

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Stämme

3.1.1 Materialien

Substanz/Gerät	Hersteller
Taq-Polymerase, genomische DNA	Promega
Vent-Polymerase, T4-Ligase, Restriktionsenzyme	NEB
Pwo-Polymerase, Restriktionsenzyme	Eurogentec
Yeast Nitrogen Base, Agar und Yeast-Extract für Selektivmedien und YN	Difco (BN)
<i>low melting</i> Agarose	Biozym
Aminosäuren, 2.Antikörper für ECL (Anti-Rabbit IgG), ProteinA-Antikörper, Digitonin	Sigma
SDS, Ölsäure, Tween40, Tween80, DABCO	Merck
Mowiol 4-88	Calbiochem
Yeast-Extract, Agar	Gibco
Glucose, NH ₄ SO ₄ , Tris, Borsäure	ApliChem
ECL-Reagenzien, Röntgenfilm, ECL-Hyperfilm, Nitrocellulosemembranen, CNBr-aktivierte Sepharose, Höfer-Proteingel- und blotanlagen	Amersham Pharmacia
Ampicilin	GEBRU Biotechnik
Plasmid Miniprepkit I	PeQLab
Perfectprep Plasmid Mini	Eppendorf
Quiagen Plasmid Maxikit, QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Quiagen
T3-Thermocycler	Biometra
Fluoreszenzmikroskop Axiophot und Axioplan 2	Carl Zeiss
HsIgG	ICN
Polyacrylamidgelanlagen, Protein-Standards	BioRad
DTME, Bradford-Reagenz	Pierce

3.1.2 Bakterienstämme

Der folgende *E.coli* Stamm wurde verwendet:

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
DH5 α	supE lacU169(80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96	Stratagene

3.1.3 Hefestämme

In der folgenden Tabelle sind alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefestämme aus *Saccharomyces cerevisiae* aufgeführt. Die Stämme sind nach ihrem jeweils isogenischen Wildtyp geordnet. Die BY4742-Stämme stammen aus dem EUROFAN-Projekt. Die UTL-7A Stämme wurden in den Arbeitsgruppen von R. Erdmann und W.-H. Kunau¹ erstellt. Die BJ1991-Mutanten stammen aus der Arbeitsgruppe von B. Distel² und H. Tabak³. Die SEY6210-Stämme wurden uns freundlicherweise von D. J. Klionsky⁴ überlassen. Die Sekretionsmutanten wurden durch ungerichtete Mutagenese in den Arbeitsgruppen von E. Hartmann⁵ und T. Sommer⁶ (*sec61-2*, *ykf5*, *yfp338*), L. Hicke⁷ (*sec16-2*, *sec18-20*, *sec21-1*, *sec23-1*), C. Stirling⁸ (*csy126*), P. Cosson⁹ (*ret2-1*) und F. Letourneur¹⁰ (*ret3-1*) hergestellt.

Stamm	Genotyp (Stammbezeichnung EUROFAN-Projekt)
<i>sec16-2</i>	MATa <i>sec16-2 pep4::URA3 ura3-52 leu2-3,112 his4 lys2-801 bar1</i>
<i>sec18-20</i>	MATa <i>sec18-20 pep4::URA3 ura3-52 leu2-3,112 his4 bar1</i>
<i>sec21-1</i>	MATa <i>sec21-1 ura3-52 his4 leu2-3,112 lys2-801 bar1</i>
<i>sec23-1</i>	MATa <i>sec23-1 pep4::URA3 ura3-52 leu2-3,112 his4 bar1</i>
<i>ret2-1</i>	MATa <i>ret2-1 leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 lys2-801 suc2-Δ9</i>
<i>ret3-1</i>	MATa <i>ret3-1 ura3-52 leu2-3,112 his3-Δ200 trp1 suc2-Δ9</i>
<i>csy126</i>	MATα <i>sec65-1 trp1 ade2 leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200</i>
<i>sec61-2</i>	MATα <i>sec61-2 leu2-3,-112 ura3-52 ade2-3 pep4-3</i>
<i>sec61-2/Δssh1</i>	MATα <i>sec61-2 ssh1::ADE2 leu2-3,-112 ura3-52 ade2-3 pep4-3</i>
SEY6210	MATα <i>leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801</i>
<i>cvt3</i>	SEY6210 <i>cvt3-1</i>
<i>atg24</i>	SEY6210 <i>cvt13-1</i>
UTL-7A	MATa <i>ura3-52, trp1-Δ901, leu2-3,112</i>
<i>PEX3ProtA</i>	UTL-7A <i>pex3::PEX3-Tev-ProteinA-KnMx6</i>
<i>UTLΔpex3</i>	UTL-7A <i>pex3::LEU2</i>
<i>UTLΔpex19</i>	UTL-7A <i>pex19::KanMx4</i>
BY4742	MATα: <i>his3-Δ200 leu2-3,112 ura3-52</i>
<i>Δatg1</i>	BY4742 <i>atg1::KanMx4</i> (7-2:14547)
<i>Δatg2</i>	BY4742 <i>atg2::KanMx4</i> (14-2:11970)
<i>Δatg3</i>	BY4742 <i>atg3::KanMx4</i> (14-4:15382)
<i>Δatg4</i>	BY4742 <i>atg4::KanMx4</i> (14-2:11979)
<i>Δatg5</i>	BY4742 <i>atg5::KanMx4</i> (16-2:12103)
<i>Δatg6</i>	BY4742 <i>vps30::KanMx4</i> (16-2:12132)
<i>Δatg7</i>	BY4742 <i>atg7::KanMx4</i> (00-15:17090)
<i>Δatg8</i>	BY4742 <i>atg8::KanMx4</i> (2-1:13104)

(wird auf der nächsten Seite fortgesetzt)

¹Institut für Physiologische Chemie I, Ruhr-Universität Bochum

²Academical Medical Center, University Amsterdam

(von voriger Seite fortgesetzt)

Stamm	Genotyp (Stammbezeichnung EUROFAN-Projekt)
$\Delta atg9$	BY4742 <i>atg9::KanMx4</i> (4-2:13847)
$\Delta atg10$	BY4742 <i>atg10::KanMx4</i> (12-1:11530)
$\Delta atg11$	BY4742 <i>atg11::KanMx4</i> (16-4:15468)
$\Delta atg12$	BY4742 <i>atg12::KanMx4</i> (2-4:13357)
$\Delta atg13$	BY4742 <i>atg13::KanMx4</i> (16-5:15600)
$\Delta atg14$	BY4742 <i>atg14::KanMx4</i> (2-3:13267)
$\Delta atg15$	BY4742 <i>atg15::KanMx4</i> (00-1:15789)
$\Delta atg16$	BY4742 <i>atg16::KanMx4</i> (13-4:10742)
$\Delta atg17$	BY4742 <i>atg17::KanMx4</i> (00-4:16026)
$\Delta atg18$	BY4742 <i>atg18::KanMx4</i> (6-1:15700)
$\Delta atg19$	BY4742 <i>atg19::KanMx4</i> (15-5:1173)
$\Delta atg22$	BY4742 <i>atg22::KanMx4</i> (3-1:13445)
$\Delta cvt1$	BY4742 <i>prb1::KanMx4</i> (5-2:10302)
$\Delta cvt4$	BY4742 <i>vam6::KanMx4</i> (4-1:13774)
$\Delta cvt8$	BY4742 <i>vps41::KanMx4</i> (4-4:14015)
$\Delta ssh1$	BY4742 <i>ssh1::KanMx4</i> (00-1:15731)
$\Delta sbh1$	BY4742 <i>sbh1::KanMx4</i> (5-3:10228)
$\Delta sbh2$	BY4742 <i>sbh2::KanMx4</i> (5-3:10151)
$\Delta arl1$	BY4742 <i>arl1::KanMx4</i> (2-3:13304)
$\Delta arf3$	BY4742 <i>arf3::KanMx4</i> (15-1:11870)
$\Delta ste4$	BY4742 <i>ste4::KanMx4</i> (15-3:12468)
$\Delta ste14$	BY4742 <i>ste14::KanMx4</i> (4-7:14268)
$\Delta kap114$	BY4742 <i>kap114::KanMx4</i> (7-3:14608)
$\Delta yol075c$	BY4742 <i>yol075c::KanMx4</i> (15-5:11766)
$\Delta rec107$	BY4742 <i>rec107::KanMx4</i> (00-3:15956)
$\Delta yer134c$	BY4742 <i>yer134c::KanMx4</i> (00-5:16133)
$\Delta fth1$	BY4742 <i>fth1::KanMx4</i> (2-4:13347)
$\Delta ydr540c$	BY4742 <i>ydr540c::KanMx4</i> (00-2:15835)
$\Delta oxa1$	BY4742 <i>oxa1::KanMx4</i> (00-5:16151)
$\Delta pex3$	BY4742 <i>pex3::KanMx4</i> (4-6:13688)
$\Delta pex13$	BY4742 <i>pex13::KanMx4</i> (12-3:14140)
$\Delta pex15$	BY4742 <i>pex15::KanMx4</i> (15-5:11735)
BJ1991	Mata α <i>leu2-3,112 trp1-Δ901 ura3-52 prb1-1 pep4-3 gal2</i>
<i>BJΔpex3</i>	BJ1991 <i>pex3::loxP-KanMx4-loxP</i>
<i>BJΔpex19</i>	BJ1991 <i>pex19::LEU2</i>
<i>BJΔpex14</i>	BJ1991 <i>pex14::KanMx4</i>

³Section of Microbiology, University of California⁴Bijvoet Center, University Utrecht⁵Institut für Biologie, Universität zu Lübeck

3.1.4 Plasmide

Vektor	Marker	Herkunft
YCplac111	LEU2	Gietz, Sugino [42]
YEplac181	LEU2	Gietz, Sugino [42]
YIplac204	TRP1	Gietz, Sugino [42]
Mito-DsRed/pRS424	TRP1	Westermann, Neupert [161]
Mito-EGFP/pVT100	URA3	Westermann, Neupert [161]
pUG35	URA3	Niedental, Hegemann [106]
pBlueskript (SK+)		Stratagene
pBS1539	TRP1	Caspary, Seraphin [16]
YE _p 352/EGFP-PTS1	URA3	Lametschwandtner, Hartig [90]
YIplac204/PTS2DsRed	TRP1	Stein, Rottensteiner [145]
pIH217 (EGFP-PTS1)	LEU2	Heiland [54]
pIH643 (Pex3p-EGFP)	URA3	Heiland [54]

3.1.5 In dieser Arbeit erstellte Konstrukte

Konstrukt	Vektor	Insert	Klonierung
pIH972	YCplac111	(<i>ADH2</i> -Prom) PTS2-DsRed	EcoRI, NcoI, PstI (s. S. 157)
pIH011	SK+	(+Prom) <i>PEX14</i> (-stopp)	EcoRV (s. S. 158)
pIH013 (s. S. 159)	pUG35	(+Prom) <i>PEX14</i> (-stopp)	BamHI, SalI (s. S. 158)

3.1.6 Verwendete Oligonukleotide

RE603	5' -GTCGACTGGGAT GGAGTCTTCGAC-3'	antisense <i>PEX14</i> -EGFP	SalI
RE604	5' -GGATCCACAAC GCAGCAGCTGGC-3'	sense <i>PEX14</i> -EGFP	BamHI

⁶Max-Delbrück-Centrum, Berlin-Buch

⁷Dep. of Biochem., Mol. Biol., and Cell Biol., Northwestern University, Evanston

⁸Biological School of Science, Manchester University

⁹BioSciences Lyon-Gerland

¹⁰Institut de Biologie et Chimie des Proteines, Universite Lyon

3.1.7 Medien

LB-Medium

10g/l Pepton
5g/l Hefeextrakt
10g/l NaCl
20g/l Agar¹¹
pH 7,5

Der pH wurde vor dem Autoklavieren und vor der Zugabe des Agars mit NaOH eingestellt. Für LB-Medium mit Glucose wurden 100ml/l steril filtrierte Glucose (200mM) zugesetzt. Für selektives LB-Medium wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums 100µg/ml Ampicilin zugesetzt.

YPD-Medium

10g/l Hefeextrakt
20g/l Pepton
20g/l Glucose
20g/l Agar¹¹
pH 6,0

Der pH wurde vor dem Autoklavieren und vor der Zugabe des Agars mit verdünnter Essigsäure eingestellt.

SD-Medium (0,3% Glucose)

1,7g/l YNB ¹²
5g/l (NH₄)₂SO₄
3g/l Glucose¹³
10ml/l 100x Aminosäurelösung
20g/l Agar ¹¹
pH 6,0

Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren und vor der Zugabe des Agars mit KOH eingestellt.

¹¹Nur für Festmedien

¹²yeast nitrogen base

¹³Für SD-Medium mit 2% Glucose werden 20g/l Glucose zugeben

Aminosäurelösung (100x)

4g/l	Tryptophan
4g/l	Adenin
2g/l	Histidin
6g/l	Leucin
3g/l	Lysin
2g/l	Uracil

Basismedium (YN)

1,7g/l	YNB
1,0g/l	Hefeextrakt
5,0g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄
10ml/l	100x Aminosäurelösung
0,5%(w/v)	Kaliumphosphatpuffer pH 6,0
24g/l	Agar ¹¹

Ölsäure-Festmedium (YNO)

1ml Ölsäure wurde mit 2,5ml 20% (v/v) Tween80 für 15 Minuten durch Rühren emulgiert, zu 1l Basismedium pH 6,0 gegeben und autoklaviert.

Ethanolmedium (YNE)

Zu 1l autoklaviertem Basismedium wurden 20ml Ethanol (p.A.) gegeben.

Petrosilinsäuremedium (YNP)

1ml bei 50°C verflüssigte Petrosilinsäure und 2,5ml 20%(v/v) Tween80 wurden emulgiert, zu 1l Basismedium gegeben und autoklaviert.

Ölsäure-Flüssigmedium (1xYNO)

1,7g	YNB
1,0g	Hefeextrakt
5,0g	(NH ₄) ₂ SO ₄
10ml	Amminosäurelösung (100x)
1ml	Ölsäure
2,5 ml	20%(v/v) Tween

Der pH-Wert des Mediums wurde mit KOH auf 6,0 eingestellt. Ölsäure und Tween wurden vor Zugabe unter Rühren emulgiert.

Konzentriertes Ölsäure-Flüssigmedium (5xYNO)

8.5g	YNB
5 g	Hefeextrakt
25g	(NH ₄) ₂ SO ₄
50ml	Amminosäurelösung (100x)
5ml	Ölsäure
12,5ml	20%(v/v) Tween

Ölsäure und Tween wurden vor Zugabe unter Rühren emulgiert. Davor wurde der pH-Wert des Mediums mit KOH auf 6,0 eingestellt.

3.2 Allgemeine Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR¹²-Reaktionen von Konstrukten unter 3kb wurden mit Pwo durchgeführt, dabei wurde mit einer Amplifikationszeit von einer Minute pro 500bp gearbeitet. Konstrukte größer 3kb wurden mit einer Mischung von 3 Teilen Vent-Polymerase und 2 Teilen Taq-Polymerase amplifiziert. Die Amplifikationszeit betrug $1 \frac{\text{min}}{\text{kb}}$.

PCR-Produkte sowie restringierte DNA-Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe des Agarosegelelektionskits von Quiagen aus dem Agarosegel isoliert.

3.2.2 Ligation

Für eine *sticky end* Ligation wurden 0,5 μ l T₄-Ligase (400.000 U/ml) für einen 20 μ l Ansatz verwendet. Für eine *blunt end* Ligation wurde in einem 20 μ l Reaktionsansatz 1 μ l T₄-Ligase eingesetzt. Die Ligation erfolgt für 16 Stunden bei 16°C.

Das Plasmid SK+ für *blunt end* Ligationen wurde mit EcoRV geschnitten und nach Auftrennung über ein 0,8% Agarosegel mit dem Quiagen Agarosegelelektionskit isoliert. Zum Ligationsansatz wurden, wenn möglich, 0,3 μ l EcoRV gegeben um Religationen zu verhindern. Die Präparation von Zielvektoren für die Ligation erfolgte analog.

Der Transfer von DNA in *E. coli* erfolgte unter Verwendung CaCl₂-kompetenter Zellen (s. Abschn. 3.2.3). Die DNA-Aufreinigung nach Amplifikation in *E. coli* erfolgte mit den Kits zur DNA-Präparation von Eppendorf und PeqLab. DNA-Präparationen in größerem Maßstab wurden mit dem Maxi-Präparationskit von Quiagen durchgeführt.

¹²polymerase chain reaction

3.2.3 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurde zunächst eine Vorkultur über Nacht bei 37°C in LB-Medium (s. Abschn. 3.1.7) angezogen. Davon wurden 2ml in 100ml LB-Medium überführt und diese Hauptkultur bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation für 5 Minuten auf Eis wurden die Zellen bei 4.000rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 40ml eiskaltem TfbI (Lösungen s.u.) resuspendiert, für 5 Minuten auf Eis inkubiert und erneut bei 4.000rpm und 4°C abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 4ml eiskaltem TfbII resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit DNA versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 2 Minuten Inkubation bei 42°C wurden die Zellen auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in LB-Medium mit Glucose resuspendiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, auf Ampicilin enthaltenden LB-Festmedien aufgebracht und Über Nacht bei 37°C inkubiert.

TfbI:

30mM	Kaliumacetat
100mM	Rubidiumchlorid
10mM	Calciumchlorid
50mM	Manganchlorid
15%(v/v)	Glycerin

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 5,8 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert.

TfbII:

10mM	MOPS ¹³
10mM	Rubidiumchlorid
75mM	Calciumchlorid
15%(v/v)	Glycerin

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 6,5 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert.

3.2.4 Hefetransformation

Für Hefetransformationen wurden aus einer 10ml Übernachtkultur in YPD-Medium 50ml Hauptkultur (YPD-Medium) mit einer OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und für ca. 5 Stunden bei 30°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 1 inkubiert. Die Zellen wurden bei 4.000rpm (Hereus-Biofuge) für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert und mit Wasser in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

¹³Morpholinopropansulfonsäure

Nach erneuter Zentrifugation bei 4.000rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Zellen in 500 μ l frisch präparierter TE/LiOAc-Lösung (Lösungen s.u.) resuspendiert.

Je Transformation wurden 50 μ l Zellsuspension mit 50 μ g ss-DNA¹⁴ und 0,5 μ g Plasmid-DNA vermischt und 300 μ l PEG¹⁵-Lösung zugegeben. Dieser Ansatz wurde vorsichtig durchmischt und für 30 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 15 Minuten bei 45°C inkubiert, die Zellen bei 5.000rpm für 1 Minute abzentrifugiert, in 50 μ l TE resuspendiert und auf selektive SD-Platten aufgebracht.

Lösungen

TE:

10mM Tris/HCl pH 7.5

1mM EDTA

TE/LiOAc:

10mM Tris/HCl pH 7.5

1mM EDTA

100mM LiOAc

PEG:

10mM Tris/HCl pH 7.5

1mM EDTA

100mM LiOAc

40% PEG4000

3.2.5 Gesamtzellaufschluss nach Yaffe und Schatz

Für die Anzucht von Hefezellen für einen Gesamtzellaufschluss nach Yaffe und Schatz [163] wurde je eine Kolonie in 40ml SD-Flüssigmedium¹⁶ +0,3%-Glucose gegeben und für 8 Stunden bei 30°C geschüttelt. Nach Zugabe von 10ml YNO(5x) wurde die Kultur erneut für 16 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 5.000rpm und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert und mit Wasser in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Nach erneutem Abzentrifugieren der Zellen bei 5.000rpm für 5 Minuten wurde das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt.

Der Aufschluss von Hefezellen zur Expressionskontrolle erfolgte nach Yaffe und Schatz [163]. Danach wurden 30mg Zellen in 970 μ l Wasser resuspendiert und mit 148 μ l 2M NaOH und 12 μ l β -Mercaptoethanol versetzt. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden 160 μ l 50%(w/v) TCA zugegeben und der Ansatz weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe bei

¹⁴single strand DNA = einzelsträngige DNA

¹⁵Polyethylenglycol

¹⁶Bei transformierten Stämmen wurde entsprechendes Selektivmedium verwendet.

15.000rpm (Hereus Biofuge) und 4°C für 10 Minuten wurde das Pellet mit 500 μ l 1M Tris versetzt und erneut für eine Minute bei 15.000rpm und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 150 μ l 1xSDS-Probenpuffer (s. 3.2.8) resuspendiert und 10 Minuten aufgekocht. Die Analyse der Proben erfolgt über SDS-Gelelektrophorese und Immunoblots (s. Abschnitt 3.2.8).

3.2.6 Wachstumstest

Für den Test auf einen *onu*-Phänotyp wurden Kolonien von einer SD-Festmedium in 200 μ l steriles destilliertes Wasser gegeben, die Zellsuspension auf eine OD₆₀₀ von 1 gebracht und in Mikrotiterplatten jeweils 1:10, 1:100 und 1:1000 mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt.

Für den Test auf einen *onu*-Phänotyp wurden je 2 μ l Zellsuspension parallel auf SD-, Ethanol-, Ölsäure- und Petrosilinsäurefestmedium aufgetragen. Die Zellen wurden anschließend für 3 (SD-Medium), 5 (Ethanolmedium) und 6 Tage (Ölsäuremedium, Petrosilinsäuremedium) bei 30°C inkubiert.

3.2.7 Präparation von genomischer DNA aus Hefen

Für die Präparation von genomischer DNA wurden von der betreffenden Transformante oder dem betreffenden Hefestamm 10ml Kultur über Nacht in YPD-Medium angezogen. Die Zellen wurden bei 5 000rpm (Hereus Biofuge) für 5 Minuten abzentrifugiert und mit Wasser in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen in 200 μ l Aufschlusspuffer (s.u.), unter Zugabe von 300mg Glasperlen und 200 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation der Probe bei 15.000rpm für 5 Minuten wurde der Überstand mit 1ml Ethanol (100%) versetzt und erneut bei 15.000rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 400 μ l TE (s. 3.2.4) resuspendiert und für 5 Minuten bei 37°C mit 30 μ g RNase behandelt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 10 μ l 4M NH₄OAc und 1ml 100% Ethanol erneut gefällt und für 3 Minuten bei 15.000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet, vorsichtig in 400 μ l TE resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Aufschlusspuffer:

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

3.2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Probenpuffer (1x)

175mM	Tris/HCl pH 8.5
4,4% (w/v)	SDS
20% (v/v)	Glycerin
0,25‰	Bromphenolblau

SDS-Probenpuffer (5x)

15% (v/v)	β -Mercaptoethanol
15% (w/v)	SDS
1,5% (w/v)	Bromphenolblau
50% (v/v)	Glycerin

Laufpuffer (5x)

144g/l	Glycin
30g/l	Tris
5g/l	SDS

Zusammensetzung eines 12% Polyacrylamidgels

Trenngel(12%):

Menge	Lösung
2ml	30% Acrylamid-Lösung (30:1)
1ml	0,5M Tris/HCl pH 6,8
1,9ml	H ₂ O
50 μ l	20% (w/v) SDS
40 μ l in	10% (w/v) APS
2,5 μ l	TEMED ¹⁷

¹⁷N-,N-,N'-N'-Tetramethylethylendiamin

Sammelgel (4%):

Menge	Lösung
200 μ l	30% Acrylamid-Lösung (30:1)
180 μ l	0,5M Tris/HCl pH 6,8
1085 μ l	H ₂ O
7,5 μ l	20%(w/v)SDS
15 μ l	0,1%(w/v)Bromphenolblau
7,5 μ l	10%(w/v) APS
1,25 μ l	TEMED

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich 12% Polyacrylamidgele (Zusammensetzung s.o.) verwendet. Als Kathoden- und Anodenpuffer wurde hierfür SDS-Laufpuffer (1x) verwendet. Je Gel wurde eine Stromstärke von 25mA angelegt.

Silberfärbung

Für die Proteinfärbung von Polyacrylamidgelen mit Silber wurden diese zuerst für 30 Minuten in Conditioner (Lösungen s.u.) inkubiert und anschließend fünfmal für je 30 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach 30 Minuten Inkubation in der Silberlösung wurden die Proteinbanden mit 4°C kaltem Entwickler detektiert. Die Entwicklung wurde mit 1% Essigsäure gestoppt.

Conditioner:

0,4M Natriumacetat
 30%(v/v) Methanol
 0,5%(v/v) Essigsäure
 0,5%(v/v) Glutaraldehyd
 0,1%(w/v) Natriumthiosulfat

Silberlösung:

0,1%(v/v) AgNO₃
 0,01%(w/v) Formaldehyd

Entwickler:

0,4M Natriumacetat
 30% (v/v) Methanol
 0,5%(v/v) Essigsäure
 0,5%(v/v) Glutaraldehyd
 0,1% (w/v) Natriumthiosulfat

Coomassie-Färbung

Für die Coomassiefärbung von Proteinen in PolyacrylamidGELEN wurden diese 30 Minuten mit der Färbelösung (Lösungen s.u.) inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung über Nacht entfärbt.

Färbelösung:

0,12%(w/v) Serva Blue R-250 (Coomassie Brilliant Blue)

45%(v/v) Methanol

9,0%(v/v) Essigsäure

Entfärbelösung:

30%(v/v) Methanol

7,5%(v/v) Essigsäure

3.2.9 Westernblot

Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen

Zur Immundetektion wurden die Proteine aus unfixierten Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Es wurden hierfür Nasstransferanlagen von BioRad und unten angegebener Transferpuffer verwendet. Der Transfer fand für 90 Minuten bei einer angelegten Stromstärke von 300mA statt. Für den Proteintransfer nach zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden Nassblotanlagen von Amersham Pharmacia verwendet. Der Transfer erfolgte dabei für 12 Stunden bei 90mA bei 4°C.

Transferpuffer:

20mM Tris

150mM Glycin

0,05 % (w/v) SDS

20%(v/v) Methanol

Ponceau-Färbung

Zum Anfärben von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wurde Ponceau verwendet. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Transfer 1 Minute mit Färbelösung (s.u.) inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser entfärbt.

Färbelösung:

0,5%(w/v) Ponceau

40%(v/v) Methanol

15%(v/v) Essigsäure

Blotwaschpuffer

Als Standard Blotwaschpuffer wurde PBSST eingesetzt. Für die Inkubation von PVDF-Membranen (Blaue-Native Gelelektrophorese) und für den Nachweis von Proteinen nach Affinitätsreinigung wurde HBST verwendet.

PBSST¹⁸:

1x PBS¹⁹
 0,02%(w/v) SDS
 0,1%(v/v) Triton-X-100

HBST:

150mM NaCl
 200mM Hepes
 2% (v/v) Tween 20

PBS (20x) pH 7,5:

94,04g/l Na₂HPO₄x7H₂O
 6,79g/l NaH₂PO₄xH₂O
 175,32g/l NaCl

Immunoblots

Nach dem Proteintransfer und dem Anfärben mit Ponceau wurden die Nitrocellulosemembranen für 30 Minuten mit 5%-Magermilchpulver in Blotwaschpuffer geblockt. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran mit dem in Blotwaschpuffer verdünnten ersten Antikörper (Verdünnungen s.u.) versetzt. Nach mehrmaligem Waschen mit Blotwaschpuffer wurde die Nitrocellulosemembran mit dem zweiten Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in Blotwaschpuffer für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran für 1 Minute mit den ECL-Reagenzien inkubiert und die Chemolumineszenzreaktion über einen ECL-Film detektiert.

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
rabbit-anti-Mir1p	1:5.000	AG Pain ²⁰
rabbit-anti-Protein A	1:10.000	Sigma
goat-anti-rabbit	1:10.000	Sigma
goat-anti-mouse	1:10.000	Jackson I. Laboratories
mouse-anti-PGK	1:10.000	Thumm ²¹
rabbit-anti-mtHsp70	1:10.000	AG Neupert ²²
rabbit-anti-Cta1p	1:10.000	AG Tabak ²³
rabbit-anti-Ant1p	1:5.000	[112]

(wird auf der nächsten Seite fortgesetzt)

¹⁸phosphate buffered saline with SDS and Triton-X-100

¹⁹phosphate buffered saline

(von voriger Seite fortgesetzt)

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
rabbit-anti-Fox3p	1:10.000	[31]
rabbit-anti-Pex1p	1:10.000	[12]
rabbit-anti-Pex2p	1:5.000	[2]
rabbit-anti-Pex3p	1:5.000	[60]
rabbit-anti-Pex5p	1:10.000	[60]
rabbit-anti-Pex6p	1:10.000	[12]
rabbit-anti-Pex8p	1:500	AG Erdmann ²⁴
rabbit-anti-Pex10p	1:5.000	[2]
rabbit-anti-Pex11p	1:3.000	[56]
rabbit-anti-Pex12p	1:5.000	[2]
rabbit-anti-Pex13p	1:5.000	[43]
rabbit-anti-Pex14p	1:5.000	[5]
rabbit-anti-Pex15p	1:1.000	AG Kunau ²⁴
rabbit-anti-Pex17p	1:200	[2]
rabbit-anti-Pex19p	1:5.000	AG Erdmann ²⁴

3.2.10 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden 40ml SD-Kultur mit 0,3% Glucose für 8 Stunden bei 30°C geschüttelt und anschließend mit 10ml 5xYNO über Nacht für 14-16 Stunden induziert. Die Zellen wurden dann für 5 Minuten bei 5.000rpm abzentrifugiert und einmal mit Wasser gewaschen. 60mg Zellen wurden in 1ml DTT-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Sorbitolpuffer gewaschen. Die Spheroplastierung erfolgte für ca. 30 Minuten in 500µl Sorbitolpuffer mit 1.000U Lytikase/g Zellen. Die Spheroplastierung wurde beendet, wenn von einem entnommenen Aliquot bei Wasserzugabe ca. 80% der Zellen lysierten.

Nach vorsichtigem Abzentrifugieren der Zellen bei 2.000rpm für 5 Minuten wurden die Zellen zweimal mit Sorbitolpuffer gewaschen und anschließend mit 200µl Schwellpuffer (s.u.) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die teflonbeschichteten Objektträger wurden für 10 Minuten mit 20µl Poly-L-Lysin inkubiert und anschließend dreimal mit Wasser gewaschen. Je Probenkammer wurden 20µl Zellsuspension auf die Objektträger aufgebracht und die Zellen für 10 Minuten sedimentiert. Nach Entfernen des Schwellpuffers wurden die Zellen

²⁰UMDNJ - New Jersey Medical School, Newark

²¹Institut für Biochemie, Universität Stuttgart

²²Adolf Butenandt Institut, Ludwig-Maximilian Universität München

²³Academical Medical Center, University Amsterdam

²⁴Institut für Physiologische Chemie I, Ruhr-Universität Bochum

zuerst 5 Minuten in Methanol und dann 5 Minuten in Aceton fixiert. Die getrockneten Objektträger wurden dann zweimal 15 Minuten mit 20 μ l Blockpuffer je Probenkammer behandelt. Anschließend wurden die Proben mit dem 1. Antikörper für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach Entfernen des ersten Antikörpers wurden die Proben mehrmals mit Blockpuffer gewaschen und dann der zweite Antikörper aufgetragen und erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss in einer feuchten Kammer inkubiert. Zum Abschluss wurden die Proben erneut mit Blockpuffer und mit einer 1%-BSA-Lösung (in PBS) gewaschen. Für die Herstellung eines Dauerpräparates wurde der Objektträger mit Mountinglösung beschichtet und das Deckglas aufgesetzt und fixiert. Die so behandelte Probe wurde bei 4-18°C gelagert.

Alle Fluoreszenzbilder wurden mit 1.000facher Vergrößerung aufgenommen. Für die Alexa-FluorTM 488 markierten Proben wurde der Filtersatz Nr. 487915 (BP 546/12, FT 580, LP 590) verwendet, für die Alexa-FluorTM 568 markierten Proben der Filtersatz Nr. 487901 (BP 365/12, FT 395, LP 397). Alle Immunfluoreszenzaufnahmen wurden am Axiophot von Zeiss erstellt. Für die Abbildung von einzelnen Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit die Aufnahmen mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP noch einmal ungefähr 6fach vergrößert.

DTT-Puffer:

100mM Tris
10mM DTT²⁵

Sorbitolpuffer:

1,2M Sorbitol
20mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4

Schwellpuffer:

20mM Mes²⁶pH 6.0
150mM Kaliumacetat
5mM Magnesiumacetat
750mM Sorbitol

Blockpuffer:

1x PBS
0,2%(v/v) Tween20
2%(w/v) Magermilchpulver

²⁵Dithio-DL-threitol

²⁶Morpholinoethansulfonsäure

Mountinglösung:

2,4g	Mowiol 4-88
6g	Glycerol
6ml	H ₂ O
12ml	0,2M Tris/HCl pH 8,5
25mg/ml	DABCO ²⁷

Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
rabbit-anti-Pex14p	1:10.000	[5]
mouse-anti-AFP ²⁸	1:10.000	Q-BIOgene
goat-anti-rabbit (rot) ²⁹	1:200	Molecular Probes
goat-anti-mouse (grün) ³⁰	1:300	Molecular Probes

3.3 Mutantenuntersuchung

3.3.1 Anzucht der *sec*-Mutanten

Die Anzucht der *sec*-Mutanten für die Mikroskopie erfolgte auf selektiven SD-Festmedien (s. Abschn. 3.1.7) mit einem Glucosegehalt von 2% für 3 Tage bei 23°C. Nach anschließender dreistündiger Inkubation der Zellen bei 37°C wurden die Kolonien auf Ölsäurefestmedium (s. Abschn. 3.1.7) übertragen und für 18 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen für 18 bis 24 Stunden bei 23°C inkubiert.

3.3.2 Anzucht der nicht-temperatursensitiven Mutanten

Die nicht-temperatursensitiven Mutanten wurden auf dem entsprechenden SD-Selektivmedium mit einem Glucosegehalt von 0,3% für 3 Tage bei 30°C angezogen. Anschließend wurden die Kolonien auf Ölsäurefestmedium übertragen und für 18 bis 24 Stunden bei 30°C inkubiert.

3.3.3 Mikroskopie

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie unter Abschnitt 3.3.1 und Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Für die Mikroskopie wurden die Zellen in wenig Wasser aufgenommen und auf dem Objektträger über eine dünne Schicht *low melting* Agarose gegeben.

²⁷1,4-Diazabicyclo[2.2.2]-octan

²⁸*all fluorescent proteins*

²⁹Alexa-FluorTM 568 gekoppelt

³⁰Alexa-FluorTM 488 gekoppelt

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Photomikroskop Axiophot von Zeiss durchgeführt. Zur Betrachtung der EGFP-Konstrukte wurde mit Filtersatz Nr. 487915 (BP 546/12, FT 580, LP 590), zur Betrachtung der DsRed-Konstrukte mit Filtersatz Nr. 487901 (BP 365/12, FT 395, LP 397) gearbeitet. Die Aufnahmen zur Lokalisation von Pex3p-EGFP und Pex14p-GFP wurden am Axioplan 2 von Zeiss erstellt. Für die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Fluoreszenzaufnahmen wurde mit 1.000facher Vergrößerung gearbeitet. Für die Abbildungen dieser Arbeit wurden die Aufnahmen mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP [75] noch einmal 6fach vergrößert.

3.3.4 Subzelluläre Fraktionierung

Für die subzelluläre Fraktionierung wurden 10ml SD-Medium (s. Abschn. 3.1.7) mit einem Glucosegehalt von 2% mit mehreren Kolonien angeimpft und für 24 Stunden bei permissiver Temperatur (23°C) inkubiert. Die erste Vorkultur wurde vollständig in 200ml SD-Medium mit 2% Glucose überführt und für weitere 24 Stunden bei permissiver Temperatur inkubiert. Von dieser zweiten Vorkultur wurde eine 800ml Hauptkultur mit einer OD_{600} von 0,4 angeimpft und diese 8 Stunden bei permissiver Temperatur geschüttelt. Nach sterilem Abzentrifugieren der Zellen bei 5.000rpm (SLA3000) für 5 Minuten wurden die Zellen in 1,2 l YNO-Medium (s. Abschn. 3.1.7, S. 34) resuspendiert und in 6 Kolben mit je 200ml aufgeteilt. Je zwei Kulturen wurden bei 23°C, 30°C und 37°C für 16 Stunden unter Schütteln inkubiert.

Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 5.000rpm (SLA3000) geerntet, zweimal mit Wasser gewaschen und das Zellgewicht bestimmt. Je 200mg Zellen wurden mit Wasser in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt, mit 500 μ l DTT-Puffer (Puffer siehe Abschn. 3.4) versetzt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Sorbitolpuffer wurden die Zellen für 30 Minuten bei 30°C mit 1.000U/g(Zellen) Lytikase in Sorbitolpuffer behandelt, bis von einem entnommenen Aliquot 80% der Zellen unter Wasserzugabe lysierten.

Die Spheroplasten wurden zweimal mit kaltem (4°C) Sorbitolpuffer gewaschen und in 1ml Aufschlusspuffer (s. Abschn. 3.4) mit Proteaseinhibitor resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte mit einer 20G-Kanüle und einer 1ml Spritze. Das Lysat wurde bei 300g für 10 Minuten in einer Hereus Biofuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand noch einmal für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert. 700 μ l des verbleibenden Überstandes wurden für 10 Minuten bei 25.000g in der Mikro-Ultrazentrifuge unter Verwendung des Rotors MLA-130 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in 15%(w/v) TCA gefällt. Das Pellet der 25.000g Zentrifugation wurde in 700 μ l Aufschlusspuffer resuspendiert und ebenfalls in 15%(w/v) TCA gefällt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 15.000rpm (Hereus Biofuge) wurden die TCA-Pellets mit 0,5% TCA gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 15.000rpm zentrifugiert. Die TCA-Pellets wurden in SDS-Probenpuffer (1x) resuspendiert, die Proben über SDS-PAGE aufgetrennt (s. Ab-

schn. 3.2.8, S. 39) und anschließend auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Die Membranen wurden mit anti-mtHsp70 und anti-Cta1p Antikörpern inkubiert.

Für nicht-temperatursensitive Mutanten erfolgte die Behandlung analog. Jedoch wurden alle Anzuchten und die Induktion mit Ölsäure bei 30°C durchgeführt. Außerdem wurden die Zellen vor der Induktion nicht abzentrifugiert. Stattdessen wurde die Hauptkultur mit 200ml 5xYNO (s. Abschn. 3.1.7 auf Seite 33) induziert. Die Messung der Katalaseaktivität erfolgte im Überstand und im mit Aufschlusspuffer resuspendierten Pellet wie in Abschnitt 3.4.5 auf Seite 50 beschrieben.

3.3.5 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden je 10ml SD-Medium mit einem Glucosegehalt von 2% mit mehreren Kolonien angeimpft und für 8 Stunden bei 23°C unter Schütteln inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann vollständig in 200 ml SD-Medium (2% Glucose) überführt und erneut für 24 Stunden bei 23°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen steril abzentrifugiert (5.000rpm, SLA3000, 10 Minuten), in 1xYNO-Medium (s. Abschn. 3.1.7, S. 34) resuspendiert und für 14 bis 16 Stunden bei 23°C bzw. 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren bei 5.000rpm (SLA3000) und 4°C für 10 Minuten. Wurden die Zellen in einer Lösung aus 4% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd resuspendiert und für 10 Minuten bei 23°C bzw. 37°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden bei 2.000 rpm in der Hereus Biofuge bei 4°C abzentrifugiert und in 1 ml 4% Formaldehydlösung resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Für die Einbettung der Zellen wurden diese zunächst erneut bei 2.000 rpm (Hereus Biofuge) abzentrifugiert und dreimal mit Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 1,5% KMnO_4 für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellen anschließend erneut abzentrifugiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser wurden die Zellen dann in 1% wässriger Uranylacetatlösung resuspendiert und die Suspension für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut für 20 Minuten bei 13.000rpm abzentrifugiert und mit 50% Ethanol versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation wurde die wässrige Lösung aus 50% Ethanol gegen 70% Ethanol ausgetauscht, nach weiteren 15 Minuten wurde die Lösung noch einmal durch 70% Ethanol ersetzt. Die Zellen wurden anschließend mit 96% Ethanol für 30 Minuten und mit wasserfreiem Ethanol für 2,5 Stunden inkubiert. Das Ethanol wurde vollständig abgenommen und durch Propylenoxid ersetzt. Nach 5 Minuten Inkubation wurde das Propylenoxid durch eine 1:1 Mischung aus Propylenoxid und Epon (s.u.) ersetzt und die Zellen über Nacht darin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 4 Stunden in einer 3:1 Mischung aus Propylenoxid und Epon und danach für 6,5h in Epon bei Raumtemperatur inkubiert. Die Einbettung der Zellen erfolgte in Epon bei 60°C für mehrere Tage.

Nach dem Schneiden der Proben mit dem Ultramikrotom wurden die Präpa-

rate mit einer Karbonat-freien 0,2% Bleicitratlösung und einer Lösung aus 1,5% Uranylacetat in 30% Ethanol inkubiert. Diese Behandlung diente der nachträglichen Kontrastierung. Die Behandlungsdauer wurde für jede Probe entsprechend angepasst.

Epon:

100ml Glycidether 100
89ml Methylenadicanhydric
2,8ml 2, 4, 6 Tris(dimethylaminomethyl)phenol

3.4 Dichtegradientenzentrifugation

3.4.1 Lösungen

DTT-Puffer

100mM Tris
10mM DTT

Sorbitolpuffer

1,2M Sorbitol
20mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4

Aufschlusspuffer

5mM Mes, pH 6,0
0,5mM EDTA
1mM KCl
0,6M Sorbitol

Proteaseinhibitoren

0,02%(w/v) PMSF in Ethanol und Proteaseinhibitormix von Sigma.

Gradientenpuffer

5mM Mes, pH 6,0
1mM EDTA
1mM KCl

3.4.2 Anzucht der Hefezellen

Mehrere Klone wurden in 10ml SD-Medium (Medien s. Abschnitt 3.1.7) mit 0,3%(w/v) Glucose gegeben und 8 Stunden bei 30°C geschüttelt. Diese erste Vorkultur wurde vollständig in die zweite Vorkultur aus 200ml SD-Medium (0,3% Glucose) überführt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Mit dieser zweiten Vorkultur wurden 800ml Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und ca. 8 Stunden bei 30°C unter Schütteln inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 1,0-1,5 erreicht hatte. Danach wurden 200ml 5xYNO zugegeben und die Kultur für weitere 14-16 Stunden bei 30°C geschüttelt.

3.4.3 Präparation des *post nuclear supernatant* (PNS)

Die Zellen wurden bei 5.000rpm im Rotor SLA3000 für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 300ml H₂O gewaschen und erneut bei 5.000rpm (SLA3000) für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach Resuspension der Zellen in 30 ml destilliertem Wasser wurden die Zellen in 30ml Zentrifugenröhrchen überführt und erneut bei 5.000rpm (SS34 oder JA20) und 4°C 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Bestimmung des Feuchtgewichts wurden 30mg Hefezellen für einen Aufschluss nach Yaffe und Schatz (s. Abschn. 3.2.5) entnommen.

Zu den restlichen Zellen wurden pro Gramm Feuchtgewicht 5ml DTT-Puffer gegeben, die Zellen darin resuspendiert und für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 50ml Sorbitolpuffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 7ml Sorbitolpuffer pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und 1.000U Lytikase pro Gramm Feuchtgewicht zugegeben. Die Spheroplastierung mit Lytikase wurde bei 30°C durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 30-60 Minuten. Die Spheroplastierung wurde abgebrochen wenn von einem entnommen Aliquot Zellen mindestens 80% unter Wasserzugabe platzen.

Die Spheroplasten wurden bei 2.000rpm (JA20 oder SS34) für 4 Minuten abzentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen der Spheroplasten in kaltem Sorbitolpuffer wurden die Zellen in 2ml Aufschlusspuffer mit Proteaseinhibitoren (frisch zugegeben) pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch dreimaliges Homogenisieren bei 500rpm und nachfolgendem zweimaligem Homogenisieren bei 800rpm. Nicht aufgeschlossene Zellen, sowie Zellkerne und große Zelltrümmer wurden dreimal bei 3.000rpm abzentrifugiert. Der verbleibende *post nuclear supernatant* (PNS) wurde auf den vorbereiteten Saccharosegradienten (s. nächster Abschnitt) aufgetragen.

3.4.4 Präparation des Saccharosegradienten

Pro Gradient wurden 12ml 36%(w/v) und 12ml 68%(w/v) sowie 2ml 76%(w/v) Saccharoselösung in Gradientenpuffer angesetzt und die Konzentration mit einem

Refraktometer überprüft. Der Gradient wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers im Zentrifugenröhrchen gegossen. Der Gradient wurde immer frisch präpariert.

Der vorbereitete PNS (s. Abschn. 3.4.3) wurde vorsichtig auf den Gradientengeschichtet bis das Zentrifugenröhrchen luftblasenfrei bis zum Rand gefüllt war. Anschließend wurden die Zentrifugengefäße luftblasenfrei verschlossen.

Die Zentrifugation erfolgte im SV288-Rotor bei 9.720rpm für 12 Stunden (bei 18.000rpm für 3,75 Stunden) bei 4°C. Dabei wurde die Zentrifuge langsam beschleunigt und nicht abgebremst, um das verwirbelungsfreie Umschichten des Gradienten zu ermöglichen.

3.4.5 Probenaufarbeitung

Der Gradient wurde von unten nach oben in 1,2ml Fraktionen portioniert.

600µl jeder Fraktion wurden abgenommen und mit 400µl destilliertem Wasser und 430µl 50% TCA versetzt. Nach Inkubation für 10 Minuten bei 4°C wurden die Proteinpräzipitate für 30 Minuten bei 15.000rpm (Hereus Biofuge) bei 4°C abzentrifugiert. Nach Waschen mit 500µl 0,5% TCA wurden die Pellets in 150µl SDS-Probenpuffer(1x) resuspendiert, für 10 Minuten aufgekocht und die Proteine durch SDS-PAGE (s.Absch. 3.2.8) aufgetrennt.

Die verbleibenden Anteile der Fraktionen wurden für die Bestimmung der Katalase- und Fumaraseaktivität und für die Dichtebestimmung mit einem Refraktometer eingesetzt. Die Messpuffer für die Enzymbestimmungen sind im folgenden aufgeführt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 240nm. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur gegen den Messpuffer ohne Probe. Es wurden von allen Fraktionen gleiche Volumina zur Messung eingesetzt.

Katalase-Messpuffer

50mM	Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
10mM	H ₂ O ₂
0,1%(v/v)	Triton X-100

Fumarase-Messpuffer

50mM	Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
4mM	L-Malat
0,1% (v/v)	Triton X-100

3.5 Komplexisolierung

3.5.1 Präparation der IgG-Sepharose

3,75g mit CNBr aktivierte Sepharose 4B von Amersham Pharmacia wurden mit 100ml 1mM HCl 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem unten verschlossenen 125ml Büchner Trichter inkubiert. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurde achtmal mit je 100ml 1mM HCl gewaschen. Danach wurde die Sepharose unter Zugabe von 30ml 1mM HCl in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und darin bei 400g für 5 Minuten abzentrifugiert. Die Sepharose wurde anschließend mit 50ml Coupling-Buffer (Lösungen s.u.) gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 400g abzentrifugiert. 50mg HsIgG³¹ wurden in 10ml Coupling-Buffer gelöst, zur Sepharose gegeben und 2 Stunden im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde erneut für 5 Minuten bei 400g zentrifugiert, die Sepharose in 100ml Coupling-Buffer aufgenommen und nach Zentrifugation mit 100ml 1M Ethanolamin pH 9,0 gewaschen. Nach erneutem Resuspendieren in 100ml 1M Ethanolamin pH 9,0 wurde die Sepharose über Nacht im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert.

Nach Entfernen des Ethanolamins wurde die Sepharose zweimal mit 100ml NaCl-Coupling-Buffer, einmal mit 100ml 0,1M Glycin/HCl pH 2,8, einmal mit 100ml 0,2M Glycin/HCl pH 2,8, zweimal mit je 100ml destilliertem Wasser und zweimal mit je 100ml PBS (s. Abschn. 3.2.9) gewaschen. Nach erneutem Resuspendieren der Sepharose in 20ml PBS wurde der pH-Wert überprüft. Der Überstand sollte einen pH-Wert von 7.5 haben. War dies nicht der Fall, wurde weiter mit PBS gewaschen bis der Überstand einen pH-Wert von 7.5 erreicht hatte.

Für die Lagerung wurde die Sepharose in einem Gelvolumen PBS, versetzt mit 10mM NaN₃, resuspendiert und in einem 50ml Reaktionsgefäß bei 4°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Sepharose in Solubilisierungspuffer äquilibriert.

Coupling-Buffer

0,1M NaHCO₃

0,1M Na₂CO₃

pH 8,5

NaCl-Coupling-Buffer

1M NaCl

0,1M NaHCO₃

0,1M Na₂CO₃

pH 8,5

³¹Homo sapiens Immunglobulin G

3.5.2 Digitoninreinigung

Gekauftes Digitonin (Sigma Lot.-Nr. 80K1369) ist mit Proteinen und anderen Substraten verunreinigt und muss vor Gebrauch umkristallisiert werden. Dazu wurden 4g Digitonin in 45ml Ethanol (p.A.) unter Erwärmen auf 80°C langsam gelöst. Danach wurde – nach Absetzen des unlöslichen Anteils – der Überstand in ein warmes 50ml Reaktionsgefäß dekantieren. Bei Raumtemperatur wurde das Digitonin langsam auskristallisiert und dann für 4 Stunden bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde das Digitonin bei 7.000rpm (SS34) für 15 Minuten abzentrifugiert. Das Digitonin erneut in Ethanol gelöst und die beschriebenen Arbeitsschritte noch dreimal wiederholt. Das erhaltene Digitonin wurde an der Luft getrocknet.

Aus dem getrockneten Digitonin wurde eine 5.5-6%(w/v) wässrige Lösung hergestellt und diese für 8 Minuten gekocht. Die Lösung wurde danach für mindestens 36 Stunden bei 0°C gelagert. Die erhaltenen Präzipitate wurden dann bei 12.000rpm (SS34) für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Tris/HCl auf pH 8.0 eingestellt und über eine mit 1M NaCl und 20mM Tris/HCl pH 8.0 äquilibrierte Q-Sepharose-FF-Säule von Amersham Pharmacia gereinigt. Der gereinigte Überstand wurde bei 4°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Lösung bei 4.000rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der dadurch erhaltene Überstand hatte eine Digitoninkonzentration von 5%(w/v).

3.5.3 Co-Immunpräzipitation

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie für die Präparation von Saccharosegradienten in Abschnitt 3.4.2 auf Seite 49 beschrieben. Die ölsäureinduzierten Zellen wurden bei 5.000rpm und 4°C für 5 Minuten im SLA3000-Rotor abzentrifugiert, einmal mit 300ml destilliertem Wasser gewaschen und erneut bei 5.000rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden danach mit 30ml destilliertem Wasser in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und wieder abzentrifugiert.

Von den gewaschenen Zellen wurde das Feuchtgewicht bestimmt und die Zellen in 2ml Aufschlusspuffer (s.u., mit PMSF) pro Gramm Feuchtgewicht resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte unter einem Druck von 15.000psi mit der Emulsiflex-C5 von der Firma Avestin. Anschließend wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer dreimal bei 3.000rpm und 4°C (SS34) für 5 Minuten abzentrifugiert. Der dadurch erhaltene Überstand wird als zellfreies Homogenat bezeichnet.

Das Homogenat wurde für 1 Stunde bei 120.000g (40.000rpm im Rotor T-647.5) und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet enthielt Organellen und Membranen. Es wurde in Aufschlusspuffer (mit PMSF) resuspendiert und die Lösung auf eine Proteinkonzentration von 5mg/ml eingestellt. Nach Zugabe des gereinigten Digitonins auf eine Endkonzentration von 1% und ein Seife-zu-Protein-Verhältnis (SPV) von 2, wurde die Pelletsuspension für mindesten

1 Stunde bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 30°C. Anschließend wurde die Pelletsuspension erneut für 1 Stunde bei 120.000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand dieser zweiten Ultrazentrifugation enthielt die gelösten Membranproteine und wurde auf die vorbereitete IgG-Sepharose (12,5ml/50µl Sepharoselösung) gegeben. Die Inkubation mit der Sepharose erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Sepharose bei 100rpm (Hereus Biofuge) abzentrifugiert und mehrmals mit Aufschlusspuffer (ohne PMSF) gewaschen. Nach Überführen der Sepharose in 1,5ml-Reaktionsgefäße wurde diese in 3/10 des Sepharosevolumens mit Solubilisierungspuffer resuspendiert und mit 1U TEV-Protease pro µl Sepharose für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sepharose wurde bei 100rpm (Hereus Biofuge) für 5 Minuten abzentrifugiert und zweimal mit 1/5 Sepharosevolumen gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und für die Blaue-Native-Gelelektrophorese mit 1/10 Volumen Blauem-Nativen-Probenpuffer versetzt. Für die Bestimmung der Proteinzusammensetzung über SDS-PAGE wurde die Probe mit 1/5 Volumen 5xSDS-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten aufgeköcht.

Aufschluss- und Solubilisierungspuffer:

20mM Hepes pH 7,5

100mM KOAc

5mM MgOAc

Proteaseinhibitoren:

0,02%(w/v) PMSF in Isopropanol

Blauer-Nativer-Probenpuffer:

5%(w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

500mM ε-Amino-n-Caprinsäure

100mM Bis-Tris pH 7,0

3.5.4 Blaue-Native-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Komplexe über Blaue-Native-Gelelektrophorese wurden mit einem Gradientenmischer Gradientengele mit 3-13% Acrylamid gegossen und diese – ohne vorheriges Auspolymerisieren – mit einem 3% Sammelgel überschichtet. Nach Auspolymerisieren der Gele wurden die Proben aufgetragen, leere Taschen wurden mit in Solubilisierungspuffer verdünntem Probenpuffer gefüllt. In die untere Gelkammer wurde Anodenpuffer in die obere Gelkammer Coomassie haltiger Kathodenpuffer gegeben und die Komplex für mindestens 2 Stunden bei eine Spannung von 100V aufgetrennt. Danach wurde der Puffer in der oberen Gelkammer gegen farblosen Kathodenpuffer ausgetauscht und die Trennung bei 100V über Nacht fortgesetzt.

Das Gel wurde anschließend entweder auf PVDF-Membranen transferiert (Blotpuffer s. Abschnitt 3.2.9) oder für die zweidiemnsionale Gelelektrophorese die entsprechenden Gelspuren ausgeschnitten, in einer wässrigen Lösung aus

1%(w/v) SDS und 1%(v/v) Mercaptoethanol 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Die so behandelten Streifen können bei einer Temperatur -20°C gelagert werden. Für eine denaturierende Auftrennung der Proteine wurden die Streifen in das Sammelgel eines SDS-Polyacrylamidgeles (s. Abschn. 3.2.8) einpolymerisiert und weiter, wie für die SDS-PAGE beschrieben, behandelt.

Der Markerstreifen wurden mit Coomassie gefärbt (s. Abschn. 3.2.8).

Nativer-Gelpuffer(3x):

200mM ϵ -Amino-n-Caprinsäure
150mM Bis-Tris pH 7,0

Nativer-Kathodenpuffer(10x):

500mM Tricin
150mM Bis-Tris
pH 7,0

Coomassie haltiger Nativer-Laufpuffer(10x):

2%(w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
500mM Tricin
150mM Bis-Tris
pH 7,0

Nativer-Anodenpuffer(10x):

500mM Bis-Tris
pH 7,0

Zusammensetzung Blaue-Native-Gele

Lösungen	3% ³²	4%	5%	6%	8%	10%	13%	16,5%	20%
ml Gelpuffer(3x)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
ml Acrylamid ³³	0,55	0,73	0,91	1,07	1,46	1,82	2,35	3,05	3,75
ml Glycerol	-	-	-	-	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
ml Wasser	5,4	5,2	5,0	4,9	2,7	2,3	1,8	1,1	0,4
μ l 10% APS	38	38	38	38	30	30	30	30	30
μ l TEMED	3,8	3,8	3,8	3,8	3	3	3	3	3

3.5.5 Subzelluläre Fraktionierung von Pex3p

Für die subzelluläre Fraktionierung von Pex3p im kleinen Maßstab wurden die Zellen in 10ml 0,3% SD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 80ml 0,3%-SD-Medium überführt und die Zellen für

³²Zusammensetzung 3% Trenngel gleich der Sammelgelzusammensetzung

³³Mischungsverhältnis 39:1 steril filtriert

8 Stunden bei 30°C angezogen. Diese Hauptkultur wurde dann mit 20ml 5xYNO versetzt und bei 30°C für 14 bis 16 Stunden inkubiert.

Nach Abzentrifugieren und Waschen wurden 200mg Zellen mit 1ml PMSF enthaltendem Aufschlusspuffer (s. Abschn. 3.5.3, S. 52) versetzt und entweder spheroplastiert und mit Kanüle (20 G) und Spritze aufgeschlossen oder mit Glasperlen behandelt. Die Zelltrümmer wurden durch dreimaliges Zentrifugieren für jeweils 10 Minuten bei 300g und 4°C abgetrennt. Von dem resultierenden Homogenat wurden je 700µl für 30 Minuten bei 200.000g zentrifugiert (MLA-130). Der Überstand der Zentrifugation wurde mit 15% TCA versetzt. Das Pellet wurde in 700µl Aufschlusspuffer resuspendiert und ebenfalls mit 15% TCA versetzt. Die Proben wurden weiter, wie in Abschnitt 3.3.4 auf Seite 46 beschrieben, behandelt und im Immunoblot mit Pex3p-Antikörpern die Verteilung von Pex3p bzw. Pex3p-ProteinA untersucht.

3.5.6 Flotationsgradient

Das Homogenat (Herstellung s. Abschnitt 3.5.3) wurde für eine Stunde bei 120.000g (40.000rpm Rotor T-647.5) zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit Saccharose versetzt bis er eine Dichte von 1.23g/ml erreicht hatte. 300µl des so behandelten Homogenates wurden in einem offenen Mikrozentrifugengefäß über 200µl Saccharoselösung (60%(w/w)) geschichtet. Darüber wurden je 200µl 46%(w/w), 38%(w/w) und 24%(w/w) Saccharoselösung geschichtet. Der resultierende Stufengradient wurde für 90 Minuten bei 200.000g (Rotor MLA-130) zentrifugiert und anschließend in sechs 180µl Fraktionen aufgeteilt. Die Proteine wurden, wie in Abschnitt 3.4.5 auf Seite 50 beschrieben, mit TCA gefällt und im Westernblot (s. Abschn. 3.2.9, S. 41) analysiert.

3.5.7 Vernetzung von Proteinen

Für die Vernetzungsexperimente wurden Solubilisate von Membranproteinen hergestellt, wie in Abschnitt 3.5.3 auf Seite 52 beschrieben, Diese wurden dann mit DTME³⁴ (in DMSO gelöst) versetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die DMSO Konzentration im Reaktionsansatz durfte dabei 10% nicht übersteigen, um Proteinpräzipitationen zu vermeiden. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Proben mit Blauem-Nativem-Probenpuffer versetzt. (s. Abschn. 3.5.4, S. 53)

³⁴Dithio-bis-maleimidoethan

3.6 Informationstechnische Hilfsmittel

Die vorliegende Arbeit wurde mit L^AT_EX 2.e [19, 132] erstellt. Fluoreszenzaufnahmen und Aufnahmen von Immunoblots wurden mit GIMP 2.0 [75] bearbeitet, zusammengestellt und beschriftet. Dabei wurden Helligkeit und Kontrast optimiert sowie Bildauschnitte erstellt und vergrößert. Graphiken wurden mit GNUPLOT [162] erstellt und mit XFIG [13] überarbeitet. Auch die Klonierungsschemata wurden mit XFIG gezeichnet. Alle anderen Farbzeichnungen und Schemata wurden mit Freehand 10 (Macromedia Inc.) erstellt. *In silico* Klonierungen wurden mit pDRAW32 [109] durchgeführt und die Plasmidkarten mit Freehand 10 überarbeitet.