

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen:

Produkt	Firma
Acrylamid	Serva, Heidelberg (D)
Agarose	Biozym Diagnostik GmbH, Hameln (D)
Aminosäuren	Sigma, Deisenhofen (D)
Ampicilin	Serva, Heidelberg (D)
APS	Serva, Heidelberg (D)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg (D)
BSA	Serva, Heidelberg (D)
Coomassie-Färbelösung, kolloidal	Novex, Invitrogen, Groningen (NL)
DNA Gel-Elutionskit	Qiagen, Hilden (D)
DTT	Serva, Heidelberg (D)
ECL-Western-Blotting-Detektionssystem	Amersham Pharmacia GmbH, Braunschweig (D)
ECL-anti Kaninchen- und ECL-anti Maus-Antikörper	Sigma, Deisenhofen (D)
EDTA	Merck, Darmstadt (D)
Entwicklungsreagenzien	Adefo Chemie, Nürnberg (D)
Geneticin® (G-418 Sulfat)	Life Technologies (D)
Genomische DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Promega, Madison (USA)
Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, Michigan (USA)
Herings sperma-DNA	Sigma, Deisenhofen (D)
IPTG	peQLab Biotechnologie GmbH (D)
Lambda DNA-Standard	MBI-Fermentas (USA)
L-Malat	Merck, Darmstadt (D)
Lyticase	Sigma, Deisenhofen (D)
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt (D)
Nitrozellulose-Folie (0,45µm)	Schleicher und Schuell, Dassel (D)
N,N-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg (D)
Ölsäure	Merck, Darmstadt (D)
Oligonukleotide	MWG Biotech AG, Ebersberg (D)
PEG	Serva, Heidelberg (D)
Petroselinsäure	Merck, Darmstadt (D)
Plasmid Miniprep Kit	peQLab Biotechnologie GmbH (D)
Protease-Inhibitoren (Complete)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
PWO-DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (D)
Restriktionsendonukleasen	Eurogentec, Seraing (Belgien) und New England Biolabs GmbH, Frankfurt (D)
RNaseA	Sigma, Deisenhofen (D)
Röntgenfilme	Amersham Pharmacia GmbH, Braunschweig (D)
SDS	Serva, Heidelberg (D)
SDS PAGE Standard Marker „Molecular Weight Standard, Low Range“	BioRad Laboratories GmbH, München (D)
Select Agar	Difco Lab., Detroit, Michigan (USA)
Select Pepton	Difco Lab., Detroit, Michigan (USA)
Sterilfilter	Schleicher und Schuell (D)
Taq-DNA-Polymerase	ABgene, Epsom (U.K.)
TEMED	Serva, Heidelberg (D)
Triton X-100	Merck, Darmstadt (D)
Tween® 20, 40	Serva, Heidelberg (D)
T4-DNA-Ligase und Ligasepuffer (10x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt (D)
Whatman 3 MM	Whatman, Maidstone (UK)
X-Gal	Serva, Heidelberg (D)
100 Bp Standard Marker	MBI-Fermentas (USA)

Phytansäure wurde von Herrn Cengiz Azap, FU Berlin, Institut für Chemie/Organische Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Reißig synthetisiert.

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden in p. A. Qualität von in Deutschland vertretenen Firmen bezogen.

Puffer wurden mit Wasser in Milli-Q®-Qualität oder zweifach destilliertem Wasser angesetzt.

2.2 Mikroorganismen

2.2.1 *Escherichia coli*

Es wurde der folgende *E. coli* Stamm verwendet:

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Stratagene, San Diego (USA)

Tab. 2.1: Stammbezeichnung, Genotyp und Herkunft des verwendeten *Escherichia coli* Stammes.

2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die verwendeten *S. cerevisiae* Stämme und Mutanten sind im Folgenden aufgeführt:

Stammbezeichnung	Genotyp	Quelle
UTL7A	<i>Mat a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2-3/112</i>	Prof. Dr. W. Duntze, Bochum
UTL7A <i>pex13</i> Δ	<i>Mat a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2-3/112</i> , <i>PEX13::KANMX</i>	(80)
UTL7A <i>ybl015w</i> Δ	<i>Mat a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2-3/112</i> , <i>YBL015w::KANMX</i>	diese Arbeit
UTL7A <i>yhr199c</i> Δ	<i>Mat a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2-3/112</i> , <i>YHR199c::KANMX</i>	diese Arbeit
UTL7A <i>ydr058c</i> Δ	<i>Mat a</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2-3/112</i> , <i>YDR058c::KANMX</i>	diese Arbeit
BJ1991	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i>	(122)
BJ1991[PEX11TAP-Tag]	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , [PEX11TAP-Tag]	diese Arbeit
BJ1991[PTS2DsRed]	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , [PTS2DsRed]	diese Arbeit
BJ1991[MitoDsRed-424]	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , [MitoDsRed]	diese Arbeit
BJ1991 <i>fox1</i> Δ	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>FOX1::LEU2</i>	Dr. H. Rottensteiner, Berlin
BJ1991 <i>pip2</i> Δ <i>oaf1</i> Δ	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>PIP2::KANMX</i> , <i>OAF1::LEU2</i>	Dr. H. Rottensteiner, Berlin
BJ1991 <i>pex5</i> Δ	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>PEX5::KANMX</i>	Dr. B. Distel, Amsterdam, NL
BJ1991 <i>pex7</i> Δ	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>PEX7::KANMX</i>	Dr. B. Distel, Amsterdam, NL
BJ1991 <i>pex13</i> Δ	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>PEX13::KANMX</i>	Dr. B. Distel, Amsterdam, NL
BJ1991 <i>pex19</i> Δ	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>PEX19::KANMX</i>	Dr. B. Distel, Amsterdam, NL
BJ1991 <i>pex11</i> Δ (Leu)	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>PEX11::LEU2</i>	Prof. Dr. R. Erdmann, Berlin
BJ1991 <i>pex11</i> Δ (KanMX)	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>PEX11::KANMX</i>	diese Arbeit
BJ1991 <i>por1</i> Δ	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>POR1::KANMX</i>	diese Arbeit
BJ1991 <i>por2</i> Δ	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>POR2::KANMX</i>	diese Arbeit
BJ1991 <i>por2/por1</i> Δ	<i>Mat α</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3-52</i> , <i>prb 1-1122</i> , <i>pep4-3</i> , <i>gal2</i> , <i>POR2</i> , <i>POR1::KANMX</i>	diese Arbeit

Stammbezeichnung	Genotyp	Quelle
BJ1991 <i>por2/por1/pex11Δ</i>	<i>Mat α, leu2, trp1, ura3-52, prb 1-1122, pep4-3, gal2, POR2, POR1, PEX11::KANMX</i>	diese Arbeit
BY4742	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	EUROSCARF*
BY4742[PEX11TAP-Tag]	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0 [PEX11TAP-Tag]</i>	diese Arbeit
BY4742 <i>pex13Δ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, PEX13::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>pex15Δ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, PEX15::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>yeI020cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YEL020c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>yor084wΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YOR084w::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>ygl037cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YGL037c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>ykl140wΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YKL140w::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i> yol041cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YOL041c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>yor228cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YOR228c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>ybr177cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YBR177c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>ymr325cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YMR275c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>yor317wΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YOR317w::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>yal054cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YAL054c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>y cr091wΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YCR091w::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>ykl091cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YKL091c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>ydl077wΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YDL077w::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>ypr003cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YPR003c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>yir034cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YIR034c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>y nr021wΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YNR021w::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>y jr095wΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YJR95w::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>y mr233wΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YMR233w::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>y gr086cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YGR086c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>y dr502cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YDR502c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>y hr064cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YHR063c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>y gl121cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YGL121c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>y cl056cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YCL056c::KANMX</i>	EUROSCARF*
BY4742 <i>y il065cΔ</i>	<i>Mat α, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0, YIL065c::KANMX</i>	EUROSCARF*
FY1679	<i>Mat α, ura3-52, HIS3, LEU2, LYS2, trp1Δ63</i>	EUROSCARF*
FYΔ1679 <i>y gl184cΔ</i>	<i>Mat α, ura3-52, HIS3, LEU2, LYS2, trp1Δ63, YGL184c(4,1378)::KANMX</i>	EUROSCARF*

Tab. 2.2: Stammbezeichnung, Genotyp und Herkunft der verwendeten Stämme von *S. cerevisiae*.

* EUROSCARF, European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis, Frankfurt/Main

2.3 Antiseren

Mit Ausnahme des monoklonalen Antikörpers gegen Pgk1p wurden polyklonale Antiseren verwendet:

Antikörper gegen	Verdünnung	Quelle
Fox3p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:10.000	AG Erdmann, Berlin, D
Mir1p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:10.000	(169)
Pex11p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:3.000	Prof. Dr. R. Erdmann, Berlin, D
Pex13p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:10.000	AG Kunau, Bochum, D
Fat2p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:10.000	(19)
GFP (<i>S. cerevisiae</i>)	1:10.000	AG Kunau, Bochum, D
Pgk1p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:1.000	MoBiTec, Göttingen, D
Tgl1p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:1.000	AG Prof. G. Daum, Graz, A
Erg6p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:1.000	AG Prof. G. Daum, Graz, A
Protein A (<i>S. cerevisiae</i>)	1:5.000	Sigma, Deisenhofen, D
Ant1p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:5.000	AG Erdmann, Berlin, D
Sfc1p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:3.000	L. Palmieri, Bari, I
Yhm2p (<i>S. cerevisiae</i>)	1:3.000	L. Palmieri, Bari, I

Tab. 2.3: Verwendete Antikörper, Verdünnungen und Herkunft.

2.4 Vektoren und Plasmidkonstrukte

2.4.1 Vektoren

Folgende Vektoren und Plasmidkonstrukte wurden zur Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt:

Vektor	Quelle
pBluescript SK ⁺	Fa. Stratagene, San Diego, USA
pUG35, pUG36	U. Güldener, J. H. Hegemann, Düsseldorf, D
pBS1539	B. Seraphin, EMBL, Heidelberg, D
pYlplac204-ADH2-Promotor-PTS2DsRed (pHPR131)	H. Rottensteiner, Berlin, D
MitoDsRed-424	(168)

Tab. 2.4: Für diese Arbeit zur Verfügung gestellte Vektoren und Plasmide und deren Herkunft.

2.4.2 Plasmidkonstrukte

Folgende Plasmidkonstrukte wurden im Rahmen der Arbeit erstellt. Die verwendeten Hefegene wurden mittels präparativer PCR aus dem Hefegenom amplifiziert (2.16.10) und die Amplifikate, soweit nicht anders angegeben, zunächst "blunt end" mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *EcoRV* in den Vektor pBluescript SK⁺ kloniert. Anschließend erfolgte die Klonierung der DNA-Fragmente mit Hilfe der in der Tabelle angegebenen Restriktionsendonukleasen in die GFP-Fusions-Vektoren pUG35 (ohne Stop-Codon, am C-Terminus des Zielproteins) oder pUG36 (am N-Terminus).

Konstrukt	Oligo-Nr. RE	Restriktionsendonukleasen	ORF/GFP-Fusion
pUG36-25	91+66	<i>EcoRI, Sall</i>	GFP-YEL020C
pUG35-22	65+67	<i>EcoRI, Sall</i>	YEL020C-GFP
pUG36-26	92+69	<i>EcoRI, Sall</i>	GFP-YAL032C
pUG35-6	68+70	<i>XbaI, Sall</i>	YAL032C-GFP
pUG36-27	445+446	<i>BamHI, ClaI</i>	GFP-YBL015W
pUG35-37	445+447	<i>BamHI, ClaI</i>	YBL015W-GFP
pUG36-28	94+75	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YOR084W
pUG35-8	74+76	<i>XbaI, EcoRI</i>	YOR084W-GFP
pUG36-23	95+96	<i>EcoRI, ClaI</i>	GFP-YDR058C
pUG35-24	95+97	<i>EcoRI, ClaI</i>	YDR058C-GFP
pUG36-29	121+122	<i>EcoRI, Sall</i>	GFP-YHR199C
pUG35-30	121+123	<i>EcoRI, Sall</i>	YHR199C-GFP
pUG36-31	127+128	<i>EcoRI, ClaI</i>	GFP-YJL031C
pUG35-32	127+129	<i>EcoRI, ClaI</i>	YJL031C-GFP
pUG36-33	124+200	<i>EcoRI, ClaI</i>	GFP-YGL037C
pUG35-34	124+183	<i>EcoRI, ClaI</i>	YGL037C-GFP
pUG36-35	184+185	<i>BamHI, HindIII</i>	GFP-YKL140W
pUG35-36	184+186	<i>BamHI, HindIII</i>	YKL140W-GFP
pUG36-40	265+266	<i>BamHI, HindIII</i>	GFP-YOL041C
pUG35-41	265+267	<i>BamHI, HindIII</i>	YOL041C-GFP
pUG36-42	268+269	<i>BamHI, HindIII</i>	GFP-YOR228C
pUG35-43	268+270	<i>BamHI, HindIII</i>	YOR228C-GFP
pUG36-46	339+340	<i>BamHI, HindIII</i>	GFP-YBR177C
pUG35-47	339+341	<i>BamHI, HindIII</i>	YBR177C-GFP
pUG36-48	342+343	<i>EcoRI, Sall</i>	GFP-YMR275C
pUG35-49	342+344	<i>EcoRI, Sall</i>	YMR275C-GFP
pUG36-52	348+349	<i>SmaI, Sall</i>	GFP-YOR317W
pUG35-53	348+350	<i>SmaI, Sall</i>	YOR317W-GFP
pUG36-54	351+352	<i>EcoRI, HindIII</i>	GFP-YAL054C
pUG35-55	351+353	<i>EcoRI, HindIII</i>	YAL054C-GFP
pUG36-56	354+355	<i>BamHI, ClaI</i>	GFP-YCR091W

Konstrukt	Oligo-Nr. RE	Restriktionsendonukleasen	ORF/GFP-Fusion
pUG35-57	354+356	<i>BamHI, ClaI</i>	YCR091W-GFP
pUG36-58	357+358	<i>EcoRI, HindIII</i>	GFP-YKL091C
pUG35-59	357+359	<i>EcoRI, HindIII</i>	YKL091C-GFP
pUG36-60	360+361	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YGL184C
pUG35-61	360+362	<i>BamHI, EcoRI</i>	YGL184C-GFP
pUG36-62	363+364	<i>BamHI, Sall</i>	GFP-YDL077C
pUG35-63	363+365	<i>BamHI, Sall</i>	YDL077C-GFP
pUG36-64	366+367	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YPR003C
pUG35-65	366+368	<i>BamHI, EcoRI</i>	YPR003C-GFP
pUG36-66	369+370	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YIR034C
pUG35-67	369+371	<i>BamHI, EcoRI</i>	YIR034C-GFP
pUG36-68	372+373	<i>BamHI, HindIII</i>	GFP-YNR021W
pUG35-69	372+374	<i>BamHI, HindIII</i>	YNR021W-GFP
pUG36-70	375+376	<i>BamHI, HindIII</i>	GFP-YJR095W
pUG35-71	375+377	<i>BamHI, HindIII</i>	YJR095W-GFP
pUG36-72	450+451	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YMR233W
pUG35-73	450+452	<i>BamHI, EcoRI</i>	YMR233W-GFP
pUG36-74	453+454	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YGR086C
pUG35-75	453+455	<i>BamHI, EcoRI</i>	YGR086C-GFP
pUG36-76	456+457	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YDR502C
pUG35-77	456+458	<i>BamHI, EcoRI</i>	YDR502C-GFP
pUG36-78	459+460	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YGL001C
pUG35-79	459+461	<i>BamHI, EcoRI</i>	YGL001C-GFP
pUG36-80	463+464	<i>BamHI, Sall</i>	GFP-YBR118W
pUG35-81	463+465	<i>BamHI, Sall</i>	YBR118W-GFP
pUG36-82	466+467	<i>BamHI, Sall</i>	GFP-YPR080W
pUG35-83	466+468	<i>BamHI, Sall</i>	YPR080W-GFP
pUG36-84	469+470	<i>BamHI, Sall</i>	GFP-YHR064C
pUG35-85	469+471	<i>BamHI, Sall</i>	YHR064C-GFP
pUG36-86	510+511	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YGL121C
pUG35-87	510+512	<i>BamHI, EcoRI</i>	YGL121C-GFP
pUG36-88	513+514	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YCL056C
pUG35-89	513+515	<i>BamHI, EcoRI</i>	YCL056C-GFP
pUG36-90	516+517	<i>BamHI, EcoRI</i>	GFP-YIL065C
pUG35-91	516+518	<i>BamHI, EcoRI</i>	YIL065C-GFP

Tab. 2.5: Plasmidkonstrukte, verwendete Oligonukleotide und Restriktionsendonukleasen zur Erstellung von GFP-Fusionsproteinen.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die photometrischen Enzymaktivitätsmessungen der Katalase [EC 1.11.1.6] und der Fumarase [EC 4.2.1.2] wurden entsprechend nach Moreno de al Garza (164) an einem Spektralphotometer (Shimadzu, Japan) bei einer Wellenlänge von O.D.=240 nm durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Testansätze betrug je 1 ml.

Ansatz zur Messung der Katalase-Aktivität [Wasserstoffperoxid Oxidoreduktase]	Ansatz zur Messung der Fumarase-Aktivität [Fumarathydratase]
50 mM Kaliumphosphatpuffer 10 mM Wasserstoffperoxid 0,1% Triton-X-100	50 mM Kaliumphosphatpuffer 4 mM L-Malat 0,1% Triton-X-100

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA-Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von O.D.₂₆₀ bestimmt. Eine O.D.₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 20 µg/ml Oligonukleotid oder 40 µg/ml RNA. Der Quotient O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ wurde als Maß für die Reinheit der DNA-Lösung bestimmt.

2.6 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

2.6.1 Medien

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* Stämmen auf Agarplatten und in Submerskulturen erfolgte nach Erdmann *et al.* (63) in Vollmedium (YPD) oder synthetischem Minimalmedium (SD) bei 30°C. Die Zusammensetzung der Aminosäuren in Minimalmedien und Induktionsmedien und die zugesetzten Kohlenstoffquellen variierten je nach Selektionsbedingungen. Der pH-Wert wurde immer auf 6,0 eingestellt. YNO-Medium diente zur Ölsäureinduktion und wurde als Konzentrat zur SD-Vorkultur hinzugefügt. Die Ölsäure wurde vor der Zugabe zum Medium mit Tween 40 emulgiert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 2% (w/v) Select Agar zugesetzt. Die Medien wurden zur Sterilisation bei 120°C für 25 Min. autoklaviert.

<u>YPD</u>	<u>SD</u>	<u>YNO (5xYN,10xO)</u>
1% (w/v) Hefeextrakt	0,17% (w/v) Hefe-Stickstoff-Basis	0,85% (w/v) Hefe-Stickstoff-Basis
2% (w/v) Pepton	(ohne Aminosäuren)	(ohne Aminosäuren)
2% (w/v) Glukose	0,5% (w/v) Ammoniumsulfat	0,5% (w/v) Hefeextrakt
	0,3% (w/v) Glukose	2,5% (w/v) Ammoniumsulfat
	1% (v/v) Aminosäuren	5% (v/v) Aminosäuren
		1% (v/v) Ölsäure
		1% (v/v) Tween 40

2.6.2 Wachstum auf Festagarplatten

Zur Bestimmung von Auxotrophien wurde Zellmaterial entweder durch Ausstreichen oder mittels Replikaplattierung auf die entsprechenden Selektivplatten aufgebracht und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens auf ölsäure-, petroselinensäure-, laurinsäure-, phytansäure-, acetat-, lactat- bzw. ethanolhaltigen Medien wurden die Platten für 2-10 Tage bei 30°C inkubiert.

2.6.3 Anzucht für biochemische Analysen

Die erste Vorkultur (10 ml SD) wurde direkt von einer Festagarplatte beimpft und über Nacht bei 30°C bei 160 rpm auf einem Rundschüttler inkubiert. Weitere Vorkulturen in

Minimalmedium wurden jeweils auf eine optische Dichte von $O.D._{600} = 0,03 - 0,1$ ($9 \times 10^5 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml) angeimpft und für weitere 12 Std. bis zu ihrer mittleren logarithmischen Phase ($O.D._{600} = 1,0-1,5$) inkubiert. Hauptkulturen mit einem Volumen von 1,5 l wurden bei einer Zelldichte von ca. $3 \times 10^7 - 4,5 \times 10^7$ Zellen/ml mit konzentriertem YNO-Medium beimpft. Die Ölsäureinduktion erfolgte für 12 Std. bei 30°C.

2.7 Aufschluss von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefezellen wurden nach Yaffe und Schatz (266) aufgeschlossen. Nach der Anzucht der Zellen (2.6.3) wurden zur Gewinnung von denaturierten Hefe-Rohlysaten 30 mg Zellmaterial mit 1 ml H₂O, 148 µl 2 N NaOH und 12 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proteine mit 160 µl einer 50%-igen Trichloressigsäure (TCA) versetzt, für weitere 10 Min. auf Eis inkubiert und anschließend sedimentiert (2 Min., 13.000 rpm, 4°C, Heraeus Biofuge). Das Sediment wurde in SDS-Probenpuffer unter Zusatz von 1 M Tris-Base resuspendiert, für 5 Min. bei 95°C erhitzt und anschließend für die SDS-Gelelektrophorese verwendet.

SDS-Probenpuffer

140 µl Tris-Base in 12,5% SDS

160 µl 50% (v/v) Glycerin

90 µl 1 M DTT

10 µl 0,1% Bromphenolblau

2.8 Subzelluläre Fraktionierung durch differentielle Zentrifugation

Nach der Anzucht der Hefezellen unter Induktionsbedingungen (2.6.3) wurde das Zellmedium aus *S. cerevisiae* zur Sedimentation der Zellen zentrifugiert (Sorvall, SLA3000, 5.000 rpm, 5 Min., 4°C). Die Zellen wurden anschließend mit Wasser gewaschen, für 10 Min. in frischem DTT-Puffer bei 30°C inkubiert und danach mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen zum Zellwandverdau zunächst in einem, auf 30°C temperierten, Sorbitol-Puffer aufgenommen, mit 1.000 U Lytikase/g FG (Sigma) versetzt und für 45-60 Min. bei 30°C unter leichtem Schwenken inkubiert, bis ca. 80% der Zellen sphäroplastiert vorlagen. Die Sphäroplastierung wurde lichtmikroskopisch überprüft. Die Sphäroplasten wurden anschließend zweimal mit 1,2 M Sorbitol gewaschen (Sorvall, SLA3000, 2.000 rpm, 5 Min., 4°C). Das erhaltene Pellet wurde in 2fachem Volumen Aufschluss-Puffer resuspendiert und im Potter-Homogenisator (Braun, Melsungen, D) bei 500-800 rpm, bei 4°C für ca. 15 Min. homogenisiert. Im Anschluss wurden nicht aufgeschlossene Zellen, Kerne und Zelltrümmer sedimentiert (Sorvall, SS34, 3.000 rpm, 10 Min., 4°C). Diese

Sicherheitszentrifugation wurde 2 bis 3fach wiederholt. Das dabei gewonnene zellfreie Homogenat wird auch als post-nuklearer Überstand ("post nuclear supernatant", PNS) bezeichnet.

DTT-Puffer

100 mM Tris/HCl, pH 9,4
10 mM DTT

Sorbitol-Puffer

20 mM Kaliumphosphat-Puffer
1,2 M Sorbitol

Aufschluss-Puffer

5 mM MES (pH 6,0)
0,6 M Sorbitol
0,5 mM EDTA
1 mM KCl
1 mM PMSF
50µM Benzamidin
1 mM NaF
"Complete"-Protease-Inhibitor-Tablette (Roche)

2.9 Sedimentation von Organellen

Das zellfreie Homogenat wurde entweder mit einem Kissen aus 2 M Saccharose in Gradienten-Puffer unterschichtet und in Organellensediment (als ringförmige Schicht zwischen Saccharose-Kissen und Überstand) und cytosolischen Überstand getrennt (Sorvall, HB6, 13.000 rpm, 45 Min., 4°C) oder direkt auf einen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen.

Gradienten-Puffer

5 mM MES, pH 6,0
1 mM EDTA
1 mM KCl
0,1% (v/v) Ethanol

2.10 Fraktionierung durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Während das zellfreie Homogenat direkt auf einen Saccharose-Gradienten aufgetragen wurde, wurde das sogenannte Organellenpellet zunächst in Aufschluss-Puffer resuspendiert, auf kontinuierliche 24 ml 32-54%-ige (w/v) Saccharose-Gradienten auf Kissen aus jeweils 1,5 ml Purdenz (Diagnostic International, Schriesheim, D) und 76,5% (w/v) Saccharose aufgetragen und zentrifugiert (Sorvall, SV288, 19.500 rpm, 3 Std., 4°C). Aus dieser Dichtegradienten-Zentrifugation wurden vom Boden des Gefäßes je nach Fragestellung 21-29 Fraktionen mit einem Volumen von 1,2-1,5 ml gesammelt.

2.11 Fraktionierung durch Accudenz-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Gewinnung aufgereinigter Peroxisomen folgten auf Saccharose-Dichtegradienten zusätzlich Accudenz-Gradienten. Die Peroxisomen enthaltenden Fraktionen der Saccharose-Gradienten wurden durch SDS-Gelelektrophorese, Immunoblots und Katalase-Aktivitätstests detektiert, anschließend vereinigt und 5fach mit 0,5 M Sorbitol in Gradienten-Puffer verdünnt. Die Organellen wurden anschließend auf ein Kissen aus 2 M Saccharose in Gradienten-Puffer zentrifugiert (Sorvall, HB6, 13.000 rpm, 45 Min., 4°C). Die so erhaltenen Organellensedimente wurden in Aufschluss-Puffer resuspendiert und auf kontinuierliche 24 ml 20-40%-ige (w/v) Accudenz-Gradienten mit inversem 4,25-8,55%-igem (w/v) Saccharose-Gradienten auf Kissen aus jeweils 1,5 ml Purdenz und 76,5% (w/v) Saccharose aufgetragen. Die Gradienten-Zentrifugation wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. 21 Fraktionen zu je 1,5 ml wurden vom Boden des Gefäßes aus gesammelt. Nach SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting wurden die Peroxisomen enthaltenden Fraktionen wiederum vereinigt und 5fach mit 0,5 M Sorbitol (in Gradienten-Puffer) verdünnt. Die Organellen wurden anschließend auf ein Kissen aus 2 M Saccharose in Gradienten-Puffer zentrifugiert (Sorvall, HB6, 13.000 rpm, 45 Min., 4°C). Die dabei erhaltenen Organellensedimente wurden in Aufschluss-Puffer resuspendiert und erneut auf kontinuierliche 24 ml 20-40%-ige (w/v) Accudenz-Gradienten mit inversem 4,25-8,55%-igem (w/v) Saccharose-Gradienten auf Kissen aus 1,5 ml Purdenz und 76,5% (w/v) Saccharose aufgetragen. Die Gradienten-Zentrifugation und Fraktionierung wurden, wie bereits oben beschrieben, durchgeführt. Nach SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting wurden die Peroxisomen enthaltenden Fraktionen vereinigt und 5fach mit 0,5 M Sorbitol in Gradienten-Puffer verdünnt. Die Organellen wurden anschließend sedimentiert (Sorvall, SS34, 13.000 rpm, 45 Min., 4°C).

2.12 Subperoxisomale Fraktionierung

Die aufgereinigten Peroxisomen (2.11) wurden in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 1 mM PMSF für 1,5 Std. auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (Beckman, TLA100, 350.000 x g, 20 Min., 4°C), der Überstand abgenommen, das Pellet wiederum in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 1 mM PMSF aufgenommen und für eine Std. auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde auf ein Kissen aus Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM PMSF und 250 mM Saccharose aufgetragen und erneut zentrifugiert (Beckman, TLA100, 350.000 x g, 20 Min., 4°C). Das gewonnene Sediment wurde in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 0,5 M KCl für 30 Min. auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (Beckman, TLA100, 350.000 x g, 20 Min., 4°C). Das Pellet wurde wiederum in 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 0,5 M KCl aufgenommen, für 30 Min. auf Eis inkubiert, auf ein Kissen aus 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 250 mM

Saccharose aufgetragen und zentrifugiert (Beckman, TLA100, 350.000 x g, 20 Min., 4°C). Das Sediment enthielt die aufgereinigten Membranen mit integralen Membranproteinen. In den abgenommenen und aufbewahrten Überständen befanden sich die potentiellen peroxisomalen Matrix- und peripheren Membranproteine.

2.13 Protein-Biochemische Methoden

2.13.1 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Proteinfällungen wurden mit Trichloressigsäure (TCA) vorgenommen. Dazu wurde eine Proteinlösung mit 50%-iger (w/v) TCA auf eine Endkonzentration von 15% an TCA eingestellt, für mindestens 10 Min. auf Eis inkubiert und anschließend für 30 Min. bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Biofuge). Das gewonnene Proteinsediment wurde mit 0,5%-iger TCA-Lösung gewaschen, anschließend in 100-150 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 5 Min. bei 95°C erhitzt und für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

SDS-Probenpuffer

140 µl Tris-Base in 12,5% SDS
160 µl 50% Glycerin
90 µl 1 M DTT
10 µl 0,1% Bromphenolblau (BPB)

2.13.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (142), verwendet. Die Elektrophorese eines Gels (Dimension: 8 cm x 10 cm x 0,075 cm) mit einer Polyacrylamidkonzentration des Trenngels von 7,5-15% erfolgte in einer Mini-PROTEAN® II-Zelle (BioRad Laboratories GmbH, München, D) für ca. 1 Std. bei konstanter Stromstärke von 25 mA.

5x Laufpuffer (PAGE)

1,9 M Glycin
0,25 M Tris
0,5% (w/v) SDS

Als Molekulargewichts-Standard wurde der "Molecular Weight Low Range Standard" (BioRad) benutzt. Der Marker enthält Proteine mit den Molekulargewichten 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 21 kDa und 14,5 kDa.

2.13.3 Western Blotting und Immundetektion

Der Transfer der mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Porengröße: 0,45 µm) erfolgte in einer Mini-Trans-Blot®-Zelle (BioRad Laboratories GmbH, München, D) nach Angaben des Herstellers bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA für 1 Std.. Zur Überprüfung des Proteintransfers erfolgte vor der Immundetektion eine kurze Amidoschwarz-Färbung der Membran. Um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran anschließend für 1 Std. in Waschpuffer mit 5% (w/v) Magermilch inkubiert. Die darauffolgende Immundetektion erfolgte mittels eines entsprechenden Antikörpers und anschließend mit Hilfe von Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörpern (anti-Kaninchen-IgG oder anti-Maus-IgG, je 1:10.000) unter Verwendung des ECL-Western-Blotting-Detektionssystems der Firma Amersham-Pharmacia (Braunschweig, D). Die Detektion der Lichtemission erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham-Pharmacia, Braunschweig, D). Zur Entwicklung des Filmes wurde eine SRX 101A-Anlage der Fa. Konica (Hohenbrunn, D) verwendet.

Nach dem Entfernen des ersten und zweiten Antikörpers ("Strippen") konnte die Membran erneut genutzt werden. Dazu wurde die Membran in "Strip-Puffer" für 45 Min. bei 60°C schüttelnd inkubiert, zwei Mal in H₂O gewaschen und anschließend drei Mal für 10 Min. mit Waschpuffer gewaschen. Nach 45 minütigem Blocken in 5%-iger (w/v) Magermilch in Waschpuffer konnte die Membran erneut mit einem Antikörper inkubiert werden.

Blotpuffer, pH 9,0

20 mM Tris
150 mM Glycin
0,05% (w/v) SDS
20% (v/v) Methanol

Waschpuffer

20 x PBS
10% (w/v) SDS
20% (v/v) Triton-X-100

Amido-Schwarz-Färbelösung

0,1% (w/v) Amidoschwarz
45% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Strip-Puffer

62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8
100 mM β-Mercaptoethanol
2% (w/v) SDS

2.13.4 Proteinfärbung

Zur Färbung von Proteinen in SDS-Gelen wurde eine gebrauchsfertige kolloidale Coomassie-Färbelösung (Novex, Invitrogen, Groningen, NL) nach Herstellerangaben verwendet. Die Nachweisgrenze für diese Färbemethode liegt dann bei etwa 30 ng Protein.

2.14 Massenspektrometrische Methoden

MALDI-MS, ESI-MS and nano-LC-MS wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. E. Meyer, Proteinstrukturlabor, Institut für Physiologische Chemie, Ruhr-Universität Bochum, wie bei Immler *et al.* (115) bzw. Schäfer (205) beschrieben, durchgeführt.

2.14.1 Analyse der "Massenfingerprints"

Datenbanksuchen wurden unter Verwendung des Programms ProFound (1) durchgeführt. Für die Suche wurde die aktuelle NCBI-Proteindatenbank (113) genutzt. Dabei wurden die eingegebenen Massen mit den Massen einer Peptidatenbank der NCBI verglichen. Das Programm bietet die Möglichkeit, verschiedene Suchparameter, wie die Spezies, aus der das Protein stammt, das Molekulargewicht und den isoelektrischen Punkt des Proteins, sowie die für die Spaltung des Proteins benutzte Protease und mögliche Modifizierungen, einzustellen. Neben der Suche nach einem einzelnen Protein, kann auch nach einer binären Mischung gesucht werden. Zusätzlich kann die Anzahl der überlesenen Schnittstellen, die Fehlertoleranz der Peptidmassen und der Massentyp definiert werden (Abb. 2.1).

ProFound - Peptide Mapping [Short Form] Version 4.10.5
The Rockefeller University Edition

General

Sample ID:

Database:

Taxonomic Category:

Search for:

Protein Mass: - kDa

Protein pI: -

Report Top: Candidates

Questions? Please write to [ProFound](#)
What's new [about ProFound?](#)

Digestion

Allow maximum: missed cleavages

Enzyme:

For user-defined cleavage, please click [here](#).

Modifications

Complete Modification(s):
 4-vinyl-pyridine (Cys)
 Acrylamide (Cys)
 Iodoacetamide (Cys)
 Iodoacetic acid (Cys)

Partial Modification: Methionine oxidation

For more partial modifications, please click [here](#).

Masses

Average Masses:

Monoisotopic Masses:

Mass tolerance for average data: +/-

Mass tolerance for monoisotopic data: +/-

Tolerance unit: Da % ppm

Charge state: M MH+

Abb. 2.1: Startseite zur ProFound-Suche

Als Ergebnis der Datenbanksuche erhält man eine Auflistung der Proteine, deren Peptidmassen am besten mit den gemessenen Daten übereinstimmen. Die Liste (Abb.2.2) enthält neben den zugeordneten Werten den Namen des identifizierten Proteins, die ermittelte Sequenzabdeckung in Prozent, den isoelektrischen Punkt (pI) und die Proteinmasse (kDa). Ein signifikanter Treffer liegt dann vor, wenn die Wahrscheinlichkeit des zweiten Treffers um den Faktor 100 kleiner ist als der erste Treffer und der Est'd Z-Wert über 1,65 liegt.

In der Detailansicht (Abb. 2.3) kann die Anzahl der übereinstimmenden Peptidmassen, sowie die prozentuale Abdeckung der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins entnommen werden. Es können außerdem die zugeordneten Massenpeaks und die zugeordneten Aminosäurereste ("Residue Number") in Diagrammform dargestellt werden (fehlt in dieser Abbildung). Das Fehlerdiagramm gibt die Abweichung der einzelnen Peptidmassen von den theoretisch ermittelten Massen an. Im unteren Teil des Fensters ist die Zuordnung der Peptide zu den jeweiligen Massen zu finden. Es wird darüber hinaus unter anderem die Massenabweichung und die Anzahl der übersprungenen Schnittstellen angegeben.

ProFound - Search Result Summary Version 4.10.5
The Rockefeller University Edition

Protein Candidates for search 80027703-092c-56601-0a [9758 sequences searched]

Rank	Probability	E-10 Z	Protein information and Sequence Analysis Tools (I)	%	PI	kDa	
1	1.0e+000	2.32	F g6324212e4nNP_014282.1 (NC_001146) carbon-catabolite sensitive malate synthase, Msl1p [Saccharomyces cerevisiae]	88	6.7	63.20	⊗
2	3.1e-022	-	F g6322514e4nNP_012339.1 (NC_001142) Hypothetical ORF, Yp054wp [Saccharomyces cerevisiae]	15	8.5	58.00	⊗
+3	8.8e-024	-	F g1192344e4p2132wMAS2 YEAST MALATE SYNTHASE 2, CLX33923.MAL	10	6.0	63.21	⊗
+4	2.3e-024	-	F g6325211e4p07300K6.Y1 YEAST LOW-SPECIFICITY THREONINE ALDOLASE (TA)	18	5.9	43.28	⊗
+5	2.9e-025	-	F g6323810e4nNP_013091.1 (NC_001147) Required for mismatch repair in mitosis and meiosis, low levels of postmeiotic segregation, and high spore viability, Mhl1p [Saccharomyces cerevisiae]	8	6.5	57.68	⊗
6	2.3e-025	-	F g6320533e4nNP_010613.1 (NC_001136) Hypothetical ORF, Yd0326ep [Saccharomyces cerevisiae]	4	7.0	160.99	⊗
+7	2.2e-025	-	F g63219711e4nNP_012047.1 (NC_001148) Hypothetical ORF, Yha177wp [Saccharomyces cerevisiae]	11	9.6	52.39	⊗
+8	2.2e-025	-	F g14627173e4nNP_012514.2 (NC_001142) shows synthetic fitness defect with heat mutants and associates with the Beo1p-Vsp1p-Myo3/3p complex, Rbel1p [Saccharomyces cerevisiae]	7	5.2	128.28	⊗
+9	1.5e-025	-	F g6323413e4nNP_013487.1 (NC_001146) Protein involved in recombination repair, homologous to 3. pombe rad51, Rho15p [Saccharomyces cerevisiae]	6	7.3	120.77	⊗
10	1.3e-025	-	F g6322774e4nNP_012442.1 (NC_001142) tRNA ligase, Trl1p [Saccharomyces cerevisiae]	8	8.4	96.81	⊗

Abb. 2.2: Zusammenfassung des ProFound-Suchergebnisses.

ProFound - Search Result Details Version 4.10.5
The Rockefeller University Edition

Details for rank 1 candidate in search 80027703-092c-56601-0a

[g6324212e4nNP_014282.1](#) (NC_001146) carbon-catabolite sensitive malate synthase, Msl1p [Saccharomyces cerevisiae]

[g4002264e4p209520MASY](#) YEAST Malate synthase 1, glyoxysomal

[g203194e4pE26643](#) malate synthase (EC 4.1.3.2), yeast [Saccharomyces cerevisiae]

[g29649e4pCAA4570.1](#) (G264407) malate synthase [Saccharomyces cerevisiae]

[g118394e4pCAA9390.1](#) (Z69382) Malate synthase [Saccharomyces cerevisiae]

[g1302043e4pCAA95997.1](#) (Z71392) ORF YNL117w [Saccharomyces cerevisiae]

Sample ID : p0 (Pass:0)

Measured peptides : 18

Matched peptides : 17

Min. sequence coverage: 38%

Measured	Avq/	Computed	Error	ResID	Missed		
Mass (H)	Mass	Mass	(Da)	Start	To	End	Peptide sequence
936.532	M	936.506	0.026	519	525	0	YFLPRTD
983.562	M	983.511	0.051	219	226	0	QVYFYLK
1069.652	M	1069.576	0.076	100	109	0	STETGPPLE
1104.882	M	1104.820	0.063	181	189	0	WUIDVDFR
1171.602	M	1171.591	0.091	200	296	0	WVYFSTIK
1232.762	M	1232.614	0.148	151	160	1	WUIDVDFR
1250.732	M	1250.665	0.067	519	520	1	YFLPRTGSH
1324.902	M	1324.790	0.112	35	45	0	DALEFVLLME
1467.942	M	1467.785	0.157	298	309	1	LSDPNNILLR
1731.022	M	1730.800	0.222	310	324	0	WVYTFPPFDATYK
1747.212	M	1746.795	0.417	310	324	0	WVYTFPPFDATYK
							(1) * 98%
1841.262	M	1840.984	0.278	83	98	0	NDPTWQDILACLTR
2005.712	M	2005.029	0.283	529	545	0	FSEPLTLLVDIVSTK
2176.362	M	2176.095	0.267	64	82	1	KLDSCEVHLDPLRATNID

Abb. 2.3: Detailansicht des ProFound-Suchergebnisses.

2.15 Elektrophysiologische Messungen

Elektrophysiologische Messungen an Membranen (Lipid-Bilayern) wurden unter Anleitung von Dr. S. Reumann (Universität Göttingen) in der AG von Prof. Dr. R. Benz am Theodor-Boverie-Biozentrum (Universität Würzburg) nach Angaben des F1-Praktikumsskripts Biotechnologie „Proteinaufreinigung und Bilayer“, 1999 (Universität Würzburg) durchgeführt.

2.16 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden molekularbiologische Methoden nach Standardprotokollen (204) durchgeführt.

2.16.1 Anzucht von *Escherichia coli* zur DNA-Isolierung

Der *E. coli* Stamm DH5 α wurde in LB-Vollmedium mit Ampicilin (100 μ g/ml) in Reagenzgläsern (Kulturvolumen: 1/3 des Gefäßvolumens) auf einem Rundschüttler bei 37°C kultiviert. Sowohl die Anzucht in Flüssigkulturen als auch auf Festagarplatten erfolgte über Nacht. Zur Herstellung von Festagarplatten wurde 2% (w/v) Select Agar zugefügt.

LB-Medium

1% (w/v) Select Pepton

0,5% (w/v) NaCl

0,5% (w/v) Select Hefeextrakt

1 mM NaOH

2.16.2 Präparation CaCl₂-kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Die Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach Hanahan (94). Hierzu wurde eine Übernachtskultur des *E. coli* Stammes DH5 α in SOB Medium angesetzt. Die Vorkultur wurde in SOB Medium auf eine O.D.₆₀₀ von 0,2 verdünnt. Danach fand ein Inkubationsschritt bei 37°C statt, bis die Zellen eine O.D.₆₀₀ von 0,6 erreicht hatten. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C. Nach 10 Min. Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 3500 rpm sedimentiert und anschließend in 5 ml TB-Puffer resuspendiert und sedimentiert. Das Sediment wurde in 13,5 ml TB-Puffer und 1,5 ml DMSO (Zugabe tropfenweise, unter Schwenken) aufgenommen, für 10 Min. auf Eis inkubiert und in 200 μ l Portionen schockgefroren. Die Zellen wurden danach bei -80°C gelagert.

SOB Medium, pH 7,0

2% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

20 mM MgCl₂

TB Puffer, pH 6,7

10 mM Pipes

5 mM CaCl₂

250 mM KCl

55 mM MnCl₂

2.16.3 Transformation von *Escherichia coli*

Die zu transformierende DNA wurde zu den CaCl₂-kompetenten *E. coli* Zellen (DH5 α) gegeben und für eine halbe Std. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Die Zellen wurden in 500 μ l LB-Medium + 10 mM Glukose aufgenommen, für 60 Min. bei 37°C inkubiert und danach auf Selektivagarplatten (LB + Ampicilin) ausplattiert. Um eine blau/weiß Selektion durchführen zu können, wurde den Platten je 20 μ l 0,1 M IPTG und 1% X-Gal (in DMF) zugesetzt. Die Inkubation fand über Nacht bei 37°C statt.

2.16.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte modifiziert nach Birnboim und Doly (17). Dazu wurden Einzelkolonien von einer LB/Amp Selektiv-Agarplatte in 3 ml LB/Amp (100 μ g/ml) Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1,5 ml dieser Bakterienkultur wurden mit Hilfe einer Heraeus-Biofuge sedimentiert. Das Sediment wurde zunächst in 100 μ l Lösung I resuspendiert. Nacheinander wurden 200 μ l Lösung II und 150 μ l Lösung III zugesetzt. Anschließend erfolgte umgehend eine Zentrifugation bei 13.000 rpm in der Heraeus-Tischzentrifuge für 5 Min bei 4°C. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5fachem Volumen 96%-igem Ethanol zum abgenommenen Überstand. Die gefällte DNA wurde für 10 Min. bei 13.000 rpm in der Heraeus-Tischzentrifuge sedimentiert, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen unter Vakuum in 50 μ l TE aufgenommen.

Lösung I

50 mM Glukose
10 mM EDTA
10 mM Tris/HCl, pH 7,9

Lösung II

1 M NaOH
20% (w/v) SDS

Lösung III, pH 4,8

50 mM Kaliumacetat
11% (v/v) Eisessig

Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA wurde ein Plasmid-Minipräparations-Kit (peq-lab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) verwendet, die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.16.5 DNA-Restriktion

Die Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte unter den von den Herstellern (Eurogentec, NEB) angegebenen Bedingungen.

2.16.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurden horizontale Agarose-Gele mit Konzentrationen zwischen 0,8% und 2% (w/v) an Agarose verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer gelöst und mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt. Die zu analysierende DNA

wurde mit 1/10 Volumen 10fach konzentriertem DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese fand bei 100 V für 1 Std. bei Raumtemperatur statt.

TBE-Puffer

90 mM Tris/Base
90 mM Borsäure
2 mM EDTA, pH 8,0

10x DNA Probenpuffer

0,5% (w/v) Bromphenolblau
0,1 M EDTA
50% (w/v) Glycerin

2.16.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das Qiaex II Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht ausgeschnitten. Die weiteren Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Diese Methode nutzt die Adhäsion der DNA an eine spezielle Silica-Matrix aus. Die Elution erfolgte mit 30 µl TE-Puffer. Die Eluate wurden bei -20°C gelagert.

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA

2.16.8 Alkalische Phosphatase-Behandlung

Vektor-DNA wurde nach der Restriktion für 20 Min. bei Raumtemperatur mit alkalischer Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP) behandelt. Dabei wurden die 5'-Phosphat-Reste beseitigt, um die Selbstligation des linearisierten Vektors zu vermeiden.

2.16.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligationsansätze enthielten in einem Endvolumen von 20 µl 100 ng Vektor-DNA, die 3-5fache Menge an einzuklonierendem Fragment, Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase. Die Ligation erfolgte für 2 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C.

2.16.10 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	ORF
RE91	5'-GCTCTAGAGAATTCATGACCACGACCGCTAC-3'	YEL020C
RE65	5'-GCTCTAGAATGACCACGACCGCTAC-3'	
RE66	5'-GGGGTACCGTCGACCTATAAACGCGGTTTATTCTG-3'	
RE67	5'-GGGGTACCGTCGACTAAACGCGGTTTATTCTGCCAG-3'	
RE68	5'-GCTCTAGAATGTTTAGTAACAGACTACCAC-3'	YAL032C
RE69	5'-GGGGTACCGTCGACCTAGGCGCCATAGTTATC-3'	
RE70	5'-GGGGTACCGTCGACGCGCCATAGTTATCCG-3'	
RE92	5'-GCTCTAGAGAATTCATGTTTAGTAACAGACTACCAC-3'	

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	ORF
RE445	5'-CGGGATCCATGACAATTTCTAATTTGTTAAAGC-3'	YBL015W
RE446	5'-CCATCGATCTAGTCAACTGGTTCCC-3'	
RE447	5'-CCATCGATGTCAACTGGTTCCCAGC-3'	
RE74	5'-GCTCTAGAATGGAACAGAACAGGTTCAAG-3'	YOR084W
RE75	5'-CGGAATTCCTTACAGTTTTTGTGTTAGTCGTTTTAAC-3'	
RE76	5'-CGGAATTCAGTTTTTGTGTTAGTCGTTTTAAC-3'	
RE94	5'-GCTCTAGAGGATCCATGGAACAGAACAGGTTCAAG-3'	
RE95	5'-GCTCTAGAGAATTCATGAAAAATGATAATAAAGC-3'	YDR058C
RE96	5'-CCATCGATTTAAAATCCTTTTTCTTGC-3'	
RE97	5'-CCATCGATAAATCCTTTTTCTTGC-3'	
RE121	5'-GCTCTAGAGAATTCATATGCGTTTAAATCAGTAAAGTTTTG-3'	YHR199C
RE122	5'-GGGGTACCGTCGACCTAAGATAGAGAGACGAGTG-3'	
RE123	5'-GGGTACCGTCGACAGATAGAGAGACGAGTGC-3'	
RE127	5'-GCTCTAGAGAATTCATATGAGAGATGAAAAAATTTACTC-3'	YJL031C
RE128	5'-GGGGTACCATCGATTCACTTATGCTGCTCCAG-3'	
RE129	5'-GGGTACCATCGATCTTATGCTGCTCCAGG-3'	
RE124	5'-GCTCTAGAGAATTCATATGAAGACTTTAATTGTTGTTG-3'	YGL037C
RE200	5'-CCATCGATGTTGAAGAAGTATTATTCAGCTC-3'	
RE183	5'-GGGGTACCATCGATTTTATCCACGACATGGATG-3'	
RE184	5'-GCTCTAGAGGATCCATGTACTTCCCCTTTTTAG-3'	YKL140W
RE185	5'-GGGGTACCAAGCTTTCATTCTTTATTTAGAGCATC-3'	
RE186	5'-GGGGTACCAAGCTTTTCTTTATTTAGAGCATCCAG-3'	
RE265	5'-GGATCCATGTCCTCTGCAATTGAC-3'	YOL040C
RE266	5'-AAGCTTCTATTTCTTGCTCTTTTCAGC-3'	
RE267	5'-AAGCTTTTTCTTGCTCTTTTCAGCTTG-3'	
RE268	5'-GGATCCATGATAAAGTGCCATGAAGTG-3'	YOR228C
RE269	5'-AAGCTTCTAATTCACGTGCAACAG-3'	
RE270	5'-AAGCTTATTCACGTGCAACAGCAAC-3'	
RE339	5'-GGATCCATGTCAGAAAGTTTCCAAATG-3'	YBR177C
RE340	5'-AAGCTTTCATACGACTAATTCATCAAAC-3'	
RE341	5'-AAGCTTACGACTAATTCATCAAAC-3'	
RE342	5'-GAATTCATGGCCAAAGATTTGAACG-3'	YMR275C
RE343	5'-GTCGACTTATTTTGTCACTTGCCTAAC-3'	
RE344	5'-GTCGACTTTTGTCACTTGCCTAACAG-3'	
RE348	5'-CCC GGATGGTTGCTCAATATACCG-3'	YOR317W
RE349	5'-GTCGACTTAAGACGAACTATAAACGG-3'	
RE350	5'-GTCGACAGACGAACTATAAACGG-3'	
RE351	5'-GAATTCATGTCGCCCTCTGCCG-3'	YAL054C
RE352	5'-AAGCTTTTACAATTTGACCGAATCAATTAG-3'	
RE353	5'-AAGCTTCAACTTGACCGAATCAATTAG-3'	
RE354	5'-GGATCCATGACTCAGCAAGAATAC-3'	YCR091W
RE355	5'-ATCGATTTATAGTTTCAGGTATGATGTC-3'	
RE356	5'-ATCGATTAGTTTCAGGTATGATGTC-3'	
RE357	5'-GAATTCATGACAACCAGCATACTC-3'	YKL091C
RE358	5'-AAGCTTTTAGCTGGTAACAGTAAATTTAC-3'	
RE359	5'-AAGCTTGCTGGTAACAGTAAATTTAC-3'	
RE360	5'-GGATCCATGCCGATCAAGAGATTAG-3'	YGL184C
RE361	5'-GAATTCCTACAATTTGAACTCTTAATATTC-3'	
RE362	5'-GAATTCGAATTTGAACTCTTAATATTC-3'	
RE363	5'-GGATCCATGTTAAGAGCTCAAAGC-3'	YDL077C
RE364	5'-GTCGACTTACTTATTATTTAGCTCATTTATAAC-3'	
RE365	5'-GTCGACCTTATTATTTAGCTCATTTATAAC-3'	
RE366	5'-GGATCCATGACATCAAATAATTCGTTATTG-3'	YPR003C
RE367	5'-GAATTCCTACTAGACTTGAATTAATAAAG-3'	
RE368	5'-GAATTCCTACTAGACTTGAATTAATAAAG-3'	
RE369	5'-GGATCCATGGCTGCCGTCACATTAC-3'	YIR034C
RE370	5'-GAATTCCTACAATCTTGAAGATCTTTTAAAC-3'	
RE371	5'-GAATTCGAATCTTGAAGATCTTTTAAAC-3'	
RE372	5'-GGATCCATGTCTAGTTCAATATTTGGC-3'	YNR021W
RE373	5'-AAGCTTTTACTGAAATCTTGTCTTTG-3'	
RE374	5'-AAGCTTCTGAAATCTTGTCTTTG-3'	
RE375	5'-GGATCCATGTCTCAAAAAAAGAAGGC-3'	YJR095W
RE376	5'-AAGCTTCTACTTTTATGGCTTTGG-3'	
RE377	5'-AAGCTTCTACTTTTATGGCTTTGGTG-3'	

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	ORF
RE450	5'-CGGGATCCATGGCCGCACTCAATAAATATATTC-3'	YMR233W
RE451	5'-CGGAATTCTCAACCGCTTAAATTGGG-3'	
RE452	5'-CGGAATTCACCGCTTAAATTGGGAAG-3'	
RE453	5'-CGGGATCCATGCACAGAACTTACTC-3'	YGR086C
RE454	5'-CGGAATTCTTAAGCTGTTGTTTGTGG-3'	
RE455	5'-CGGAATTCAGCTGTTGTTTGTGG-3'	
RE456	5'-CGGGATCCATGTCCAAGAGCAAAAC-3'	YDR502C
RE457	5'-CGGAATTCTTAAAATTCCAATTTCTTTGG-3'	
RE458	5'-CGGAATTCAAAATTCATTTCTTTGG-3'	
RE459	5'-CGGGATCCATGTCAAAGATAGATTCAG-3'	YGL001C
RE460	5'-CGGAATTCTTACAAACCTTCGTCCATC-3'	
RE461	5'-CGGAATTCAAAACCTTCGTCCATCC-3'	
RE463	5'-CGGGATCCATGGGTAAAGAGAAGTCTC-3'	YBR118W
RE464	5'-GCGTCGACTTATTTCTTAGCAGCCTTTTG-3'	
RE465	5'-GCGTCGACTTCTTAGCAGCCTTTTG-3'	
RE466	5'-CGGGATCCATGGGTAAAGAGAAGTC-3'	YPR080C
RE467	5'-GCGTCGACTTATTTCTTAGCAGCCTTTTG-3'	
RE468	5'-GCGTCGACTTCTTAGCAGCCTTTTG-3'	
RE469	5'-CGGGATCCATGAAGTACATGGTAGTC-3'	YHR064C
RE470	5'-GCGTCGACCTATAATTCACCTTTACAG-3'	
RE471	5'-GCGTCGACTAATTCACCTTTACAGc-3'	
RE510	5'-CGGGATCCATGTTTTATCTAAGTGACATC-3'	YGL121C
RE511	5'-CGGAATTCCTAGTGATAGAACCTT-3'	
RE512	5'-CGGAATTCGTAGTGATAGAACCTTC-3'	
RE513	5'-CGGGATCCATGGTTTCGAAGAAAATAC-3'	YCL056C
RE514	5'-CGGAATTCTTATACAATTATTCTACAAAG-3'	
RE515	5'-CGGAATTCTACAATTATTCTACAAAGTG-3'	
RE516	5'-CGGGATCCATGACCAAGTAGATTTTTGG-3'	YIL065C
RE517	5'-CGGAATTCTTACCTTCTCTTTCTTAAAG-3'	
RE518	5'-CGGAATTCCTTCTCTTGTCTTAAAG-3'	

Tab. 2.6: Liste der Oligonukleotide zur Herstellung von GFP-Fusionen.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	Gen/Funktion
RE132	5'-AGTGGTGAGTAACCATGCATC-3'	KanMX-antisense
RE133	5'-GATACCAGGATCTTGCCATCC-3'	KanMX-sense
RE136	5'-GAATAAAGCGTCTTGTTTTAAAGGAGGAAAAGCATAAAAA AATGCAGCTGAAGCTTCGTACGCT-3'	YKL140W/sense
RE137	5'-AAAAGAGTATTCTATAAACAGTTCTTACGAATAGAACA CTTAATAGGCCACTAGTGATCTG-3'	YKL140W/antisense
RE142	5'-CGTTGCCATTACGCCACG-3'	sense-Test
RE143	5'-CTGGTGTTTTCATCGAACATG-3'	antisense-Test
RE138	5'-ACAACACATTTCTTTTTTCTTTTTCACATATTGCACTAAAA TGCAGCTGAAGCTTCGTACGCT-3'	YBL015W/sense
RE139	5'-TGTTAAATACTCATCTCTCGGTTTGCGCACAAACTAGTCA ACATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	YBL015W/antisense
RE144	5'-TGGACGGTAAGCGCTTGC-3'	sense-Test
RE145	5'-CATATAAATATACAGTACTACCTGTG-3'	antisense-Test
RE177	5'-TGAATACATGTCTACTTAGCAGAAGGCCAGGTATATGGAAC ATGCAGCTGAAGCTTCGTACGCT-3'	YHR199C/sense
RE178	5'-AGCGTATGTATTATGTAATTGTATGTAGAAGTCGGCGAAAG TGTCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	YHR199C/antisense
RE179	5'-CAAAGGAACATAATCAGAG-3'	sense-Test
RE180	5'-CTATCGCGGTTGTAACGC-3'	antisense-Test
RE248	5'-TTGAACAAGGATTTCTATCATGCTACCCAGCTGCCTTTGAT GTGCAGCTGAAGCTTCGTACGCT-3'	POR1/sense
RE249	5'-ACGGTCGAAGGACAAAGACCAACCTAGCTTGTGAACAGGTT CAGAATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	POR1/antisense
RE211	5'-TGCTTTTTGCCGGCTGCG-3'	sense-Test
RE212	5'-GGCTGCGGAAGGAAGTGA-3'	antisense-Test
RE213	5'-GAAGGAATTGCATGAAGAGGAAAGTGTAGAAATTACCTAC GATGCAGCTGAAGCTTCGTACGCT-3'	POR2/sense
RE214	5'-ACAAATCCTTATTTAGTAAATTTATAAGAAAATAAAATCT CTCAATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	POR2/antisense
RE215	5'-GCGACTGAGCTTCTGCATT-3'	sense-Test

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	Gen/Funktion
RE216	5'-CTATCCTTCGGTCCTTTGTC-3'	antisense-Test
RE294	5'-TCTACTACTTCAAAGACTTCATCAAGTAATAGTATAATCAAT ATGCAGCTGAAGCTTCGTACGCT-3'	PEX11/sense
RE295	5'-AAGCGGAGAATAGCCAAATAAAAAAAAAAAGATGAAAAGAA AGCTAATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'	PEX11/antisense
RE296	5'-ATGCTTGCCCTTCTATTG-3'	sense-Test
RE297	5'-GGTAACAGAATAAGCAG-3'	antisense-Test

Tab. 2.7: Liste der zur Deletion und zur Deletionskontrolle eingesetzten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	Gen/Funktion
RE443	5'-GGTGTGTCACATCTATCCTTGGTATGCAAGACATGTGGAAAG CTACATCCATGAAAAGAGAAG-3'	PEX11TAP
RE444	5'-AAATAAATTATAAAGAAGGGTCGAATCAAACATAAGCGGAGA ATAGCCTACGACTCACTATAGGG-3'	PEX11TAP
RE175	5'-CCCGAGCTCGTCTGTGATACACTGGTA-3'	PEX11
RE188	5'-CTGCAGTTAATTCGCGTCTACTTTCGG-3'	TAP-Tag

Tab. 2.8: Liste der Oligonukleotide zur TAP-Tag-Markierung und Überprüfung.

Zur Durchführung der PCR wurde Plasmid-DNA oder genomische DNA aus *S. cerevisiae* als Matrize eingesetzt, die Reaktion erfolgte in einem T3Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen, D).

Reaktion	Temperatur	Zeit
Denaturierung a	94°C	5 Min
Denaturierung b	94°C	1 Min
Hybridisierung	Primer-abhängig	1 Min
Amplifikation a	72°C	größenabhängig
Amplifikation b	72°C	10 Min
Ende	4°C	unendlich

Die 20-50 µl PCR-Ansätze wurden durch Zugabe von 1/10 Vol. 4 M Na-Acetat und 2,5fachem Vol. an 100-%igem Ethanol präzipitiert. Das Sediment wurde in 20 µl TE-Puffer resuspendiert. Das PCR-Amplifikationsprodukt konnte zur Restriktion und nachfolgenden Klonierung eingesetzt werden. Alternativ wurde der gesamte Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung aus dem Agarose-Gel gereinigt.

2.16.11 Isolierung von genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Eine 10 ml Hefekultur wurde über Nacht in YPD-Medium angezogen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (3.000 rpm, Heraeus, Biofuge) und in H₂O gewaschen. Das Zellsediment wurde dann in 200 µl DNA-Aufschluss-Puffer resuspendiert, mit ca. 0,3 g Glasperlen und 200 µl 25:24:1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und für 3 x 1 Min. auf dem Wirbelmischer (Vortex, Bender & Hobein, Zürich, CH) gemischt. Anschließend wurden mit 200 µl TE-Puffer erneut gemischt und für 5 Min. bei 13.000 rpm (Heraeus, Biofuge) zentrifugiert. Die genomische DNA enthaltende wässrige (obere) Phase wurde abgenommen, 1 ml Ethanol zugegeben, gemischt und für 3 Min. erneut zentrifugiert (s.o.). Das DNA-Sediment wurde vakuumgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

DNA-Aufschluss-Puffer

100 mM NaCl
 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA, pH 8,0
 2% (v/v) Triton X-100
 1% (w/v) SDS

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 7,5
 1 mM EDTA

2.16.12 Northern Blot-Analyse

Formaldehyd-Gelelektrophorese, Blotting und Hybridisierung wurden wie in Sambrook *et al.* (204) beschrieben von H. Rottensteiner am Biozentrum Wien (Österreich) durchgeführt. *POX1* und *ACT1* dienten als Kontrollen im Experiment (Rottensteiner *et al.*, 1996). Um die Probe des *YOR084W* zu markieren, wurde ein 700 Bp Fragment (*XbaI/EcoRI*) aus dem SK⁺-Konstrukt mit *YOR084W* ausgeschnitten und eine "Random-primed labelling"-Reaktion (Promega) durchgeführt.

2.16.13 Erstellung kompetenter Hefezellen und Transformation in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation erfolgte nach der von Güldener *et al.* beschriebenen modifizierten Lithiumacetat-Methode (89). 50 ml YPD-Medium wurden mit einer 10 ml üN-Kultur des entsprechenden Stammes so beimpft, dass sich eine O.D.₆₀₀ von 0,2 ergab. Die Kultur wurde bei 30°C bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,7-1,0 schüttelnd inkubiert und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (3.000 rpm, 5 Min., 4°C, Heraeus Minifuge GL) geerntet. Nach einem Waschschrift in H₂O wurde das Zellsediment in 1,5 ml TE-LiAc-Lsg. resuspendiert, erneut zentrifugiert (10.000 rpm, 1 Min., Heraeus Biofuge) und schließlich in 1 ml TE-LiAc-Lsg. aufgenommen.

Für die Hefetransformation wurde zunächst DNA aus Heringssperma (2 mg/ml) durch zehnmütiges Kochen denaturiert und anschließend auf Eis aufbewahrt. 25 µl dieser DNA-Lösung wurden mit Plasmid-DNA vermischt, ein Aliquot an kompetenten Hefezellen und 300 µl PEG-TE-LiAc-Lsg. hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde für 30 Min. bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden sedimentiert (13.000 rpm, Heraeus Biofuge), in 50 µl TE aufgenommen und auf entsprechenden Selektiv-Agarplatten ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

10 x TE

100 mM Tris-HCl, pH 7,5
 10 mM EDTA

TE-LiAc-Lsg.

10% (v/v) 10 x TE
 10% (v/v) 10 x LiAc

10 x LiAc

1 M Li-Acetat, pH 7,5

PEG-TE-LiAc-Lsg.

10% (v/v) 10 x TE

10% (v/v) 10 x LiAc

80% 50% -ige (w/v) PEG-Lsg. (MW 3350)

2.16.14 Homologe Rekombination

Um Plasmide homolog in das Hefegenom zu integrieren, wurde eine integrative Transformation (2.16.13) nach Güldener *et al.* (89) vorgenommen. Dazu wurde das Plasmid zunächst an einer einmaligen Schnittstelle im Hefegenom durch eine Restriktionsendonuklease linearisiert. Zur Kontrolle der vollständigen Restriktion wurden 5 µl des Restriktionsansatzes auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Der restliche Ansatz wurde für die Hefetransformation (2.16.13) eingesetzt.

2.16.15 Markierung des Pex11p mit TAP (Tandem Affinity purification)-Tag

Die Markierung des Pex11p mit dem TAP-Tag erfolgt nach der in Rigaut *et al.* (199) beschriebenen Methode. Der TAP-Tag setzt sich aus einer IgG-bindenden Einheit des Protein A aus *Staphylococcus aureus* (ProtA) und dem Calmodulin-bindenden Peptid (CBP) zusammen. Beide Tags sind durch eine TEV-Protease-Schnittstelle miteinander verbunden (Abb. 2.4). Der TAP-Tag erlaubt dadurch die effiziente Reinigung des Proteins unter nativen Bedingungen. Zur Kopplung wurde mittels präparativer PCR (2.16.10) ein DNA-Fragment bestehend aus *PEX11*-Sequenz-Abschnitten und der TAP-Tag-Kassette hergestellt. Die Integration dieses DNA-Fragments mittels homologer Rekombination in das *S. cerevisiae* Genom bindet den TAP-Tag an das 3'-Ende des *PEX11*-Gens. Für die Transformation in Zellen von *S. cerevisiae* (2.16.13) wurde der gesamte 200 µl umfassende PCR-Ansatz eingesetzt und die Transformanten zur Selektion auf SD (-ura) ausplattiert. Klone wurden mittels analytischer PCR und Western-Blotting überprüft.

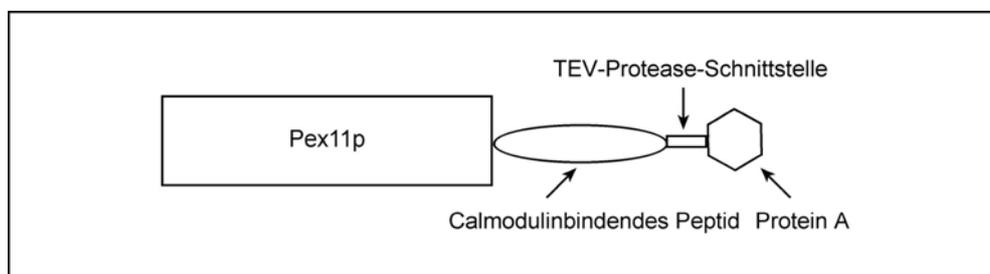


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der TAP-Tag-Markierung von Zielproteinen (Pex11p). Der zweifache Tag besteht aus einem Calmodulinbindenden Peptid und einer Protein A-Einheit, die über eine TEV-Protease-Schnittstelle miteinander verbunden sind.

2.16.16 Erzeugung von *Saccharomyces cerevisiae*-Deletionsmutanten

Zur Deletion von Hefegenen wurde ein *KANMX*-Modul nach Güldener *et al.* (89) verwendet. Dieses besteht aus einem dominanten Kanamycin-Resistenzgen aus *E. coli* (Kan^R), dessen Expression von den *TEF*-Promotor- und Terminatorsequenzen aus *Ashbya gossypii* kontrolliert wird. Dieses Expressionsmodul wird von zwei *LoxP*-Sequenzen flankiert (*loxP*-*KanMX*-*loxP*) und befindet sich auf dem pUG6-Vektor.

Zur Gendeletion wurde mittels präparativer PCR-Reaktion (2.16.10) ein PCR-Fragment hergestellt, das sich aus der *loxP*-*KanMX*-*loxP*-Sequenz, flankiert von den 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen des zu deletierenden Gens, zusammensetzte. Durch homologe Rekombinationsereignisse 5' und 3' des offenen Leserahmens des zu deletierenden Gens wurde dieses PCR-Fragment in das Hefegenom integriert. Der gesamte Leserahmen des zu deletierenden Gens wurde somit durch *loxP*-*KanMX*-*loxP* ersetzt. Für die Transformation in Zellen von *S. cerevisiae* (2.16.13) wurden 10-50 μl des 100 μl umfassenden PCR-Ansatzes eingesetzt und die Transformanten zur Selektion auf YPD-Agarplatten mit Geneticin[®] (G-418 Sulphat) ausplattiert.

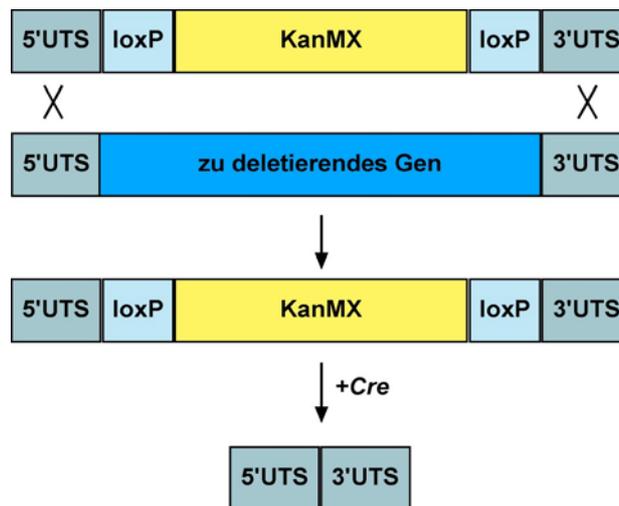


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Gendeletion durch homologe Rekombination des *KANMX*-Moduls an den Genlocus des zu deletierenden Gens und Entfernen des *KANMX*-Markers (modifiziert nach Eckert, (50)). Ein PCR-Produkt bestehend aus der *loxP*-*KanMX*-*loxP*-Kassette flankiert von Sequenzen der untranslatierten 3'- und 5'-Region (UTS) des Zielgens wird durch homologe Rekombination in das Genom der Hefe integriert. Das Hefegen wird durch *loxP*-*KanMX*-*loxP* ersetzt und diese Zellen sind in Folge resistent gegen Kanamycin (kan^R). Durch Expression der *Cre*-Rekombinase in der Zelle wird die gesamte Kassette aus der genomischen DNA geschnitten und diese religiert, so dass die Zellen des Deletionsstammes wieder sensitiv gegen Kanamycin (kan^S) sind.

Alternativ wurden *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten von der Stammsammlung EUROSCARF bezogen.

Zur Herstellung von Mehrfachmutanten wurde die loxP-KanMX-loxP Kasette unter Verwendung des pSH47-Plasmids (89) aus dem Genom isoliert. Dabei wird durch die Expression einer Cre-Rekombinase in der Zelle die Exzision des loxP-KanMX-loxP Moduls induziert. Auf diese Weise können mehrere Gene in der gleichen Zelle ohne Verlust von Markern eliminiert werden.

2.17 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Für die mikroskopischen Analysen wurde zunächst 1%-ige (w/v) Agarose (Low-melting-Agarose, Biozym, D) geschmolzen und auf ca. 40°C abgekühlt. Zellmaterial wurde mit H₂O verdünnt und zu gleichem Anteil mit der warmen Agarose vermischt, sofort auf Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgeschlossen. So konnten die lebenden Hefezellen schonend fixiert werden, ohne dass eine Beeinflussung des Fluoreszenzfarbstoffs stattfand. Die mikroskopischen Untersuchungen wurden anschließend an einem Axiophot Mikroskop (Zeiss, Jena, D) durchgeführt und mit einer Spiegelreflexkamera dokumentiert. Farb-Negative wurden mit einem Diascanner der Fa. Polaroid bearbeitet, die entsprechenden Bildausschnitte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Adobe®-Photoshop® gewählt.

2.18 Sonstige bildgebende Verfahren

Zur Abbildung der Wachstumstests von Hefen auf Agarplatten wurde eine Gel-Dokumentations-Anlage (GelDoc2000, BioRad Laboratories GmbH, München, D) eingesetzt.

