phenolat vor (vgl. Verhältnisse bei schwachen Säuren in Wiberg, 1964). In Analogie zur Bindung des *p*-Chlorphenol durch OYE wird BPA durch das KYE1-Protein als Phenolat-Anion im aktiven Zentrum des Enzyms unmittelbar neben dem FMN gebunden. Dabei findet ein Elektronentransfer vom Phenolat zum FMN statt (Abramovitz & Massey, 1976b). Die Bindung zwischen Enzym und Phenolat wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Phenolat und den Aminosäuren Histidin und Asparagin im aktiven Zentrum stabilisiert (Brown et al., 1998).

Die Bindung des BPA-Phenolates an KYE1 führt zur Verminderung der Phenolat-Konzentration. Dadurch wird das Gleichgewicht der Dissoziationsreaktion des BPA auf die Seite des Phenolates verschoben (Prinzip von Le Chatelier, siehe Wiberg, 1964). Folglich entstehen erneut Phenolat-Anionen, die an das Enzym gebunden werden.

4.3.2 Erhöhte BPA-Sorption des Stammes *P. pastoris* pPIKA

Im vorigen Abschnitt wurde das pH-Optimum der BPA-Sorption des neuen Stamm *P. pastoris* pPIKA diskutiert. Unter den für die Sorption optimalen Bedingungen wurde nun die BPA-Sorption des Stammes *P. pastoris* pPIKA mit der des Ausgangsstammes *P. pastoris* GS 115 verglichen. Damit sollte gezeigt werden, daß nur der neue Stamm eine deutliche BPA-Sorption aufweist. Wenn die BPA-Sorption des neuen Stammes auf das Produkt des molekulargenetisch eingefügten Gens KYE1 zurückzuführen ist, sollte der Ausgangsstamm keine oder eine sehr schwache BPA-Sorption zeigen.

Die in Abb. 3.19 dargestellten Ergebnisse des Vergleiches der BPA-Sorption des neuen Stammes und des Ausgangsstammes entsprachen den Erwartungen: Der neue Stamm *P. pastoris* pPIKA zeigte eine hohe BPA-Sorption, während der Ausgangsstamm *P. pastoris* GS 115 nur eine sehr schwache BPA-Sorption aufwies, die wahrscheinlich durch unspezifische Bindung von BPA an Zellwandbestandteile verursacht wurde. In diesen Versuchen wurde auch deutlich, daß die erhöhte BPA-Sorption von der Kultivierung der Zellen mit Methanol abhing.

Die hohe BPA-Sorption des neuen Stammes *P. pastoris* pPIKA muß demnach auf eine Eigenschaft zurückzuführen sein, die nur dieser Stamm besitzt und deren Ausbildung vom Methanol abhängt. Der einzige Faktor, der diese Voraussetzungen erfüllt, ist das Genprodukt des ins Genom integrierten *KYE1-3'-AGα1*-Fusionsgen unter der Kontrolle des methanolregulierten *AOX1*-Promotors (vgl. Abschnitt 4.2). Durch die methanolinduzierte Expression dieses Fusionsgen werden die Zellen in die Lage versetzt, BPA zu binden.

Zusammen mit den Ergebnissen zur pH-Abhängigkeit belegen die Ergebnisse der Sorptionsvergleiche, daß die BPA-Sorption durch die Bindung des BPA an das Genprodukt des *KYE1-3'-AGα1*-Fusionsgens verursacht wird.

4.3.3 Belege für die BPA-Sorption an der Zelloberfläche

Bei der BPA-Sorption durch das vom *KYE1-3'-AGα1*-Fusionsgen codierte Oberflächenprotein sollte es sich um eine Sorption an lebenden Zellen handeln, da bei der Bindung von BPA das KYE1-Protein in seiner aktiven Form vorliegen muß (vgl. Abramovitz

& Massey, 1976b, Brown et al., 1998).

Es wurde daher untersucht, ob die Zellen von *P. pastoris* pPIKA unter den Bedingungen der BPA-Sorptionsversuche (keine Kohlenstoffquelle, pH 9,3) noch lebensfähig waren. Es zeigte sich, daß die Zellen unter diesen Bedingungen zwar nicht mehr wuchsen, aber durchaus lebensfähig waren und auch nach 23 h nicht abstarben (siehe Abschnitt 3.3.3). Da die Versuche zur BPA-Sorption unter denselben Bedingungen durchgeführt werden, handelt es sich bei der BPA-Sorption um einen Vorgang an lebenden Zellen.

Bei lebenden Zellen kann die Bindung von Substanzen auf zwei Arten erfolgen: Einmal durch eine vom Metabolismus unabhängige Sorption an der Zelloberfläche, zum anderen durch eine vom Metabolismus abhängige Akkumulation durch Aufnahme in die Zelle (Blackwell et al., 1995). Beide Prozesse unterscheiden sich in ihrer Geschwindigkeit: die Sorption an der Oberfläche verläuft schnell und ist meist innerhalb weniger Stunden beendet, die Akkumulation ist dagegen langsamer und kann mehrere Stunden anhalten (Avery & Tobin, 1992; Gadd, 1993; Mogollón et al., 1998). Der Zeitverlauf (Kinetik) der Bindung eines Sorbates ermöglicht daher Aussagen, ob eine wirkliche Sorption an der Zelloberfläche vorliegt oder ob eine Aufnahme des Sorbates ins Zellinnere erfolgt (vgl. Mogollón et al., 1998; Puranik & Paknikar, 1999).

Bei den Versuchen zur Sorption des BPA mit *P. pastoris* pPIKA wurden unabhängig von der eingesetzten Zellmasse (gemessen als Trockengewicht) Kinetiken beobachtet (siehe Abb. 3.21 und 3.22), bei denen nach 2 h das Gleichgewicht erreicht wurde. Diese sind nach Mogollón et al. (1998) typisch für eine echte Sorption an der Zelloberfläche, wobei Geschwindigkeit der Sorption lediglich von der Geschwindigkeit des Transfers von Sorbat aus der Lösung zu den Bindungsstellen abhängt (Puranik & Paknikar, 1999).

P. pastoris pPIKA bindet BPA demnach an der Zelloberfläche. Dies deutet auf eine Oberflächenexpression des BPA-Bindeproteins KYE1 hin. Demnach wird das gesamte KYE1-3'-AG α 1-Fusionsgen exprimiert und über den Bestandteil 3'-AG α 1 in der Zellwand verankert (vgl. Schreuder et al., 1993).

Wie in den Abb. 3.21, 3.22, 3.23 und 3.25 deutlich wird, ist die BPA-Sorption nicht nur von der eingesetzten Konzentration abhängig, sondern auch von der eingesetzten Zellmasse (gemessen als Trockengewicht): Mit steigender Zellmasse sinkt die BPA-Sorption. Die Erscheinung, daß die Sorption mit steigender Zellzahl oder Zellmasse abnimmt, wurde auch

bei der Sorption von Metallen durch lebende Bakterien (Puranik & Paknikar, 1999) und Cyanobakterien (Khattar et al., 1999) beobachtet. Die Erklärung dafür ist, daß mit der Erhöhung der Zellmasse für alle Zellen weniger Sorbat-Teilchen (Metallionen oder BPA-Moleküle) verfügbar sind (Fourest & Roux, 1992; Puranik & Paknikar, 1999; Khattar et al., 1999). Das bedeutet, daß bei einer bestimmten BPA-Konzentration und einer geringen Zellmasse die wenigen Zellen so viele BPA-Molekülen wie möglich binden, daraus ergibt sich eine hohe BPA-Sorption. Steigt die Zellmasse bei gleichbleibender BPA-Konzentration an, so können nicht mehr alle Bindungsstellen besetzt werden, die BPA-Sorption sinkt folglich ab. Da ein solcher Zusammenhang für die Sorption an Zelloberflächen typisch ist (vgl. Puranik & Paknikar, 1999) stellt dies einen wichtigen Beleg für die Bindung des BPA durch *P. pastoris* pPIKA an der Oberfläche der Zellen dar.

Ein zusätzlicher Beleg für die BPA-Sorption durch ein Oberflächenprotein ergab sich dadurch, daß nach der Behandlung von *P. pastoris* pPIKA mit Proteinase K die BPA-Sorptionsfähigkeit der Zellen völlig verschwand (siehe Abschnitt 3.3.5).

4.3.4 Mechanismus der BPA-Sorption

Die Sorption von Substanzen durch Mikroorganismen ist abhängig von der Konzentration dieser Substanzen (Avery & Tobin, 1992; Puranik & Paknikar, 1999; Wong et al., 2001). Aus diesem Zusammenhang lassen sich Schlüsse auf den Sorptionsmechanismus ziehen (vgl. Avery & Tobin, 1992; Puranik & Paknikar, 1999).

In Abb. 3.23 wird deutlich, daß zwischen der BPA-Sorption von *P. pastoris* pPIKA und der BPA-Konzentration ein linearer Zusammenhang besteht: Die BPA-Sorption steigt proportional zur BPA-Konzentration.

Das am häufigsten für die Mechanismen der mikrobiellen Sorption verwendete Modell ist das Modell nach Langmuir (1918) (verwendet z.B. in Avery & Tobin, 1992; Fourest & Roux, 1992; Puranik & Paknikar, 1999; Dambies et al., 2002). Durch ein doppelt reziprokes Diagramm von BPA-Konzentration und -Sorption wurde nachgewiesen, daß die BPA-Sorption durch *P. pastoris* pPIKA dem Langmuir-Modell entsprach (Abb. 3.24). Nach Langmuir (1918) zeigt ein linearer Zusammenhang zwischen Sorption und Sorbatkonzentra-

tion, wie er bei der BPA-Sorption beobachtet wurde (Abb. 3.23), daß die Sorbatkonzentrationen noch weit von der Sättigungskonzentration entfernt sind. Demnach kann *P. pastoris* pPIKA noch mehr als die in dieser Arbeit als höchste Konzentration verwendeten 80 µg BPA/l binden. Da solche hohen BPA-Konzentrationen in Abwasser und Kläranlagenabläufen im Allgemeinen nicht vorkommen (vgl. Abschnitt 1.2), sind die Zellen zur Bindung von BPA in den vorkommenden geringen Konzentrationen gut geeignet.

Die Beobachtung, daß die BPA-Sorption dem Modell nach Langmuir (1918) entspricht, läßt folgende Schlüsse zu: Es liegt eine definierte Anzahl von Bindungsstellen vor; es wird ein Molekül BPA pro Bindungsstelle gebunden und es findet keine Interaktion mit gebundenen BPA-Molekülen an benachbarten Bindungsstellen statt (nach Langmuir, 1918; Avery & Tobin, 1992; Fourest & Roux, 1992; Puranik & Paknikar, 1999; Dambies et al., 2002).

Dieser Mechanismus entspricht den Erwartungen bei einer BPA-Sorption durch das dem OYE homologe KYE1-Genprodukt: Das KYE1-Protein bindet analog dem OYE pro Molekül Enzym ein Molekül BPA in der Nachbarschaft des FMN (Williams & Bruce, 2002); die Zahl der Bindungsstellen ist endlich (siehe unten) und aufgrund der Bindung des BPA im aktiven Zentrum neben den FMN kann keine Interaktion zwischen gebundenen BPA-Molekülen stattfinden (vgl. Brown et al., 1998).

Nach den in Abschnitt 3.3.7 angestellten Berechnungen bindet eine Zelle von *P. pastoris* pPIKA 4×10^5 Moleküle BPA. Da eine Zelle pro KYE1-Bindungsstelle ein Molekül BPA bindet (siehe oben), bedeutet dies, daß eine Zelle von *P. pastoris* pPIKA mindestens 4×10^5 BPA-Bindungsstellen besitzt. Da die in dieser Arbeit verwendeten BPA-Konzentrationen allerdings von der Sättigungskonzentration der BPA-Sorption weit entfernt sind (siehe oben), besitzen die Zellen von *P. pastoris* pPIKA wahrscheinlich sogar mehr als 4×10^5 Bindungsstellen für BPA.

Der Wert von mindestens 4×10^5 Bindungsstellen liegt im Bereich der Werte, die mit dem AGα-Oberflächenexpressionssystem in *S. cerevisiae* erreicht wurden. So exprimierte *S. cerevisiae* 6×10^5 Moleküle eines Fusionsproteins aus AGα und Human-Immunoglobulin G (Nakamura et al., 2001) und $9,5 \times 10^4$ Moleküle eines Fusionsproteins aus AGα und Ratten-ER (Yasui et al., 2002) an der Oberfläche. Dieser Vergleich deutet daraufhin, daß das AGα-Oberflächenexpressionssystem aus *S. cerevisiae* erfolgreich in *P. pastoris* angewendet wurde.

Dieser und die in den vorausgegangenen Abschnitten diskutierten Versuche bestätigen, daß das in Abschnitt 1.6 beschriebene Ziel der Konstruktion eines BPA-bindenden Hefestammes erreicht wurde. Soweit bekannt, handelt es sich hierbei um die erstmalige erfolgreiche Anwendung des AG α -Oberflächenexpressionssystems aus *S. cerevisiae* bei der Hefe *P. pastoris*.

4.4 Ausblick

Das an der Oberfläche der Zellen von *P. pastoris* pPIKA exprimierte Protein KYE1 ist den Proteinen OYE und EBP1 homolog (siehe Abschnitt 1.4). Es ist daher zu erwarten, daß *P. pastoris* pPIKA an seiner Oberfläche noch weitere Xenoöstrogene außer BPA bindet. In dieser Arbeit diente BPA als Modellsubstanz für phenolische Xenoöstrogene.

Zur Verwendung von *P. pastoris* pPIKA für die Entfernung von Xenoöstrogenen aus Kläranlagenabläufen ist noch eine Optimierung des Stammes notwendig. Der Grund dafür ist folgender: Das Optimum der BPA-Bindung liegt im Bereich von pH 9,3, während der pH-Wert von Kläranlagenabläufen im Allgemeinen zwischen 6 und 8 liegt (vgl. Lemmer et al., 1997; Martin Ruel et al., 2002; López-Ramírez et al., 2003). Die Zellen müssen folglich dahingehend verändert werden, daß sie auch bei pH-Werten um 7 BPA binden.

Diese Optimierung könnte man erreichen, indem man durch gezielte Mutationen des *KYE1*-Gens das aktive Zentrum des Enzyms so verändert, daß die Bindung des Phenolat an das Enzym verstärkt wird. Bei einer stärkeren Bindung des BPA wäre auch bei pH 7 eine effiziente BPA-Sorption zu erwarten.

Die optimierten Zellen von *P. pastoris* pPIKA könnten in der Nachklärung eingesetzt werden, um BPA oder andere Xenoöstrogen aus dem Kläranlagenablauf zu entfernen. Zur Verbesserung der Abtrennung der Zellen aus dem Ablauf und zum besseren Schutz der Zellen vor mikrobiellem Angriff (v.a. durch Schimmelpilze) könnten diese z.B. durch Benzaldehyd fixiert werden. Versuche zur Fixierung wurden durch Ashkenazy et al. (1999) mit metallsorbierenden Zellen von *S. cerevisiae* durchgeführt; dabei zeigte sich, daß genau überprüft werden muß, wie die Fixierung sich auf die Sorptionsfähigkeit der Zellen auswirkt. Der nicht-optimierte Hefestamm *P. pastoris* pPIKA bietet die Möglichkeit zur Verwendung bei der Aufkonzentrierung von Analyten aus wäßrigen Proben. Für diese Zwecke wurden

Hefen bereits bei Lösungen von Metallen (Zimmermann & Wolf, 2002) und Pestiziden eingesetzt (Tunceli et al., 2001). Zur Aufkonzentrierung von BPA aus wässrigen Lösungen mit *P. pastoris* pPIKA ließe sich das hohe pH-Optimum des Stammes nutzen: Man stellt die zu untersuchende Lösung, die BPA enthält, auf pH 9,3 ein, gibt Zellen von *P. pastoris* pPIKA hinzu und rührt 1-2 h. Dadurch wird das BPA an die Oberfläche der Zellen gebunden. Anschließend trennt man die Zellen von der Lösung und behandelt die Zellen mit einem geringen Volumen eines Puffers mit pH 7. Dadurch lösen sich die BPA-Moleküle von der Zelloberfläche und liegen dann in einem geringeren Lösungsvolumen vor.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Herstellung von Hefezellen, in deren Zellwand ein Protein zur Bindung des Xenoöstrogens BPA an der Zelloberfläche verankert werden sollte.

Um die BPA-Sorption des neuen Hefestammes messen zu können, wurde gemeinsam mit Markus Naaßner (Institut für Biologie V) eine neue Methode zur Quantifizierung von BPA aus wässrigen Lösungen entwickelt. Diese Methode besteht aus der SPE des BPA, Elution des BPA mit Aceton, Derivatisierung mit Dansyl-Cl, HPLC und Messung des dansylierten BPA durch Fluoreszenz-Detektion.

Zur Konstruktion des BPA-bindenden Hefestammes wurde das Protein KYE1 aus *K. lactis* ausgewählt, das dem phenolbindenden Protein OYE und dem steroidbindenden Protein EBP1 homolog ist. Zur Verankerung des KYE1-Proteins durch das AG α -Expressionssystem an der Zelloberfläche wurden das Gen *KYE1* und die 3'-Hälfte des Gens *AG α 1* mittels PCR isoliert, kloniert und miteinander fusioniert. Anschließend wurde das *KYE1*-3'-*AG α 1*-Fusionsgen über den Expressionsvektor pPIC9K in den Hefestamm *P. pastoris* GS 115 transformiert, wodurch der Stamm *P. pastoris* pPIKA entstand. Im Expressionsvektor wurde das Fusionsgen durch den methanolregulierten *AOX1*-Promotor kontrolliert.

Das pH-Optimum der BPA-Sorption des neuen Stammes *P. pastoris* pPIKA lag im Bereich von 9,3 und damit im Bereich des pH-Optimums der Bindung von Chlorphenol durch das KYE1-Homologe OYE aus *S. carlsbergensis*.

Der neu konstruierte Stamm *P. pastoris* pPIKA wies im Vergleich zum Ausgangsstamm *P. pastoris* GS 115 eine deutlich erhöhte BPA-Sorption auf, abhängig von der vorherigen Kultivierung auf Methanol.

Die Kinetik der BPA-Sorption verlief mit einem anfänglichen schnellen Anstieg mit anschließender Abschwächung und Erreichen des Gleichgewichtes typisch für Sorptionsprozesse an Zelloberflächen.

Die Abhängigkeit der BPA-Sorption von der eingesetzten BPA-Konzentration folgte dem Modell nach Langmuir (1918). Die BPA-Sorption hing auch von der eingesetzten Zellmasse ab. Beide Befunde belegen die Bindung des BPA durch das KYE1-Protein an der Zelloberfläche.

Es ist in dieser Arbeit gelungen, mit *P. pastoris* pPIKA einen Hefestamm zu konstruieren, der durch das an der Zelloberfläche exprimierte KYE1 BPA aus Lösungen bindet.

6 Literatur

Abramovitz, A.S. & Massey, V. (1976a). Purification of intact old yellow enzyme using an affinity matrix for the sole chromatographic step. *J. Biol. Chem.* **251**: 5321-5326

Abramovitz, A.S. & Massey, V. (1976b). Interaction of Phenols with old yellow enzyme - Physical evidence for charge-transfer complexes. *J. Biol. Chem.* **251**: 5327-5336

Ahmed, S.A. (2000). The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology* **150**: 191-206

Aksu, Z. & Dönmez, G. (2003). A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. *Chemosphere* **50**: 1075-1083

Ashkenazy, R., Yannai, S., Rahman, R., Rabinovitz, E. & Gottlieb, L. (1999). Fixation of spent *Saccharomyces cerevisiae* biomass for lead sorption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 608-611

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith J.A. & Struhl, K. (1991). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley & Sons; New York

Avery, S.V. & Tobin, J.M. (1992). Mechanisms of Strontium uptake by laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Env. Microbiol.* **58**: 3883-3889

Bartzatt, R. (2001). Fluorescent labeling of drugs and simple organic compounds containing amine functional groups, utilizing dansyl chloride in Na₂CO₃ buffer. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **45**: 247-253

Benachour, A., Sipos, G., Flury, I., Reggiori, F., Canivenc-Gansel, E., Vionnet, C., Conzelmann, A. & Benghezal, M. (1999). Deletion of *GPI7*, a yeast gene required for addition of a side chain to the glycosylphosphatidylinositol (GPI) core structure, affects GPI protein transport, remodeling, and cell Wall integrity. *J. Biol. Chem.* **274**: 15251-15261

- Bencsik, K., Kremmer, T., Bolizsár, M., Tamás, J., Mák, M. & Páldi, E. (1998). High-performance liquid chromatographic determination and standardization of agmatine. *J. Chromatogr. A* **824**: 175-180
- Ben-Jonathan, N. & Steinmetz, R. (1998). Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A. *Trends Endocrinol. Metabol.* **9**: 124-128
- Blackwell, K.J., Singleton, I. & Tobin, J.M. (1995). Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 579-585
- Bolz, U., Körner, W. & Hagenmaier, H. (2000). Development and validation of a GC/MS method for determination of phenolic xenoestrogens in aquatic samples. *Chemosphere* **40**: 929-935
- Braun, P., Moeder, M., Schrader, S., Popp, P., Kusch, P. & Engewald, W. (2003). Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **988**: 41-51
- Brown, B.J., Deng, Z., Karplus, P.A. & Massey, V. (1998). On the active site of old yellow enzyme - Role of histidine 191 and asparagine 194. *J. Biol. Chem.* **273**: 32753-32762
- Buckman, J. & Miller, S.M. (1998). Binding and reactivity of *Candida albicans* estrogen binding protein with steroid and other substrates. *Biochemistry* **37**: 14326-14336
- Cárdenes, L., Ayala, J.H., González, V. & Afonso, A.M. (2002). Fast microwave-assisted dansylation of *N*-nitrosamines – analysis by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **946**: 133-140
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N.E. (1995). Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: Is there a common cause? *Env. Health Persp.* **103**: 137-139

Cassidy, R.M., LeGay, D.S. & Frei, R.W. (1974). Analysis of phenols by derivatization and High-Speed Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **12**: 85-89

Cereghino, G.P.L. & Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 45-66

Christiansen, L.B., Pedersen, K.L., Pedersen, S.N., Korsgaard, B. & Bjerregaard, P. (2000) In vivo comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Env. Tox. Chem.* **19**: 1867-1874

Colborn, T., vom Saal, F.S. & Soto, A.M. (1993). Developmental effects on endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Env. Health Persp.* **101**: 378-384

Dambies, L., Vincent, T. & Guibal, E. (2002). Treatment of arsenic-containing solutions using chitosan derivatives: uptake mechanism and sorption performances. *Water Res.* **36**: 3699-3710

Davis, B.A. (1978). Dansylation of amines, phenolic and catecholic amines and amino acids in aprotic solvents. *J. Chromatogr.* **151**: 252-255

de Nobel, H. & Lipke, P.N. (1994). Is there a role for GPIs in yeast cell-wall assembly? *Trends Cell. Biol.* **4**: 42-45

De Ruiter, C., Otten, R.R., Brinkman, U.A.T. & Frei, R.W. (1987). Rapid and simple dansylation of phenolic steroids using a two-phase system and phase transfer catalysis. *J. Chromatogr. A* **436**: 429-436

de Sampaio G., Bourdineaud, J.-P. & Lauquin, G.J.M. (1999). A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol. Microbiol.* **34**: 247-25

del Olmo, M., Zafra, A., Jurado, A.B. & Vílchez, J.L. (2000). Determination of bisphenol A (BPA) in the presence of phenol by first-derivative fluorescence following micro liquid-liquid extraction (MLLE). *Talanta* **50**: 1141-1148

Degen, G.H. & Bolt, H.M. (2000). Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *Int. Arch. Occup. Env. Health* **73**: 433-441

J. Falbe & M. Regitz (Hrsg.): Römpps Chemie-Lexikon, 9. Auflage 1989, Georg Thieme Verlag Stuttgart

Fang, H., Tong, W., Shi, L.M., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B.S., Xie, Q., Dial, S.L., Moland, C.L. & Sheehan, D.M. (2001). Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem. Res. Toxicol.* **14**: 280-294

Fontaniella, B., Mateos, J.L., Vicente, C. & Legaz, M.-E. (2001). Improvement of the analysis of dansylated derivatives of polyamines and their conjugates by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **919**: 283-288

Fourest, E. & Roux, J.-C. (1992). Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 399-403

Frei, R.W. & Lawrence, J.F. (1973). Fluorogenic labelling in high-speed liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **83**: 321-330

Fürhacker, M., Scharf, S. & Weber, H. (2000) Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere* **41**: 751-756

Gadd, G.M. (1993). Tansley Review No. 47. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* **124**: 25-60

- Gaynor, E.C., Mondésert, G., Grimme, S.J., Reed, S.I., Orlean, P. & Emr, S.D. (1999). *MCD4* encodes a conserved endoplasmic reticulum membrane protein essential for glycosyl-phosphatidylinositol anchor synthesis in yeast. *Mol. Biol. Cell* **10**: 627-648
- Gellissen, G., Melber, K., Janowicz, Z.A., Dahlems, U.M., Weydemann, U., Piontek, M, Strasser, A.W. & Hollenberg, C.P. (1992). Heterologous protein production in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* **62**: 79-93
- Gellissen, G. (2000). Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 741-750
- Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D.P. & Gaido, K.W. (1998). Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* **142**: 203-214
- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N. & Kitada, K. (1999) Amino acid residues in the ω -minus region participate in cellular localization of yeast glycosyl-phosphatidylinositol-attached proteins. *J. Bacteriol.* **181**: 3886-3889
- Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T. & Ando, M. (2000). Interaction of bisphenol A with rat hepatic cytochrome P450 enzymes. *Chemosphere* **41**: 973-978
- Heemken, O.P., Reincke, H., Stachel, B. & Theobald, N. (2001). The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* **45**: 245-259
- Higgins, D.R. & Cregg, J.M. (1998a). Introduction to *Pichia pastoris*. *Meth. Mol. Biol.* **103**: 1-15
- Higgins, D.R. & Cregg, J.M. (1998b). Appendix: Foreign proteins expressed in *P.pastoris*. *Meth. Mol. Biol.* **103**: 249-261

- Hoffman, C.S. & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272
- Hollenberg, C.P. & Gellissen, G. (1997). Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 554-560
- Holmquist, M., Tessier, D.C. & Cygler, M. (1997). High-level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **11**: 35-40
- Ike, M., Jin, C.S. & Fujita, M. (2000). Biodegradation of bisphenol A in the aquatic environment. *Water Sci. Technol.* **42**: 31-38
- Inoue H., Yokota, H., Makino, T., Yuasa, A. & Kato, S. (2001). Bisphenol A glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug Metabol. Disp.* **29**: 1084-1087
- Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., Dagnyc, T. & Dohrendorf, K. (2002). Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **974**: 143-159
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. & Sumpter, J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Env. Sci. Technol.* **32**: 2498-2506
- Juberg, D.R. (2000). An evaluation of endocrine modulators: Implications for human health. *Ecotoxicol. Env. Safety* **45**: 93-105
- Julius, D., Schekman, R. & Thorner, J. (1984). Glycosylation and processing of prepro- α -factor through the yeast secretory pathway. *Cell* **36**: 309-318
- Kambe-Honjoh, H., Sugawara, A., Yoda, K., Kitamoto, K. & Yamasaki, M. (1997). Isolation and characterization of nickel-accumulating yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 373-378

- Kang, H.A., Sohn, J.-H., Choi, E.-S., Chung, B.H., Yu, M.-H., & Rhee, S.-K. (1998). Glycosylation of human α 1-Antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeasts. *Yeast* **14**: 371-381
- Kapteyn, J.C., van den Ende, H. & Klis, F.M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 373-383
- Khattar, J.I.S., Sarma, T.A. & Singh, D.P. (1999). Removal of chromium ions by agar immobilized cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* in a continuous flow bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* **25**: 564-568
- Kim, S.-Y., Sohn, J.-H., Pyun, Y.-R. & Choi, E.-S. (2002). A cell surface display system using novel GPI-anchored proteins in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **19**: 1153-1163
- Klinge, C.M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucl. Acid Res.* **29**: 2905-2919
- Kollár, R., Reinhold, B.B., Petráková, E., Yeh, H.J.C., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M. & Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast Cell Wall - β (1-6)-glucan interconnects mannoprotein, β (1-3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* **272**: 17762-17775
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L & Feldman, D. (1993). Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**: 2279-2286
- Kuroda, K., Shibasaki, S., Ueda, M. & Tanaka, A. (2001). Cell surface-engineered yeast displaying a histidine oligopeptide (hexa-His) has enhanced adsorption of and tolerance to heavy metal ions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 697-701

- Kwak, H.-I., Bae, M.-O., Lee, M.-O., Lee, Y.-S., Lee, B.-J., Kang K.-S., Chae, C.-H., Sung, H.-J., Shin, J.-S., Kim, J.-H., Mar, W.-C., Sheen, Y.-Y. & Cho, M.-H. (2001). Effects of nonylphenol, bisphenol A and their mixture in the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Env. Tox. Chem.* **20**: 787-795
- Kwakman, P.J.M., Kamminga, D.A., Brinkman, U.A.T. & de Jong, G.J. (1991). Sensitive liquid chromatographic determination of alkyl-, nitro- and chlorophenols by precolumn derivatization with dansyl chloride, postcolumn photolysis and peroxyoxalate chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A* **553**: 345-356
- Langmuir, I. (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* **40**: 1361-1403
- Lawrence, J.F. (1979). Fluorimetric derivatization in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **17**: 147-151
- Lee, H.-B. & Peart, T.E. (2000). Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. *Water Qual. Res. J. Canada* **35**: 283-298
- Lemmer, H., Zaglauer, A. & Metzner, G. (1997). Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 1: Physico-chemical and biological characterization. *Water Res.* **31**: 1897-1902
- Levina, N.B. & Nazimov, I.V. (1984). High-performance liquid chromatography of Dns-amino acids in the purity control of peptides. *J. Chromatogr. A* **286**: 207-216
- Leuchter, R. (1999). Isolation von Schwermetallresistenzgenen durch heterologe Komplementation von Mutanten und Überexpression in *Schizosaccharomyces pombe*. Dissertation, RWTH Aachen.
- Lipke, P.N., Wojciechowicz D. & Kurjan J. (1989). *AG α 1* is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* α -agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3155-3165

- Lipke, P.N. & Kurjan, J. (1992). Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol. Rev.* **56**: 180-194
- Loomis, A.K & Thomas, P. (2000). Effects of estrogens and xenoestrogens on androgen production by atlantic croaker testes in vivo; evidence for a nongenomic action mediated by an estrogen membrane receptor. *Biol. Reprod.* **62**: 995-1004
- López, A., Lázaro, N., Morales, S. & Marqués, A.M. (2002). Nickel biosorption by free and immobilized cells of *Pseudomonas fluorescens* 4F39: a comparative study. *Water, Air, and Soil Pollution* **135**: 157-172
- López-Ramírez, J.A., Sahuquillo, S., Sales, D. & Quiroga, J.M. (2002). Pre-treatment optimisation studies for secondary effluent reclamation with reverse osmosis. *Water Res.* **37**: 1177-1184.
- Lu, C.-F., Montijn, R.C., Brown, J.L., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H. & Lipke, P.N. (1995). Glycosylphosphatidylinositol-dependent cross-linking of α -agglutinin and β 1,6-Glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* **128**: 333-340
- Madani, N.D., Malloy, P.J., Rodriguez-Pombo, P., Krishnan, A.V. & Feldman, D. (1994). *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 922-926
- Martin Ruel, S., Comeau, Y., Héduit, A., Deronzier, G., Ginestet, P. & Audic, J.M. (2002). Operating consitions for the determination of the biochemical potential of wastewater. *Water Res.* **36**: 2337-2341
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T. & Yamazawa, A. (1999). Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *J. Biotechnol.* **70**: 33-38
- Matthews, R.G. & Massey, V. (1968). Isolation of old yellow enzyme in free and complexed forms. *J. Biol. Chem.* **244**: 1779-1786.

- Matthews, R.G., Massey, V. & Sweeley, C.C. (1975). Identification of p-hydroxybenzaldehyde as the ligand in the green form of old yellow enzyme. *J. Biol. Chem.* **250**: 9294-9298
- Matthews, J.B., Twomey, K. & Zacharewski, T.R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β . *Chem. Res. Toxicol.* **14**: 149-157
- Miranda, M., Ramírez, J., Guevara, S., Ongay-Larios, L., Pena, A. & Coria, R. (1995). Nucleotide sequence and chromosomal localization of the gene encoding the old yellow enzyme from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **11**: 459-465
- Mogollón, L., Rodríguez, R., Larrota, W., Ramírez, N. & Torres, R. (1998). Biosorption of nickel using filamentous fungi. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**: 593-601
- Morel, N. & Massoulié, J. (1997). Expression and processing of vertebrate acetylcholinesterase in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem. J.* **328**: 121-129
- Müller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P., & Dalbøge, H. (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**: 1267-1283
- Muniz, M. & Riezman, H. (2000). Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J.* **19**: 10-15
- Murai, T., Ueda, M., Atomi, H., Shibasaki, Y., Kamasawa, N., Osumi, M., Kawaguchi, T., Arai, M. & Tanaka, A. (1997). Genetic immobilization of cellulase on the cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 499-503

Naassner, M., Mergler, M., Wolf, K. & Schuphan, I. (2002). Determination of the xenoestrogens 4-nonylphenol and bisphenol A by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection after derivatisation with dansyl chloride. *J. Chromatogr. A* **945**: 133-138

Nadal, A., Ropero, A.B., Laribi, O., Maillet, M., Fuentes, E. & Soria, B. (2000). Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor α and estrogen receptor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 11603-11608

Nakakubo H., Fukuyama H., Nakajima M., Imada T., Uno S., Shiota N., Takai S., Miyazaki M. & Nakamura N. (2000). Secretory production of recombinant human chymase as an active form in *Pichia pastoris*. *Yeast* **16**: 315-323

Nakamura, Y., Shibasaki, S., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H. & Kondo, A. (2001). Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 500-505

Niino, Y.S., Chakraborty, S., Brown, B.J. & Massey, V. (1995). A new old yellow enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**: 1983-1991

Nilsson, R. (2000). Endocrine modulators in the food chain and environment. *Toxicol. Pathol.* **28**: 420-431

Nokelainen M., Tu H., Vuorela A., Notbohm H., Kivirikko K.I. & Myllyharju J. (2001). High-level production of human type I collagen in the yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* **18**: 797-806

Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M. & Markert, B. (2000). Effects of endocrine disruptors on Prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* **9**: 383-397

Ohi, H., Okazaki, N., Uno, S., Miura, M. & Hiramatsu, R. (1998). Chromosomal DNA patterns and gene stability of *Pichia pastoris*. *Yeast* **14**: 895-903

Penalver, A., Pocurull, E., Borrull, F. & Marcé, R.M. (2002). Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples. *J. Chromatogr. A* **953**: 79-87

Pfeiffer, E., Rosenberg, B., Deuschel, S. & Metzler, M. (1997). Interference with microtubules and induction of micronuclei in vitro by various bisphenols. *Mutation Res.* **390**: 21-31

Puranik, P.R. & Paknikar, K.M. (1999). Biosorption of lead, cadmium, and zinc by *Citrobacter* strain MCM B-181: characterization studies. *Biotechnol. Prog.* **15**: 228-237

Rajapakse, N., Ong, D. & Kortenkamp, A. (2001). Defining the impact of weakly estrogenic chemicals on the action of steroidal estrogens. *Toxicol. Sci.* **60**: 296-304

Rodgers-Gray, T., Jobling, S., Morris, S., Kelly, C., Kirby, S., Janbakhsh, A., Harries, J.E., Waldock, M.J., Sumpter, J.P. & Tyler, C.R. (2000). Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Env. Sci. Technol.* **34**: 1521-1528

Rosenfeld, S.A., Nadeau, D., Tirado, J., Hollis G.F., Knabb, R.M. & Jia, S. (1996). Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **8**: 476-482

Routledge, E.J. & Sumpter, J.P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Env. Sci. Technol.* **15**: 241-248

Saito, K., Thiele, D.J., Davio, M., Lockridge, O. & Massey, V. (1991). The cloning and expression of a gene encoding Old Yellow Enzyme from *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Biol. Chem.* **266**: 20720-20724

Sajiki, J., Takahashi, K. & Yonekubo, J. (1999). Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **736**: 255-261

Sajiki, J. (2001). Determination of bisphenol A in blood using high-performance liquid chromatography-electrochemical detection with solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* **755**: 9-15

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schaffrath, R. & Breunig, K.D. (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet. Biol.* **30**: 173-190

Schillberg, S. (1994). Isolierung, Charakterisierung und Sequenzierung des EF-1a-Gens von *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* und die Verwendung des EF-1a-Promotors in Experimenten zur Transformation dieses Pilzes. Dissertation, RWTH Aachen

Schreuder, M.P., Brekelmans, S., van den Ende, H. & Klis, F.M. (1993) Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**: 399-409

Sheeler, C. Q., Dudley, M.W. & Khan, S.A. (2000). Environmental estrogens induce transcriptionally active estrogen receptor dimers in yeast: activity potentiated by the coactivator RIP140. *Env. Health Persp.* **108**: 97-103

Shibasaki, S., Ueda, M., Ye, K., Shimizu, K., Kamasawa, N., Osumi, M. & Tanaka, A. (2001). Creation of cell-surface-engineered yeast that display different fluorescent proteins in response to the glucose concentration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 528-533

Skowronski, R. & Feldman, D. (1989). Characterization of an estrogen-binding protein in the yeast *Candida albicans*. *Endocrinology* **124**: 1965-1972

Skowronski, T., Pirszel, J. & Pawlik-Skowronska, B. (2001). Heavy metal removal by the waste biomass of *Penicillium chrysogenum*. *Water Qual. Res. J. Canada* **36**: 793-803

Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) (2000). Endocrine disruptors and modulators technical issue paper.

Sonnenschein, C. & Soto, A.M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **65**: 143-150

Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W. & Sonnenschein, C. (1991). *p*-Nonyl-Phenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Env. Health Persp.* **92**: 167-173

Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N. & Olea Serrano, F. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Env. Health Persp.* **103**: 113-122

Spengler, P., Körner, W. & Metzger, J.W. (2001). Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Env. Tox. Chem.* **20**: 2133-2141

Sreekrishna, K. & Kropp, K.E.: *Pichia pastoris*

In: K.Wolf (ed.): Nonconventional yeasts in biotechnology, pp 202-253. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1996

Stott, K., Saito, K., Thiele, D.J. & Massey, V. (1993). Old Yellow Enzyme - The discovery of multiple isozymes and a family of related proteins. *J. Biol. Chem.* **268**: 6097-6106

- Takao, T., Nanamiya, W., Nagano, I., Asaba, K., Kawabata, K. & Hashimoto, K. (1999). Exposure with the environmental estrogen bisphenol A disrupts the male reproductive tract in young mice. *Life Sci.* **65**: 2351-2357
- Takos, A.M., Dry, I.B. & Soole, K.L. (2000). Glycosyl-phosphatidylinositol-anchor addition signals are processed in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* **21**: 43-52
- Theorell, H. (1935). Reindarstellung der Wirkungsgruppe des gelben Fermentes. *Biochem. Z.* **275**: 344-345
- Tsuda, T., Suga, K., Kaneda, E. & Ohsuga, M. (2000). Determination of 4-nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* **746**: 305-309
- Tunceli, A., Bag, H. & Türker, A.R. (2001). Spectrophotometric determination of some pesticides in water samples after preconcentration with *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sepiolite. *Fresenius J. Anal. Chem.* **371**: 1134-1138
- van der Vaart, J.M. & Verrips, C.T. (1998). Cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Genet. Engin. Rev.* **15**: 387-411
- Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea Serrano, M.F., Ruiz de Almodovar, J.M. & Pedraza, V. (1995). The E-screen assay: A comparison of different MCF7 cell stocks. *Env. Health Persp.* **103**: 844-850
- Warburg, O. & Christian, H. (1933). Über das gelbe Ferment und seine Wirkungen. *Biochem. Z.* **266**: 377-411

Watanabe, T., Yamamoto, H., Inoue, K., Yamaguchi, A., Yoshimura, Y., Kato, K., Nakazawa, H., Kuroda, N. & Nakashima, K. (2001): Development of sensitive high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using 4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)-benzoyl chloride as a labeling reagent for determination of bisphenol A in plasma samples. *J. Chromatogr. B* **762**: 1-7

Wenzel, A., Küchler, T., Henschel, K.-P., Schnaak, W., Diedrich, M. & Müller, J. (1998). Konzentrationen östrogen wirkender Substanzen in Umweltmedien. Forschungsbericht des Umweltbundesamtes UBA-FB 99-098

E. Wiberg: Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 55-70. Auflage 1964, Walter der Gruyter & Co. Berlin

Williams, R.E. & Bruce, N.C. (2002). New uses for an old enzyme – the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes. *Microbiology* **148**: 1607-1614

Witorsch, R.J. (2000). Endocrine disruption: A critical review of environmental estrogens from a mechanistic perspective. *Toxic Subst. Mechan.* **19**: 53-78

Wong, M.F., Chua, H., Lo, W., Leung, C.K. & Yu, P.H.F. (2001). Removal and recovery of copper (II) ions by bacterial biosorption. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **91-93**: 447-457

Yamamoto, T. & Yasuhara, A. (1999). Quantities of bisphenol A leached from plastic waste samples. *Chemosphere* **38**: 2569-2576

Yasui, M., Shibasaki, S., Kuroda, K., Ueda, M., Kawada, N., Nishikawa, J., Nishihara, T. & Tanaka, A. (2002). An arming yeast with the ability to entrap fluorescent 17 β -estradiol on the cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 329-331

Ye, K., Shibasaki, S., Ueda, M., Murai, T., Kamasawa, N., Osumi, M., Shimizu, K. & Tanaka, A. (2000). Construction of an engineered yeast with glucose-inducible emission of green fluorescence from the cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 90-96

Zafra, A., del Olmo, M., Suárez, B., Hontoria, E., Navalón, A. & Vílchez, J.L. (2003). Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater. *Water Res.* **37**: 735-742

Zhao, X., Malloy, P.J., Ardies, C.M. & Feldman, D. (1995). Oestrogen-binding protein in *Candida albicans*: antibody development and cellular localization by electron immunocytochemistry. *Microbiology* **141**: 2685-2692

Zimmermann, M. & Wolf, K.: Biosorption of Metals.

In: H.D. Osiewacz (Ed.): *The Mycota X – Industrial Applications*, pp. 355-364. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2002.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Wolf danke ich für die interessante Themenstellung und den im Rahmen des Graduiertenkollegs AGEESA zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herrn Prof. Dr. A. Schäffer danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. M. Zimmermann für seine ständige Unterstützung und Beratung, auch und gerade in schwierigen Phasen der Arbeit. Ebenfalls danke ich ihm für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Herrn Dr. B. Schmidt (Institut für Biologie V) danke ich für die Erlaubnis zur und Hilfe bei der Nutzung der Geräte und Meßinstrumente für die BPA-Analytik.

Den Kollegen von AGEESA möchte ich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit danken, insbesondere Dipl. Chem. Markus Naaßner (Institut für Biologie V).

Für das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft danke ich den Kollegen der Institute für Biologie IV und Biologie V, insbesondere Dipl. Biol. Nadine Phlippen, Dipl. Biol. Silke Hammelmann, Dipl. Biol. Jens Bührmann und Dipl. Biol. Kerstin Derz.

Schließlich danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung, v.a. bei der Durchsicht der Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Magnus Mergler
Geburtsdatum	23.01.1974
Geburtsort	Jülich

Schulbildung

1980-1984	Städtische Grundschule Paul Gerhardt in Düren
1984-1993	Stiftisches Gymnasium Düren
	Abitur: Juni 1993

Hochschulausbildung

10/ 1993 – 10/ 1999	Studium der Biologie an der RWTH Aachen, Schwerpunkt Mikrobiologie, Abschluß: Diplom-Biologe Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Regulation der Gärung bei der Hefe <i>Pichia stipitis</i> “
11/ 1999 – 07/ 2003	Anfertigung der Dissertation „ Immobilisierung von BPA-Bindeproteinen an der Oberfläche von Hefezellen" am Institut für Biologie IV (Mikrobiologie) der RWTH Aachen
11/ 1999 – 11/ 2002	Stipendiat der DFG, Mitglied des interdisziplinären Graduiertenkollegs AGEESA („Aachener Graduiertenkolleg zur Eliminierung endokrin wirksamer Substanzen aus Abwasser")
11/ 2003 – 04/ 2003	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biologie IV (Mikrobiologie) der RWTH Aachen