

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)
3-Amino-1,2,4-Triazol	Sigma, Deisenhofen (D)
Ampicillin	Serva, Heidelberg (D)
APS	Serva, Heidelberg (D)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg (D)
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
100 Bp Standard Marker	MBI-Fermentas (USA)
BSA Serva	Heidelberg (D)
Coomassie-Färbelösung	Serva, Heidelberg (D)
DNA Gel-Elutionskit	Qiagen, Hilden (D)
DTT	Serva, Heidelberg (D)
Digitonin	Boehringer Ingelheim, Heidelberg (D)
Dynabeads M-280	Dynal, Oslo (N)
ECL-Western-Blotting-Detektionssystem	Amersham Pharmacia GmbH, Braunschweig (D)
ECL-anti Kaninchen- und ECL-anti Maus-Antikörper	Sigma, Deisenhofen (D)
ECL-Hyperfilm	Amersham Pharmacia GmbH, Braunschweig (D)
EDTA	Merck, Darmstadt (D)
Entwicklungsreagenzien	Adefo Chemie, Nürnberg (D)
Gal4p-DB Antikörper	Clontech Lab. Inc. , Palo Alto (USA)
Geneticin. (G-418 Sulfat)	Life Technologies (D)
Genomische DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Promega, Madison (USA)
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Pharmacia GmbH, Braunschweig (D)
Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, Michigan (USA)
Heringssperma-DNA	Sigma, Deisenhofen (D)
IPTG	peQLab Biotechnologie GmbH (D)
IgG Sepharose®6 Fast Flow-Affinitätschromatografie	Amersham Pharmacia GmbH, Braunschweig (D)
Lambda DNA-Standard	MBI-Fermentas (USA)
L-Malat	Merck, Darmstadt (D)
Lyticase	Sigma, Deisenhofen (D)

Produkt	Firma
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)
PMSF	Merck, Darmstadt (D)
Protease-Inhibitoren (Complete)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)
PWO-DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M. (D)
Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis Kit®	Stratagene, La Jolla, (USA)
Restriktionsendonukleasen	Eurogentec, Seraing (Belgien) und New England Biolabs GmbH, Frankfurt (D)
RNaseA	Sigma, Deisenhofen (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)
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad (USA)
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)
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad (USA)

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 Geräte

Gerät	Firma
GelDoc2000	BioRad Laboratories GmbH, München (D)
Mini-Transblot-Zelle	Biorad, München (D)
Heraeus Minifuge GL	Kendro Laboratory Products (USA)

Gerät	Firma
Lumi-Imager	Boehringer, Mannheim (D)
Spektralphotometer (Graphicord)	Shimadzu (J)
Trio-T3 Thermoinkubator	Biometra (BRD)
Sorvall RMC 14	Sorvall GmbH (BRD)
Sorvall RC5C Plus	Kendro Laboratory Products (USA)
Optima™ Max Ultracentrifuge	Beckman Coulter (USA)
Biofuge Stratos	Heraeus Instruments GmbH (D)
Ultraschallstab UW 70	Bandelin, Berlin (D)
MikroPulser	Biorad, München (D)
Mikroskop (Axiophot)	Zeiss, Göttingen (D)
Homogenisator	Braun, Melsungen, D
Taumelschüttler	Biorad, München (D)
Schüttler für Bakterien und Hefeanzuchten	HT Infors AG, Bottmingen (D)
Konica, Filmentwicklungsgerät (SRX-101A)	Tokyo (J)
Drehrad (Labinco)	Gerlinge Kisker, Mülhausen (D)
IKA-Vibrax VXR	Vibrax, Staufen (D)

2.3 Mikroorganismen

2.3.1 *Escherichia coli*

Es wurden folgende *E. coli*-Stämme verwendet:

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ 15, <i>recA1endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>) <i>supE44</i> , <i>rel A1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	Stratagene, San Diego (USA)
C41 (DE)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁺</i>), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3)	Prof. Dr. John Walker, MRC, Cambridge (GB)
TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>ara</i> D139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Carlsbad (USA)
HB101	<i>supE44</i> , <i>hsdS20</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i>), <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galk2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i>	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

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

Stamm	Genotyp	Quelle
UTL-7A	Mat a, <i>ura3-52</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2-3/112</i> <i>MATa leu2-3</i> , <i>112 ura3-52 trp1</i>	Prof. Dr. W. Duntze, Bochum (D)
UTL-7A <i>pex8</i> Δ	<i>pex8</i> Δ ::LEU2	Prof. W. Kunau, Bochum (D)

Stamm	Genotyp	Quelle
UTL-7A-[Pex8p-TEV-PA]	<i>MAT_a, ura3-52, trp1, leu2-3/112, PEX8-TEV-ProteinA, kanMX6</i>	Prof. W.H. Kunau, Bochum (D)
UTL-7A- <i>pex5</i> Δ [Pex8p-TEV-PA]	<i>MAT_a, ura3-52, trp1, leu2-3/112, pex5 Δ::LEU2, PEX8-TEV-ProteinA, kanMX6</i>	Prof. W.H. Kunau, Bochum (D)
UTL-7A- <i>pex7</i> Δ [Pex8p-TEV-PA]	<i>MAT_a, ura3-52, trp1, leu2-3/112, pex7 Δ::LEU2, PEX8-TEV-ProteinA, kanMX6</i>	Prof. W.H. Kunau, Bochum (D)
UTL-7A- <i>pex5</i> Δ <i>pex7</i> Δ [Pex8p-TEV-PA]	<i>MAT_a, ura3-52, trp1, leu2-3/112, pex5 Δ::LEU2 pex7 Δ::URA3, PEX8-TEV-ProteinA, kanMX6</i>	Prof. W.H. Kunau, Bochum (D)
HF7c	<i>MAT_a ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3/112 gal4-542 gal80-538 LYS2::GAL1-HIS3URA3:::(GAL4 17- mers)3-CYC1-LacZ</i>	(Feilotter <i>et al.</i> , 1994)
HF7c <i>pex1</i> Δ	<i>pex1Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex5</i> Δ	<i>pex5Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex6</i> Δ	<i>pex6Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex7</i> Δ	<i>pex7Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex8</i> Δ	<i>pex8Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex10</i> Δ	<i>pex10Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex12</i> Δ	<i>pex12Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex13</i> Δ	<i>pex13Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex14</i> Δ	<i>pex14Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex15</i> Δ	<i>pex15Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex17</i> Δ	<i>pex17Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex19</i> Δ	<i>pex19Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex21</i> Δ	<i>pex21Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
HF7c <i>pex22</i> Δ	<i>pex22Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum (D)
PJ69-4a	<i>MAT_a, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS ::GAL1-HIS3, met2 ::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
Y187	<i>MAT_α, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, ade2-101, gal4Δ, met⁺, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993

2.4 Antiseren

Mit Ausnahme der monoklonalen Antikörper gegen das myc-Epitop und Protein A wurden folgende polyklonale Antiseren verwendet:

Antikörper gegen	Charge	Verdünnung	Quelle
Fox3p (<i>S.cerevisiae</i>)	DE 870710	1:10.000	Prof. Dr. R. Erdmann, Berlin, (D)
Pex11p (<i>S. cerevisiae</i>)	DE 95758 SA 2571	1:3.000	Prof. Dr. Kunau, Bochum, (D)
Pex13p (<i>S. cerevisiae</i>)	DE 96346 SA3129	1:10.000	Prof. Dr. R. Erdmann, Berlin, (D)
Protein A		1:5.000	Sigma, Deisenhofen, (D)

2.5 Vektoren und Plasmidkonstrukte

2.5.1 Vektoren

Folgende vorhandene Vektoren wurden zur Durchführung dieser Arbeit verwendet:

Vektoren	Quelle
pSK+	Stratagene, San Diego, (USA)
pYIplac204-ADH2-Promotor-PTS2-DsRed (pHPR131)	H. Rottensteiner, Berlin (D)
PTS1-GFP (pIH217)	Ines Heiland, Berlin (D)
pRSProm _{FOX3} -Term _{Cyc}	Prof. Dr. R. Erdmann, Berlin, (D)
pPC97-FOX3	[Rehling, 1996 #1053]
pPC86-PEX14	[Albertini, 1997 #21]
pPC86-PEX5	[Albertini, 1997 #21]
pPC97-PEX7	[Albertini, 1997 #21]
pPC97-PEX6	Prof. Dr. Kunau, Bochum, (D)
pPC97-PEX10	Prof. Dr. Kunau, Bochum, (D)
pPC97-PEX11	Prof. Dr. Kunau, Bochum, (D)
pPC97-PEX12 C-Terminus	Prof. Dr. Kunau, Bochum, (D)
pPC86-PEX10	Prof. Dr. Kunau, Bochum, (D)
pPC86-PEX11	Prof. Dr. Kunau, Bochum, (D)
pPC86-PEX12 C-Terminus	Prof. Dr. Kunau, Bochum, (D)
pPC86-PEX17	Prof. Dr. Kunau, Bochum, (D)
pPC86-PEX13 und Verkürzungen von PEX13	[Stein, 2002 #1210]
SK+PEX8FL (RE207/208)	A. Eismann, Berlin, (D)
pPC86	Dr. Chevray, Baltimore, (USA)
pPC97	Dr. Chevray, Baltimore, (USA)

2.5.2 Plasmidkonstrukte

Die im Folgenden aufgelisteten Plasmidkonstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt. Die verwendeten Hefegene wurden mittels präparativer PCR mit entsprechenden Oligonukleotidprimern aus dem Hefegenom amplifiziert. Die Amplifikate wurden entweder "blunt end" mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *EcoRV* in den Vektor pBluescript SK+ kloniert, oder mit Hilfe des Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kits® in den pCR-Blunt II-TOPO Vektor kloniert. Die weitere Klonierung der Amplifikate erfolgte mit Hilfe der angegebenen Restriktionsendonukleasen in die vorgesehenen Zielvektoren.

PCR	Name des Subklons	Name des Zielvektors	sense	antisense	Beschreibung
PCR5(472/475)	SK5	pPC86-5	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(19-586 aa)
		pPC97-5	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(19-586 aa)
PCR6(474/475)	SK6	pPC86-6	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p/KS4-(146-586 aa)
		pPC97-6	<i>XhoI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p/KS4-(146-586 aa)
PCR8(473/560)	SK8	pPC86-8	<i>XhoI</i>	<i>SacII</i>	Pex8p/KS2-(293-586 aa)
		pPC97-8	<i>XhoI</i>	<i>SacII</i>	Pex8p/KS2-(293-586 aa)
PCR13(631/476)	SK13	pPC86-13	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p/KS1-(19-293 aa)
		pPC97-13	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p/KS1-(19-293 aa)
PCR15(631/477)	SK15	pPC86-15	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p/KS3-(19-440 aa)
		pPC97-15	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p/KS3-(19-440 aa)
PCR17(634/635)	SK17	pPC86-17	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(1-120 aa)
		pPC97-17	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(1-120 aa)
PCR18(634/636)	SK18	pPC86-18	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(1-102 aa)
		pPC97-18	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(1-102 aa)
PCR-EP(503/560)	TOPO-EP	pPC97-PEX8M	<i>BamHI/BglII</i>	<i>SacII</i>	Pex8pM-(19-586 aa)
PCR-A(645/646)	SKMutA	pRS-MutA	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	Pex8p-(1-589 aa) MutA
		pPC86- MutA	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(1-589 aa) MutA
		pPC97- MutA	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(1-589 aa) MutA
		pPC97- MutA (-57)	<i>BamHI/BglII</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(19-589 aa) MutA
PCR-C(685/686)	SKMutC	pRSMutC	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	Pex8p-(1-589 aa) MutC
		pPC86- MutC	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(1-589 aa) MutC
		pPC97- MutC	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(1-589 aa) MutC
		pPC97- MutC (-57)	<i>BamHI/BglII</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(19-589 aa) MutC
PCR-D(687/688)	SKMutD	pRSMutD	<i>EcoRI</i>	<i>XhoI</i>	Pex8p-(1-589 aa) MutD
		pPC86- MutD	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(1-589 aa) MutD

PCR	Name des Subklons	Name des Zielvektors	sense	antisense	Beschreibung
		pPC97- MutD	<i>SalI</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(1-589 aa) MutD
		pPC97- MutD (-57)	<i>BamHI</i> / <i>BglII</i>	<i>SacI</i>	Pex8p-(19-589 aa) MutD

2.5.3 Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')
RE 472	CGGGATCCTCGAGACAGTATGATCAACGCCTG
RE 473	CGGGATCCTCGAGATTAAGAATTATCCGCC
RE474	CGGGATCCTCGAGATGGAAATTACAACTGTTT
RE 475	GGAATTCAAGCTTGAGCTCAGATTGACTTGATAAGAC
RE 476	GGAATTCAAGCTTGAGCTCGGCGGATAATTCTTTTAA
RE 477	GGAATTCAAGCTTGAGCTCTATAGACAGTACAGTGAT
RE 503	CGGAATTCAGGATCCAGTATGATCAACGCCTG
RE 560	CTCGAATTCGCGGCTAAGATTGACTTGATAAGAC
RE 631	CGGGATCCTTGTCGACTGTGCAGTATGATCAACGCCTG
RE 634	CGGAATTCCTTGTCGACTATGTTTGATCATGACGTC
RE 635	CGAAGCTTGAGCTCTGTGACTAGTACACCATC
RE 636	CGAAGCTTGAGCTCGTGAGATTCGAAAACAGC
RE 645	CGACTGATTCAGTCTTACCAACCAACTTGAATCATTGGCC
RE 646	GGCCAAATGATTCAAGTTGGTTGGTAAGACTGAATCAGTCG
RE 685	CCAACTTGAATCATTGGTTCAGTTGCTTGACCAGTTC
RE 686	GAACTGGTCAAGCAACTGACCAAATGATTCAAGTTGG
RE 687	CACGTCCACGTATTGCCTCAAAAAATCGGGACAG
RE 688	CTGTCCCGATTTTTTGAGGCAATACGTGGACGTG
RE 158	AGTCACTTTAAAATTTGTATACAC
RE 1218	GTCAAATGAGGCAACTTTGG
R580	CCATGATACGTCAACTCC
F910	GACAATACTGCCTAACCA

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 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 la Garza [Moreno de la Garza, 1985 #878] an einem Spektralphotometer (Shimadzu, Japan) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 240$ 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	50 mM Kaliumphosphatpuffer
10 mM Wasserstoffperoxid	4 mM L-Malat
0,1% Triton-X-100	0,1% Triton-X-100

2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte der Farbstoffbindungstest nach Bradford (1976) nach Herstellerangaben (Biorad, BRD).

2.6.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von OD_{260nm} bestimmt. Die OD_{260nm} von 1 entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 20 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotid oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Der Quotient OD_{260nm} / OD_{280nm} wurde als Maß für die Reinheit der DNA-Lösung bestimmt.

2.7 Molekularbiologische Methoden

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

2.7.1 Anzucht von *Escherichia coli* zur DNA-Isolierung

Die *E. coli*-Stämme wurden in LB-Vollmedium mit dem jeweils notwendigen Antibiotikum 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	1 mM NaOH
0,5% (w/v) NaCl	Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml in
0,5% (w/v) Select Hefeextrakt	1M Tris, pH 8,0)

2.7.2 Präparation elektrokompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Biorad® (München, D). 20 – 50 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen *E. coli*-Kolonie beimpft (300 rpm, ü.N., 37°C). 500 ml LB-Medium wurden mit 1/100 Volumen der Übernachtskultur angeimpft und wuchsen bis zu einer OD_{600nm} von 0.5-0.6. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden für 20 min. auf Eis inkubiert, anschließend in ein kaltes Zentrifugengefäß überführt und sedimentiert (4000 x g, 15 min., 4°C). Das Pellet wurde zunächst in 500 ml, dann in 250 ml und 20 ml eiskaltem 10%-igem Glycerol resuspendiert und wiederholt sedimentiert. Abschließend wurde das Pellet in 1-2 ml eiskaltem 10%-igem Glycerol resuspendiert, in 40µl Aliquots unterteilt und bei -70°C gelagert.

2.7.3 Präparation CaCl₂-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Hanahan. 20 – 50 ml SOB Medium wurden mit einer einzelnen *E. coli*-Kolonie beimpft (300 rpm, ü.N., 37°C). Die Hauptkultur wurde in SOB Medium auf eine O.D.600 von 0,2 verdünnt und wuchsen bis zu einer O.D.600 von 0,6. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C. Nach 10 min. Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 4000 x g sedimentiert, 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 µl Portionen in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

SOB Medium, pH 7,0

2% (w/v) Trypton	TB Puffer, pH 6,7
0,5% (w/v) Hefeextrakt	10 mM Pipes
10 mM NaCl	5 mM CaCl ₂
2,5 mM KCl	250 mM KCl
20 mM MgCl ₂	55 mM MnCl ₂

2.7.4 Transformation elektrokompeter *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte wie beschrieben. 40 µl Aliquots wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl Plasmid-DNA versetzt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette (0,1 cm) transferriert. Die Elektroporation erfolgte unter Verwendung des Programms Ec1 (Micropulser, Biorad, München (D)). Nach erfolgter Elektroporation wurden die Zellen sofort in 1 ml eiskaltem SOC-Medium resuspendiert, in ein Eppendorfreaktionsgefäß transferriert und 1 h bei 37°C, 250 rpm inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen sedimentiert (1 min. 13.000 rpm), das Pellet in 100-150 µl SOC-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation fand über Nacht bei 37°C statt.

SOC Medium, pH 7,0

2% (w/v) Bacto-Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Gukose

2.7.5 Transformation von CaCl₂-kompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte wie beschrieben. 1-10 ng Plasmid-DNA wurden zu 30-100 µl kompetenten Zellen gegeben und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, für 60 min. bei 37°C inkubiert und danach auf entsprechenden Selektivagarplatten ausplattiert. Um eine blau/weiss-Selektion durchführen zu können, wurde den Platten je 20 µl 0,1 M IPTG und 1% X-Gal (in DMF) zugesetzt. Die Inkubation fand über Nacht bei 37°C statt.

2.7.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte modifiziert nach Birnboim und Doly. Dazu wurden Einzelkolonien von einer Selektiv-Agarplatte in 3 ml Selektivmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1,5 ml dieser Bakterienkultur wurden sedimentiert (13.000 rpm, Heraeus-Tischzentrifuge). Das Sediment wurde mit 100 µl Lösung I resuspendiert. Nacheinander wurden 200 µl Lösung II und 150 µl Lösung III zugesetzt. Anschließend erfolgte eine

Zentrifugation (13.000 rpm, Heraeus-Tischzentrifuge, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde entnommen und die darin enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 96%-igem Ethanol gefällt (10 min., 13.000 rpm, 4°C, Heraeus-Tischzentrifuge). Die DNA wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen unter Vakuum in 50 µl 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.

2.7.7 DNA-Restriktion

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

2.7.8 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von 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 µg/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 h 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

2.7.9 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 aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die weiteren Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA 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

2.7.10 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 Religation des linearisierten Vektors zu vermeiden.

2.7.11 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 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C.

2.7.12 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Zur Durchführung der PCR und Erstellung der unter 2.5.2 aufgeführten Konstrukte wurde Plasmid-DNA oder genomische DNA aus *S. cerevisiae* als Matrize eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem T3 Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen, D) nach folgender Zusammensetzung:

1x PCR-Puffer der jeweiligen DNA-Polymerase

0,2 mM dNTP

25 pmol spezifische Oligonukleotide (sense/antisense)

20-100 ng DNA-Matrize

1-2 U *Pwo* DNA-Polymerase

ad 50 µl mit bidest Wasser

Die Annealing-Temperatur T_a der Primer berechnet sich wie folgt:

$$T_a = [(n_{GC} \times 4^\circ\text{C}) + (n_{AT} \times 2^\circ\text{C})] - 5^\circ\text{C}$$

Reaktion	Temperatur	Zeit
Denaturierung 1	94°C	5 min
Denaturierung 2	94°C	1 min
Hybridisierung 3	Primer-abhängig	1 min
Amplifikation 4	72°C	größenabhängig
Amplifikation 5	72°C	10 min
Ende 6	4°C	unendlich

Die Schritte 2-4 wurden 29 mal wiederholt.

Die 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.

2.7.13 Ungerichtete Mutagenese von *PEX8* mit Hilfe der fehleranfälligen PCR-Methode

Mit Hilfe der sog. „Error-prone“ oder fehleranfälligen PCR erfolgte eine ungerichtete Mutagenese des ausgewählten Genes. Die jeweilige Methode richtet sich generell nach Größe des amplifizierten Gens, der erwünschten Fehlerrate sowie der Art der Fehler (Substitution etc.). Hier wurde für das Standardprotokoll die *Taq* DNA Polymerase eingesetzt, da diese durch fehlende Proofreading-Aktivität eine Fehlerrate von ca. 1/1000 bp erzeugt. Um die Fehlerrate zu erhöhen, wurden in mehreren Versuchsansätzen die Reaktionsbedingungen mit verschiedenen dNTP und Mg²⁺-Konzentrationen verändert. Zur Durchführung der PCR wurde das Plasmid pSK⁺PEX8FL (2.5.1) als Matrize eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten in einem T3 Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen (D)) nach folgenden Zusammensetzungen:

	Reaktion 1	Reaktion 2 (4 Ansätze)
[dNTPs]	alle dNTPs 200 µM	je ein dNTP 20 µM
Taq-Polymerase [U]	2,5	2,5
[Primer]	4 pmol	4 pmol
[Puffer]/[MgCl ₂]	1x Puffer IV / 10 mM	1x Puffer IV / 5 mM
[DNA]	10 ng	10 ng
H ₂ O	ad 100 µl	ad 100 µl

Reaktion	Temperatur	Zeit
Denaturierung 1	94°C	3 min.
Denaturierung 2	94°C	1 min.
Hybridisierung 3	54°C	1 min.
Amplifikation 4	72°C	2 min.
Amplifikation 5	72°C	30 min.
Ende 6	4°C	unendlich

Die Schritte 2-4 wurden 37-mal wiederholt. Alle vier Ansätze der Reaktion 2 wurden gepoolt. Die Reinigung der PCR-Produkte (PCR-EP(503/560)), erfolgte über das QIAEX II Extraktionskit. Die nachfolgende Polyadenylierung der PCR-Produkte und die Ligation mit dem pCRII[®]-TOPO-Vektor erfolgte nach Anleitung des TOPO[®] Cloning Manual (Invitrogen Carlsbad, USA).

2.7.14 Gerichtete Mutagenese von *PEX8*

Zur Einführung von Punktmutationen wurde das Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis Kit[®] von Stratagene verwendet. Als Matrize diente das Plasmid pSK⁺PEX8FL. Zur Erzeugung der Mutationen A, C und D wurden folgende Primerpaare verwendet: PCR-A(645/646), PCR-C(685/686) und PCR-D(687/688).

Reaktion	Temperatur	Zeit
Denaturierung 1	95°C	1 min.
Denaturierung 2	95°C	50 sec.
Hybridisierung 3	60°C	50 sec.
Amplifikation 4	68°C	10 min.
Amplifikation 5	68°C	7 min.
Ende 6	4°C	unendlich

Schritt 2-4 wurden 18 mal wiederholt. Alle weiteren Schritte erfolgten genau nach Protokoll.

2.7.15 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte nach dem Yeast Protocols Handbook[®] von Clontech (Palo Alto, USA). Hefezellen wurden ü.N. in dem geeigneten SD-Medium angezogen und dann nacheinander einer Lyticase-, SDS- und Schockfrostbehandlung unterzogen. Mit Hilfe von

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die Plasmid-DNA extrahiert und nachfolgend gefällt.

2.7.16 Präparation chemisch kompetenter Zellen von *S. cerevisiae* und Transformation

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde die Lithium-Acetat-Methode nach Gietz eingesetzt (Gietz *et al.*, 1992). 300 ml YPD- bzw. entsprechendes SD-Medium wurden mit einer Übernacht-Kultur des entsprechenden Stammes so angeimpft, dass sich eine OD_{600nm} von 0,3 ergab. Die Kultur wurde bei 30°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 geschüttelt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (7000 rpm, 8 min, 4°C, SLA 3000 Rotor) geerntet. Nach einem Waschschrift in H₂O wurde das Zellpellet in 1,5 ml eiskalter LiAc-TE-Lsg. auf Eis resuspendiert, anschließend konnten die Zellen sofort zur Transformation verwendet werden. Für eine Hefetransformation wurde zunächst gescherte Lachssperma-DNA (10 mg/ml) durch zehnteinütiges Kochen denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. 50 µl dieser DNA-Lösung wurden dann zu 100 µl kompetenten Hefezellen gegeben. Anschließend wurden 1 µg Plasmid-DNA und 600 µl LiAc-TE-PEG-Lsg. hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde dann 30 min bei RT geschüttelt. Danach erfolgte ein zehnteinütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden dann ca. 10 sec bei 10000 rpm (Tischzentrifuge) pelletiert, in 100 µl 1x TE aufgenommen und auf entsprechenden SD-Platten ausplattiert.

10x TE

100 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA

10x LiAc

1 M Li-Acetat, pH 8,0

LiAc-TE-Lösung

1 ml 10x LiAc
1 ml 10x TE
8 ml H₂O

LiAc-TE-PEG-Lösung

1 ml 10x LiAc
1 ml 10x TE
50 % (w/v) PEG

2.7.17 Präparation elektrokompetenter Zellen von *S. cerevisiae* und Transformation

Die Elektroporation erfolgte nach dem Protokoll von Biorad (MicroPulser, Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide, Cat.Nr: 165-2100). 500 ml YPD wurden mit einer Übernachtskultur von *S. cerevisiae* angeimpft und wuchsen bis zu einer Zelldichte von $\sim 1 \times 10^8$ Zellen/ml. Anschließend wurden die Zellen für 15 min. auf Eis inkubiert, danach abzentrifugiert (3000 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet auf Eis gehalten. Die Zellen wurden in ~ 50 ml eiskaltem sterilem Wasser aufgenommen, erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml sterilem eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen und erneut abzentrifugiert (3000 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 0,5 ml sterilem, eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen. Das Endvolumen der Zellen sollte $\sim 1,3$ ml betragen, die Zellkonzentration sollte bei $\sim 1 \times 10^{10}$ Zellen / ml liegen. Die Zellen wurden auf Eis aufbewahrt und so schnell wie möglich für die Elektroporation verwendet.

Zur Elektroporation wurde der Micropulser von Biorad (München, D) verwendet. Beim Einsatz von 0,2 cm Küvetten wurden 40 μ l kompetente Zellen verwendet und das Programm „Sc2“ benutzt, bei 0,4 cm Küvetten wurden 80 μ l kompetente Zellen eingesetzt und das Programm „Sc4“ verwendet. Die DNA (5-100 ng) wurde in sterile 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und mit den Zellen für ~ 5 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde in die jeweiligen Küvetten überführt. Die Küvetten wurden in die Pulschamber zwischen die beiden Kontakte gesetzt und es erfolgte ein Puls. Die Küvetten wurden der Kammer sofort entnommen und den Zellen 600 μ l YPD zugegeben. Die Zellen wurden direkt oder nach 1 stündiger Inkubation (30°C, 200 rpm) auf geeignetem Selektionsmedium ausplattiert.

2.8 Protein-Biochemische Methoden

2.8.1 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)

2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli 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 h bei 25 mA.

5x Lauffpuffer (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.

2.8.3 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 h. Zur Überprüfung des Proteintransfers erfolgte vor der Immundetektion eine kurze Amidoschwarz-Färbung der Membran. Um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran anschließend für 1 h in Blocking-Puffer inkubiert. Die darauf folgende 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 ECL-Hyperfilms (Amersham-Pharmacia, Braunschweig, D). Zur Entwicklung des Filmes wurde eine SRX 101A-Anlage der Fa. Konica (Hohenbrunn, D) verwendet.

Blotpuffer, pH 9,0

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

Amido-Schwarz-Färbelösung

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

Waschpuffer

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

Blocking-Puffer

Waschpuffer mit 5% (w/v) Magermilch

2.9 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

2.9.1 Medien und Wachstumsbedingungen

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* auf Agarplatten und in Submerskulturen erfolgte bei 30°C. Je nach Fragestellung variierten die zugesetzten Kohlenstoffquellen und Aminosäurezusammensetzungen (Erdmann *et al.*, 1989). Der pH-Wert wurde immer auf 6,0 eingestellt. YNO-Medium diente zur Induktion der Peroxisomenproliferation und wurde als Konzentrat zur SD-Vorkultur hinzugefügt. Die Ölsäure wurde vor der Zugabe zum Medium mit Tween 40 emulgiert. Festagarplatten wurden durch Hinzufügen von 2 % (w/v) Select Agar zu den Medien hergestellt. Auxotrophe Bedingungen wurden nach Ausubel (5) eingehalten. Die Medien wurden bei 120°C für 30 min autoklaviert. Die Herstellung der Medien für Two-Hybrid-Stämme erfolgte nach Angaben des „Yeast Protocols Handbook“ (Clontech Laboratories, Inc., USA).

YPD

1% (w/v) Hefeextrakt
2% (w/v) Pepton
2% (w/v) Glukose

SD

0,17% (w/v) Hefe-Stickstoff-Basis
(ohne Aminosäuren)
0,5% (w/v) Ammoniumsulfat
0,3% (w/v) Glukose
1% (v/v) Aminosäuren

YNO (5xYN,10xO)

0,85% (w/v) Hefe-Stickstoff-Basis
(ohne Aminosäuren)
0,5% (w/v) Hefeextrakt
2,5% (w/v) Ammoniumsulfat
5% (v/v) Aminosäuren
1% (v/v) Ölsäure
1% (v/v) Tween 40

100x Markerlösung

L-Adenin 400 mg/100 ml
L-Histidin 200 mg/100 ml
L-Leucin 600 mg/100 ml
L-Lysin 300 mg/100 ml
L-Tryptophan 400 mg/100 ml
Uracil 200 mg/100 ml

10x Markerlösung für Hefe Two-Hybrid-Medien

L-Isoleucin 30 mg/100 ml
L-Valin 150 mg/100 ml
L-Adenin 20 mg/100 ml
L-Arginin 20 mg/100 ml
L-Histidin 20 mg/100 ml
L-Leucin 100 mg/100 ml
L-Lysin 30 mg/100 ml
L-Methionin 20 mg/100 ml
L-Phenylalanin 50 mg/100 ml
L-Threonin 200 mg/100 ml
L-Tryptophan 20 mg/ml
Uracil 20 mg/ml

2.9.2 Dauerkulturen

Um Hefestämme über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden Zellen aus einer stationär gewachsenen Flüssigkultur im Verhältnis 1:1 mit 87%igem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.9.3 Ölsäure-Wachstumstest

Die zu analysierenden *S. cerevisiae* Stämme wurden in 0,3% SD-Medium kultiviert, geerntet und in sterilem H_2O aufgenommen. Nach Bestimmung der optischen Dichte dieser Hefeverdünnung wurde eine relative Zellzahl von 2×10^4 , 2×10^3 und 2×10^2 auf Ölsäure-Platten getüpfelt ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 1$ entspricht ca. 3×10^6 Zellen). Die Inkubation erfolgte bei 30°C für mindestens 7 Tage. Wachstumsunterschiede und das Erscheinen der charakteristischen klaren Höfe um die Kolonien herum zeigten Wachstumsfähigkeit auf Ölsäure.

2.9.4 Anzucht für biochemische Analysen

Die erste Vorkultur mit 10 ml SD-Medium wurde von einer Festagarplatte beimpft und über Nacht bei 30°C bei 160 rpm auf einem Rundschüttler inkubiert. Weitere Vorkulturen in SD-Medium wurden jeweils auf eine optische Dichte von $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,03 - 0,1$ ($9 \times 10^5 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml) angeimpft und bis zu ihrer mittleren logarithmischen Phase ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 1,0 - 1,5$) inkubiert. Die Hauptkulturen wurden bei einer Zelldichte von ca. $3 \times 10^7 - 4,5 \times 10^7$ Zellen/ml mit konzentriertem YNO-Medium versetzt. Die Inkubation erfolgte für 12 h bei 30°C . Nachfolgend wurden die Zellen wie unter 2.11 beschrieben behandelt.

2.9.5 Anzucht zur mikroskopischen Analyse

Die Transformanten wurden auf 0,3% Glukose enthaltenen SD-Festagarplatten angezogen und anschließend auf Ölsäureplatten überführt. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen wurde etwas Zellmaterial in H_2O eingerührt, zu gleichem Anteil mit einer niedrig schmelzenden Agarose versetzt und auf einem Objektträger fixiert.

2.10 Zellaufschluss nach Yaffe und Schatz

Um denaturierte Hefe-Rohlysate zu erhalten, wurden diese nach Yaffe und Schatz (246) aufgeschlossen. Nach der Anzucht der Zellen wurden 30 mg Zellmaterial mit 148 μ l 2 M NaOH, 12 μ l β -Mercaptoethanol ad. 1 ml H₂O versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden der Ansatz mit 160 μ l 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 mit 1 M Tris-Base gewaschen, erneut sedimentiert und in SDS Probenpuffer resuspendiert, für 5 min. bei 95°C erhitzt und anschließend für die SDS-Gelelektrophorese verwendet.

SDS-Probenpuffer

140 μ l Tris-Base in 12,5% SDS

160 μ l 50% (v/v) Glycerin

90 μ l 1 M DTT

10 μ l 0,1% Bromphenolblau

2.11 Herstellung des Post-Nuklearen Überstandes

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte nach beschriebenen Induktionsbedingungen. Die Zellen wurden sedimentiert (Sorvall, SLA3000, 5.000 rpm, 5 min., 4°C) und mit Wasser gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation von 10 min. in DTT-Puffer (30°C, 50 rpm). Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Zum Verdau der Zellwand wurden die Zellen in Sorbitol-Puffer (30°C) aufgenommen, mit 1.000 U Lytikase/g FG versetzt und für 45-60 min. (30°C, 50 rpm) 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 Aufschluss-Puffer (2 ml /g FG) resuspendiert und im Homogenisator (Braun, Melsungen, D) zunächst 3 x 500 rpm dann 2 x 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 Zentrifugation wurde mehrfach wiederholt, bis kein Sediment mehr sichtbar war. Das daraus resultierende

zellfreie Homogenat (PNS, post-nuclear-supernatant) wurde wie unter 2.12, 2.13, 2.14 beschrieben weiter verarbeitet.

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
50 µM Benzamidin
1 mM NaF

"Complete"-Protease-Inhibitoren

2.12 Sedimentation von Organellen durch differentielle Zentrifugation

Anzucht und Aufarbeitung der Zellen erfolgte wie unter 2.9.4, 2.11 beschrieben. Das zellfreie Homogenat wurde auf 4 ml eines 0.5 M Saccharosekissens (in Aufschlusspuffer) aufgetragen und 30 min. bei 20.000 x g (Sorvall SS34) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entnommen und Pellet im Verhältnis zum Überstand in Aufschlußpuffer resuspendiert. Die Proben wurden wie unter 2.8 weiter verarbeitet.

2.13 Fraktionierung von Organellen durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Für die Auftrennung von zellfreien Homogenaten wurden 32-54%(w/w)ige Saccharosedichtegradienten verwendet. Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurden auf 2 ml eines 60%(w/w) Kissens 24 ml des Gradienten in 33 ml fassende Polyallomerröhrchen (Sorvall, USA) gegossen. Der Gradient wurde vollständig mit dem jeweiligen PNS überschichtet, mit einem Crimper verschlossen und zentrifugiert (Sorvall, SV288, 19.500 rpm, 3 h, 4°C).

Anschließend wurden vom Boden des Gefäßes 27 Fraktionen mit einem Volumen von 1,2 ml gesammelt. Die Proben wurden wie unter 2.8 beschrieben weiter verarbeitet.

Gradienten-Puffer

5 mM MES, pH 6,0

1 mM EDTA

1 mM KCl

0,1% (v/v) Ethanol

2.14 Fraktionierung von Organellen durch Flotationsgradienten-Zentrifugation

Für die Auftrennung von zellfreien Homogenaten wurden diskontinuierliche Flotationsgradienten verwendet. Das PNS wurde mit gemörserter Saccharose vorsichtig auf eine Konzentration von 50% (w/w) eingestellt und auf folgende Weise geschichtet: 7 ml 50%(w/w) PNS wurden in 33 ml Polyallomerröhrchen gegeben und mit 5 ml 46%(w/w)iger, 15 ml 38%(w/w)iger und 5 ml 25 %(w/w)iger Gradientensaccharoselösung überschichtet. Nach Verschließen der Röhrchen mit einem Crimper erfolgte die Zentrifugation (Sorvall, SV288, 19.500 rpm, 4 h, 4°C). Anschließend wurden vom Boden des Gefäßes 27 Fraktionen mit einem Volumen von 1,2 ml gesammelt. Die Proben wurden wie unter 2.8 beschrieben weiter verarbeitet.

2.15 Limitierte Proteolyse von Zellorganellen

Die limitierte Proteolyse von Proteinen mit Proteinase K wurde nach Crane (27) durchgeführt. Zellen wurden wie unter 2.9.4 angegeben angezogen, wie unter 2.11 aufgeführt aufgearbeitet und ein Organellensediment (2.12) hergestellt. Das Sediment wurde in 1 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Es wurde aliquotiert und in An- oder Abwesenheit von 0,1% Triton x 100 mit variierenden Mengen Proteinase K versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation der Proben auf Eis erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms mittels PMSF (Endkonzentration 4mM). Die Proben wurden anschließend wie unter 2.8.1 beschrieben gefällt und das erhaltene Proteinsediment in 60 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert.

2.16 Analyse zur Membranassoziation von Pex8p

Die Zellen wurden wie unter 2.9.4 angegeben angezogen, wie unter 2.11 aufgeführt aufgearbeitet, das PNS in 4 Aliquots geteilt und jeweils ein Organellensediment (2.12) hergestellt. Die Sedimente wurden je in 1 ml wie folgt resuspendiert:

Aliquot 1 in Aufschlusspuffer (2.11), Aliquot 2 in 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM PMSF, Aliquot 3 in 10 mM Tris/HCL pH 8.0, 500 mM KCl, 1 mM PMSF und Aliquot 4 in 0,1 M Na₂CO₃, pH 11,5, 1 mM PMSF. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden Aliquots 2-4 zentrifugiert (200.000 x g, 22 min). Die Überstände wurden abgenommen und auf Eis gestellt. Die Extraktion der Aliquots 2 - 4 mit den jeweiligen Puffern wurde wiederholt. Nach 30 miütiger Inkubation auf Eis wurden die Suspensionen mit 0,5 ml 0,5 M Sucrose unterschichtet und erneut zentrifugiert (200.000 x g, 22 min). Die Überstände der ersten und zweiten Zentrifugation wurden vereint und mit TCA gefällt, Aliquot 1 wurde ebenfalls gefällt, die Proben wurden in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgeommen. Die Sedimente wurden ebenfalls in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.17 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der Lokalisation von GFP- und Ds-Red-Reporterproteinen in *S. cerevisiae* wurde ein LSM 510 Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss) eingesetzt (Institut für Pharmakologie, AG PD Dr. Michael Schäfer). Es wurde ein Plan-Neofluar-Objektiv (100x/1.3 Oil) benutzt. Die Fluoreszenzen wurden mit folgenden Einstellungen gescannt und anschließend mit dem Programm LSM 5 Image Browser (Zeiss) bearbeitet.

	Excitation Wavelength	Beamsplitter	Emissionfilter	Pinhole
GFP	488 nm, 14%	HFT 488/543	BP 505-550	177 µm
Ds-Red	543 nm, 53-100%	NFT 545	571-646	283 µm

2.18 Hefe Two-Hybrid-Methoden

2.18.1 β -Galaktosidase Filtertest und Wachstumstest

Der β -Galaktosidase Filtertest erfolgte nach Clontech (Yeast Protocols Handbook, PT3024-1). Mit Filterpapier wurden von frischen Hefekolonien Filterabzüge hergestellt. Die Filter wurden mit den Kolonien nach oben in flüssigen Stickstoff gelegt und nach ca. 10 Sekunden bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Filter mit den Kolonien nach oben auf Whatmanpapier gelegt, welches mit Z-Puffer / X-Gal Lösung getränkt wurde. Die Inkubation der Filter bei 30°C erfolgte maximal 8 h (> 8 h erzeugt falsch positive Signale).

Für den Wachstumstest der Two-Hybrid-Transformanten auf SD-Medium wurden die Zellen auf entsprechende Selektivplatten gestempelt und 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

Z-Puffer

Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O	16,1 g/L
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	5.50 g/L
KCl	0,75 g/L
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,246 g/L

einstellen auf pH 7,0, autoklavieren

X-Gal Stocklösung

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid in N,N-Dimethylformamid (DMF) lösen (20 mg/ml). Dunkle Lagerung bei -20°C.

Z-Puffer / X - Gal Lösung

100 ml Z - Puffer

0,27 ml β - Mercaptoethanol

1,67 ml X - Gal Stocklösung