

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| Geräte | Lieferant |
|--|---------------------------------------|
| Allgemeine Glaswaren | Schütt, Göttingen |
| Autoklav „Sanoclav“ | Wolf, Geislingen |
| Brutschränke | Heraeus, Hanau |
| Eppendorf-Thermomixer und -Tischzentrifuge | Schütt, Göttingen |
| Elektrophoresekammer für Agarose-Gele | Institutswerkstatt |
| Elektrophoresekammer für Polyacrylamid-Gele | BioRad, Richmond (USA) |
| Elektroporationsgerät | BioRad, Richmond (USA) |
| Inkubationsschüttler | New Brunswick, Edison (USA) |
| Mikromanipulator | Singer Instruments, Watchet (England) |
| Mikroskope | Leitz, Wetzlar bzw. Zeiss, Göttingen |
| PCR-Gerät, PTC-100 [®] Thermal Cycler | BioRad, Richmond (USA) |
| PCR-Gerät, RoboCycler 40 Gradient | Stratagene, La Jolla (USA) |
| Photometer Uvikon 860 | Kontron Instruments, Eching |
| Röntgenfilm Entwicklermaschine Gevamatik 60 | AGFA Gevaert, Hannover |
| Tischphotometer Eppendorf | Eppendorf, Hamburg |
| Transilluminatoren 302 nm und 360 nm | Bachofer, Reutlingen |
| Vortex Genie [™] | Bender & Holbein, Zürich (Schweiz) |
| Lumi-Imager [™] | Roche, Mannheim |
| Zentrifugen Sorvall RC-5B, RC-3B und entsprechende Rotoren | DuPont Instruments, Bad Homburg |

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterialien | Lieferant |
|--|-----------------------------------|
| DNA-Aufreinigungssäulen | Qiagen, Hilden |
| Filter Whatman 541 | Whatman, Maidstone (England) |
| Kulturschalen | Nunc, Wiesbaden |
| Nitrocellulose-Membranfilter, BA 85 | Schleicher & Schüll, Dassel |
| Polypropylenröhrchen, 15 ml und 50 ml Falcon | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Röntgenfilme Biomax | Eastman Kodak, Rochester NY (USA) |

2.1.3 Chemikalien

Es wurden handelsübliche Chemikalien der Qualitätsstufe p.A. von J. T. Baker (Deventer, Holland), Serva (Heidelberg), Merck AG (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) verwendet.

Zusätzlich wurden spezielle Chemikalien von nachfolgenden Firmen bezogen:

| Chemikalie | Lieferant |
|---|---|
| Farbmarkierter Proteingrößenstandard für Acrylamidgele („Rainbow Standard“) | BioRad, Richmond (USA) und NewEngland Biolabs, Schwalbach |
| Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) | Promega GmbH, Mannheim |
| Complete EDTA-free Proteinase-Inhibitor-Mix | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Tran ³⁵ S-labeling Mix | ICN (14 mCi/ml), Meckenheim |
| AGFA G150 Röntgenfilm-Entwicklerlösung und AGFA G354 Rapid Fixierer Lösung | A. Topf, Bielefeld |

2.1.4 Medienzusätze

| Medienzusatz | Lieferant |
|--|---|
| Bacto-Agar, -Pepton, -Trypton, -Yeast-Extract und -Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids | Difco, Detroit MI (USA) |
| Ampicillin Natriumsalz | AppliChem, Biolith Diagnostica, Göttingen |
| Adeninsulfat und Uracil | Merck AG (Darmstadt) |
| Aminosäuren (Histidin, Leucin, Lysin, Tryptophan, Cystein, Methionin) | Serva, Heidelberg |
| Genitacin | GibcoBRL Life Technologies |
| Kanamycin | Serva, Heidelberg |
| 5'-Fluoroorotatsäure (5'-FOA) | AppliChem, Biolith Diagnostica, Göttingen |

2.1.5 Antikörper

| Antikörper | Hergestellt von |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Polyklonaler anti-CPY Antikörper | Abt. Molekulare Genetik |
| Polyklonaler anti-Sed5p-Antikörper | Abt. Molekulare Genetik |
| Polyklonaler anti-Sec22p-Antikörper | Abt. Molekulare Genetik |
| Polyklonaler anti-Bos1p-Antikörper | Abt. Molekulare Genetik |
| Polyklonaler anti-Bet1p-Antikörper | Abt. Molekulare Genetik |
| Polyklonaler anti-Ufe1p-Antikörper | M. Lewis, London |
| Monoklonaler anti-HDEL-Antikörper | M. Lewis, London |

| Antikörper | Hergestellt von |
|--|---|
| Polyklonaler anti-Emp47p-Antikörper | S. Schröder, Abt. Molekulare Genetik |
| Polyklonaler anti-Kar2p-Antikörper | Abt. Molekulare Genetik |
| Polyklonaler anti- <i>c-myc</i> -Antikörper (A14) | Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz (USA) |
| Monoklonaler anti- <i>c-myc</i> -Antikörper (9E10) | Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz (USA) |
| Cy2-konjugierter, sekundärer Schaf-anti-Kaninchen-IgG | Sigma, Deisenhofen |
| Cy3-konjugierter, sekundärer Schaf-anti-Kaninchen-IgG | Sigma, Deisenhofen |
| Cy2-konjugierter, sekundärer Schaf-anti-Maus-IgG | Sigma, Deisenhofen |
| Cy3-konjugierter, sekundärer Schaf-anti-Maus-IgG | Sigma, Deisenhofen |
| Peroxidase-konjugierter sekundärer Esel-anti-Kaninchen-IgG | Amersham Buchler, Braunschweig |
| Peroxidase-konjugierter sekundärer Schaf-anti-Maus-IgG | Amersham Buchler, Braunschweig |

2.1.6 Enzyme und Kits

| Enzyme und Kits | Lieferant |
|---|---|
| β -Glucuronidase/Arylsulfatase aus <i>Helix pomatia</i> | Roche, Mannheim |
| T4-DNA-Ligase | Roche, Mannheim |
| Deep-Vent-DNA-Polymerase aus <i>Thermococcus litoralis</i> | New England Biolabs, Schwalbach |
| Pfu-Turbo Polymerase | Stratagene, Amsterdam (Niederlande) |
| Taq-DNA-Polymerase | Perkin Elmer und New England Biolabs, Schwalbach |
| Zymolyase-6000 aus <i>Arthrobacter luteus</i> | Seikagaku Kogyo Company, Tokyo (Japan) |
| Lytikase aus <i>Arthrobacter luteus</i> (Reinheitsgrad: „partially purified“) | Sigma, Deisenhofen |
| Restriktionsendonukleasen und DNA modifizierende Enzyme | New England Biolabs, Schwalbach und Roche, Mannheim |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| Qiagen Plasmid Kit (Midi /Maxi) | Qiagen, Hilden |
| ECL-Western Blotting Detection Reagents | NEN Life Science Products, Belgium |

2.1.7 Bakterienstämme

Escherichia coli:

| Stamm | Genotyp | Quelle |
|------------------------|--|----------------------------|
| DH5 α | <i>F'/endA1hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 glnV44 thi-1 recA1 gvrA (Nal^r) relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR (ϕ80dlacΔ(lacZ)M15)</i> | Gibco BRL, Eggenstein |
| XL1-Blue | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i> | Stratagene, La Jolla (USA) |
| XL10-GOLD [®] | <i>Tet^r Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Tn5 (Kan^r) Amy]</i> | Stratagene, La Jolla (USA) |

2.1.8 Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae:

| Stamm | Bezeichnung | Genotyp | Quelle |
|--------|---------------------------------|--|-----------------------|
| BY4742 | Wildtyp | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> | Euroscarf |
| RC898 | | MAT α <i>bar1-1 sst2-1 leu2 trp5 ade2 can1</i> | H. Riezman, Basel |
| Y15177 | <i>sec22Δ</i> | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 sec22::KanMX4</i> | Euroscarf |
| RSY280 | <i>sec22-3</i> | MAT α <i>sec22-3 ura3-52</i> | R.Scheckman, Berkeley |
| NSY77 | <i>bet1-1</i> | MAT α <i>bet1-1 ura3-52</i> | S. Ferro-Novick, Yale |
| Y21396 | | BY4743 Mata/ α <i>his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δura30 Δ0/ura3Δ0 BET1/BET1::KanMX4</i> | Euroscarf |
| YCG7 | | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 bet1::KanMX4 sec22::LEU2 +pCG36-BET1</i> | Diese Arbeit |
| YCG76 | <i>bet1R</i> | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 bet1::KanMX4 + pCG27-bet1S86R</i> | Diese Arbeit |
| YCG8 | <i>bet1R/sec22Q</i> | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 bet1::KanMX4 sec22::LEU2 +pCG64-bet1S86R-sec22R157Q</i> | Diese Arbeit |

| Stamm | Bezeichnung | Genotyp | Quelle |
|--------|---------------------------------------|---|--------------|
| Y21581 | | BY4743 Mata/ α <i>his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 SED5/SED5::KanMX4</i> | Euroscarf |
| YCG15 | <i>sed5R</i> | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sed5::KanMX4 +pCG32-sed5Q283R</i> | Diese Arbeit |
| YCG74 | | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 sed5::KanMX4 +pCG51-sed5Q283R</i> | Diese Arbeit |
| YCG2 | | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 sed5::KanMX4sec22::LEU2 +pCG34-SED5</i> | Diese Arbeit |
| YCG2_1 | <i>sed5R/sec22Δ</i> | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 sed5::KanMX4 sec22::LEU2 + pCG163-sed5Q283R</i> | Diese Arbeit |
| YCG3 | <i>sed5R/sec22Q</i> | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 sed5::KanMX4 sec22::LEU2 +pCG62-sed5Q283R-sec22R157Q</i> | Diese Arbeit |
| Y22689 | | BY4743 Mata/ α , <i>his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 BOS1/bos1::KanMX4</i> | Euroscarf |
| YCG9 | | MAT α <i>met15Δ0 ura3Δ0 bos1::KanMX4 + pCG8-bos1Q186R + pUA4-sec22R157Q</i> | Diese Arbeit |
| YCG38 | <i>bos1R/sec22Q</i> | MAT α <i>his3Δ1 ura3Δ0 leu2Δ0 bos1::KanMX4 sec22::KanMX4 + pCG8-bos1Q186R + pUA4-sec22R157Q</i> | Diese Arbeit |
| YCG84 | | MAT α <i>lys2Δ0 sed5::KanMX4 sec22::LEU2 bet1::KanMX4 + pCG64-bet1S86R-sec22R157Q + pCG34-SED5</i> | Diese Arbeit |
| YCG103 | <i>sed5R/bet1R</i> | MAT α <i>lys2Δ0 sed5::KanMX4 sec22::LEU2 bet1::KanMX4 +pCG64-bet1S86R-sec22R157Q + pCG32-sed5Q283R</i> | Diese Arbeit |
| Y21851 | | BY4743 Mat a/ α , <i>his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 UFE1/ufe1::KanMX4</i> | Euroscarf |
| YCG80 | <i>ufe1R</i> | MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 ufe1::KanMX4 + pCG5- ufe1Q289R</i> | Diese Arbeit |

2.1.9 Plasmide

| Plasmid | Beschreibung | Quelle |
|----------------------|--|------------------------------|
| pUA4 | <i>sec22-R157Q</i> in pRS313 (CEN6- <i>HIS3</i>) | H.D. Schmitt |
| pUA8 | <i>SEC22</i> in pRS313 (CEN6- <i>HIS3</i>) | H.D. Schmitt |
| pSPT18- <i>SLY12</i> | 1.8 kb <i>BET1</i> HindIII/NcoI in pSPT18 | Dascher <i>et al.</i> , 1991 |
| pCG36 | 1.8 kb <i>BET1</i> Hind III/SacI in pRS316 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |
| pCG27 | 1.8 kb <i>bet1-S86R</i> HindIII/SacI in pRS316 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |
| pCG39 | 1.8 kb <i>bet1-S86Q</i> in pRS316 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |
| pCG64 | 1.8 + 1.5 kb <i>bet1-S86R</i> XbaI/SacI, <i>sec22-R157Q</i> in pRS313 (CEN6- <i>HIS3</i>) | Diese Arbeit |
| pUA43 | <i>SED5</i> in pRS325 (2 μ - <i>LEU2</i>) | H.D. Schmitt |
| pCG34 | 3 kb <i>SED5</i> in pRS316 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |
| pCG32 | 3 kb <i>sed5-Q283R</i> in pRS316 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |
| pCG51 | 3 kb <i>sed5-Q283R</i> in pRS315 (CEN6- <i>LEU2</i>) | Diese Arbeit |
| pCG163 | 3 kb <i>sed5-Q283R</i> in pRS317 (CEN6- <i>LYS2</i>) | Diese Arbeit |
| pCG62 | 3 + 1,5 kb <i>sed5-Q283R</i> SalI in XhoI, <i>sec22-R157Q</i> in pRS313 (CEN6- <i>HIS3</i>) | Diese Arbeit |
| pUA37 | <i>BOS1</i> in pRS315 (CEN6- <i>LEU2</i>) | Andag <i>et al.</i> , 2001 |
| pCG69 | 1.8 kb <i>bos1-Q186R</i> in pRS315 (CEN6- <i>LEU2</i>) | Diese Arbeit |
| pCG161 | 1.8 kb <i>bos1-Q186R</i> in pRS316 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |
| pTN75 | <i>UFE1</i> in pRS316 (CEN6- <i>URA3</i>) | H.D. Schmitt |
| pCG5 | 1.8 kb <i>ufe1-Q289R</i> in pRS316 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |
| pUA65 | <i>YKT6</i> in pRS315 (CEN6- <i>LEU2</i>) | H.D. Schmitt |
| pCG165 | <i>YKT6</i> BamHI/XhoI in pRS316 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |
| pBK87 | 1.1 kb <i>ykt6-R165Q</i> in pRS315 (CEN6- <i>LEU2</i>) | Dilcher <i>et al.</i> , 2001 |
| pCG60 | <i>ykt6-R165Q</i> BamHI/EcoRI in pRS316 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |
| pCG170 | 1.8 kb <i>bet1-S86Q</i> XhoI/KpnI in pCG60 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |
| pCG172 | 1.8 kb <i>bet1-S86Q</i> XhoI/KpnI in pCG165 (CEN6- <i>URA3</i>) | Diese Arbeit |

2.1.10 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden entweder von IBA-Naps in Göttingen oder MWG Biotech GmbH in Ebersberg bezogen. Für Mutagenese- und PCR-Ansätze wurden HPLC-gereinigte, für Sequenzierungen wurden Oligonukleotide in Auftrag gegeben. In der Regel wurde ein Synthesemaßstab von 0,05 µmol gewählt. Für PCR-Ansätze und DNA-Sequenzierungen wurden Verdünnungen von 10 pmol/µl eingesetzt.

| Bezeichnung | Sequenz | Zweck |
|-------------------|--|---|
| fBET1SQ | 5'-GAT GAG ATC CGC GGC CAG AAT CAA ACT-3' | Mutagenese-Primer |
| rBET1SQ | 5'-AGT TTG ATT CTG GCC GCG GAT CTC ATC-3' | Mutagenese-Primer |
| fBET1SR | 5'-GAT GAG ATC CGC GGC CGC AAT CAA ACT-3' | Mutagenese-Primer |
| rBET1SR | 5'-AGT TTG ATT GCG GCC GCG GAT CTC ATC-3' | Mutagenese-Primer |
| fBOS1QR | 5'-CGA AAA TAT TGT GGA ACG AAA CAA AAT TTT-3' | Mutagenese-Primer |
| rBOS1QR | 5'-AAA ATT TTG TTT CGT TCC ACA ATA TTT TCG-3' | Mutagenese-Primer |
| fUFE1QR | 5'-CAT TTA ACG GTG AGA TCT CAA AAT ATA AA-3' | Mutagenese-Primer |
| rUFE1QR | 5'-TTT ATA TTT TGA GAT CTC ACC GTT AAA TG-3' | Mutagenese-Primer |
| fSED5QR | 5'-CCA TGG TGC AGG AAC GGG GCG AAG-3' | Mutagenese-Primer |
| rSED5QR | 5'-CTT CGC CCC GTT CCT GCA CCA TGG-3' | Mutagenese-Primer |
| HR_SEC22Δ_ for | 5'-CTG ACA GTG ACA CCC CGT TAC ACA CTC ACA ATT AAG TAG GGG GCG CCT GAT TCA AGA AAT ATC-3' | Deletionsprimer für den Austausch von <i>SEC22</i> durch die <i>LEU2</i> -Kassette |
| HR_SEC22Δ_ rev | 5'-CAA ATT GAT CGG GAT TTG TGA TGT GGG ATG ATG GGG TGA CGT GGG AAA TGG TTC AAG AAG GTA-3' | Deletionsprimer für den Austausch von <i>SEC22</i> durch die <i>LEU2</i> -Kassette |
| PCR_LEU_f | 5'-ATG TCT GCC CCT AAG AAG ATC-3' | Primer zur PCR-Kontrolle der <i>LEU2</i> - Kassette |
| PCR_LEU_r | 5'-GGC GAC AGC ATC ACC GAC TTC-3' | Primer zur PCR-Kontrolle der <i>LEU2</i> - Kassette |
| PCR_SEC22_f | 5'-GTT ACA CAC TCA CAA TTA AGT AGG-3' | Primer zur PCR-Kontrolle der Deletion von <i>SEC22</i> |
| PCR_SEC22_r | 5'-GGA CCA AAT TGA TCG GGA TTT G-3' | Primer zur PCR-Kontrolle der Deletion von <i>SEC22</i> |
| KanB | 5'-CTG CAG CGA GGA GCC GTA AT-3' | Primer zur PCR-Kontrolle der KanMX- Kassette (Wach <i>et al.</i> , 1994) |

| Bezeichnung | Sequenz | Zweck |
|-------------|-------------------------------------|---|
| KanC | 5'-TGA TTT TGA TGA CGA GCG TAA T-3' | Primer zur PCR-Kontrolle der KanMX-Kassette (Wach <i>et al.</i> , 1994) |
| f-pRS313 | 5'-CGA CGG CCA GTG AAT TGT-3' | Sequenzierung pRS-Vektoren |
| r-pRS313 | 5'-GCT ATG ACC ATG ATT ACG C-3' | Sequenzierung pRS-Vektoren |
| CG3 | 5'-CTC GCG CCT TTT GCC AAG GAA-3' | Sequenzierung <i>BET1</i> , Vorwärts-Primer |
| CG14 | 5'-CGA TAT TGG GAG TTA TTG-3' | Sequenzierung <i>BET1</i> , Vorwärts-Primer 2 |
| CG4 | 5'-ATC CTT TAT TTC ACG TAT CAA-3' | Sequenzierung <i>BET1</i> , Rückwärts-Primer |
| CG27 | 5'-CCT TGA ACT CAT CTG TGT AGC C-3' | Sequenzierung <i>BET1</i> , Primer zur Sequenzierung der 5'-UTR von <i>BET1</i> , annealt am 5'-Ende von <i>BET1</i> |
| CG28 | 5'-CCC TGA ACA GTA ACC TAG AAT G-3' | Sequenzierung <i>BET1</i> , Primer 2 zur Sequenzierung der 5'-UTR von <i>BET1</i> , annealt in 5'-UTR von <i>BET1</i> |
| CG29 | 5'-GGG TAT GGA TTA CAT AAA-3' | Sequenzierung <i>BET1</i> , Primer zur Sequenzierung der 3'-UTR von <i>BET1</i> , annealt am 3'-Ende von <i>BET1</i> |
| CG49 | 5'-TGC CGT TCC CGT GGA TTA TGT C-3' | Sequenzierung <i>BET1</i> , Primer 2 zur Sequenzierung der 3'-UTR von <i>BET1</i> , annealt in 3'-UTR von <i>BET1</i> |
| CG50 | 5'-GAT CCA TAT GGG GAA TCT CTT C-3' | Sequenzierung <i>BET1</i> , Primer 3 zur Sequenzierung der 3'-UTR von <i>BET1</i> , annealt in 3'-UTR von <i>BET1</i> |
| CG1 | 5'-TGG AGA AGG AAA CAC GGC AAT-3' | Sequenzierung <i>BOS1</i> , Vorwärts-Primer |
| CG6 | 5'-ACA GGA TCT GCA CGA CTT TAC-3' | Sequenzierung <i>BOS1</i> , Vorwärts-Primer 2 |
| CG2 | 5'-CCC TTA TAA TGA TGC ATG TAT-3' | Sequenzierung <i>BOS1</i> , Rückwärts-Primer |
| CG13 | 5'-AAT TAA CGC GAT CCA AAA GAC-3' | Sequenzierung <i>BOS1</i> , Rückwärts-Primer 2 |
| CG57 | 5'-AAG TCA CGA TAA TAT CTG CAC-3' | Sequenzierung <i>BOS1</i> , Primer zur Sequenzierung der 5'-UTR von <i>BOS1</i> , annealt am 5'-Ende von <i>BOS1</i> |
| CG58 | 5'-TAC CTT GCG CAG CCT AGT GGC-3' | Sequenzierung <i>BOS1</i> , Primer 2 zur Sequenzierung der 5'-UTR von <i>BOS1</i> , annealt in 5'-UTR von <i>BOS1</i> |
| CG59 | 5'-GTC TTT TGG ATC GCG TTA ATT-3' | Sequenzierung <i>BOS1</i> , Primer zur Sequenzierung der 3'-UTR von <i>BOS1</i> , annealt am 3'-Ende von <i>BOS1</i> |
| CG60 | 5'-GTT CAT TGG CTT AGC GCA TTT C-3' | Sequenzierung <i>BOS1</i> , Primer 2 zur Sequenzierung der 3'-UTR von <i>BOS1</i> , annealt in 3'-UTR von <i>BOS1</i> |
| CG7 | 5'-CTG CCA ACA AGG AAA GAT CTC-3' | Sequenzierung <i>UFE1</i> , Vorwärts-Primer |
| CG9 | 5'-AGA AAT GAG CAA AAT GGT ATA-3' | Sequenzierung <i>UFE1</i> , Vorwärts-Primer 2 |

| Bezeichnung | Sequenz | Zweck |
|-------------|--------------------------------------|---|
| CG8 | 5'-TGC ATG CCA GTA ATC CTA CAA-3' | Sequenzierung <i>UFE1</i> , Rückwärts-Primer |
| CG10 | 5'-AAG TGG TCA TTT TAG CAG TTC-3' | Sequenzierung <i>UFE1</i> , Rückwärts-Primer 2 |
| CG53 | 5'-GTT ATT CTC ATT CAT CTG AGC-3' | Sequenzierung <i>UFE1</i> , Primer zur Sequenzierung der 5'-UTR von <i>UFE1</i> , annealt am 5'-Ende von <i>UFE1</i> |
| CG54 | 5'-CCG TCA TTA TAC TGC AGC TAC-3' | Sequenzierung <i>UFE1</i> , Primer 2 zur Sequenzierung der 5'-UTR von <i>UFE1</i> , annealt in 5'-UTR von <i>UFE1</i> |
| CG55 | 5'-GGT TAA TAT CAC TTT CAT AAG-3' | Sequenzierung <i>UFE1</i> , Primer zur Sequenzierung der 3'-UTR von <i>UFE1</i> , annealt am 3'-Ende von <i>UFE1</i> |
| CG56 | 5'-GAC TTC GAC AAT AAG TGA CTG-3' | Sequenzierung <i>UFE1</i> , Primer 2 zur Sequenzierung der 3'-UTR von <i>UFE1</i> , annealt in 3'-UTR von <i>UFE1</i> |
| CG11 | 5'-CAT CGA CGC TCC TGT TAG ACC-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Vorwärts-Primer |
| CG15 | 5'-AGGAAGATTTATGCCATC-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Vorwärts-Primer 2 |
| CG12 | 5'-TTT ACT TTG CTT TTA ATT GAC-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Rückwärts-Primer |
| CG16 | 5'-TAACATTAGTTGAGAGTC-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Rückwärts-Primer 2 |
| CG21 | 5'-CCC TCT GCT GTT CTC TAA AG-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Primer zur Sequenzierung der 5'-UTR von <i>SED5</i> , annealt am 5'-Ende von <i>SED5</i> |
| CG22 | 5'-CGA TCA ATA AAC CTA CCC GG-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Primer 2 zur Sequenzierung der 5'-UTR von <i>SED5</i> , annealt in 5'-UTR von <i>SED5</i> |
| CG23 | 5'-CCC AGT TGC CAG GAG TGC-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Primer 3 zur Sequenzierung der 5'-UTR von <i>SED5</i> , annealt in 5'-UTR von <i>SED5</i> |
| CG24 | 5'-GGA TTG ATG CAA ACG TAG ACG-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Primer zur Sequenzierung der 3'-UTR von <i>SED5</i> , annealt am 3'-Ende von <i>SED5</i> |
| CG25 | 5'-GAG CGT ATA CAG AAC ATG G-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Primer 2 zur Sequenzierung der 3'-UTR von <i>SED5</i> , annealt in 3'-UTR von <i>SED5</i> |
| CG26 | 5'-GCG TCG CTT ATT TCA TCT CC-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Primer 3 zur Sequenzierung der 3'-UTR von <i>SED5</i> , annealt in 3'-UTR von <i>SED5</i> |
| CG30 | 5'-CAC TGT CTG GTA CGG GTG CT-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Vorwärts-Primer um vom Vektor in das Insert zu |
| CG31_2 | 5'-GTT AAT GCG GCG CCT ATC TC-3' | Sequenzierung <i>SED5</i> , Rückwärts- Primer um vom Vektor ins Insert zu |

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturbedingungen für *Escherichia coli*

2.2.1.1 Nährmedium für *E. coli* nach (Sambrook *et al.*, 1989)

L-Broth (LB)-Medium:

| | |
|-------------|--------|
| Hefeextrakt | 5 g/l |
| Trypton | 10 g/l |
| NaCl | 5 g/l |
| NaOH | 5 ml/l |

Antibiotika:

| | |
|------------------------|----------|
| Ampicillin | 60 µg/ml |
| (30 mg/ml in 50% EtOH) | |

Die Medien wurden 20 min bei 120 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Für Agarplatten wurde dem Medium 20 g/l Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 42 °C wurde gegebenenfalls Ampicillin zugegeben, Platten gegossen und nach dem Erstarren bei 4 °C gelagert.

2.2.1.2 Anzucht von *E. coli*-Kulturen

Zur Anzucht von *E. coli* Kulturen aus Dauerkultur wurde ein Teil der Dauerkultur mit einer sterilen Impföse entnommen und auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden bei 37 °C inkubiert. Mit einer sterilen Impföse wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte aufgenommen und in ein geeignetes Volumen LB-Medium gegeben. Zur Kultivierung von Transformanten enthielt das Medium ein geeignetes Antibiotikum (z. B. Ampicillin). Platten wurden bei 37 °C inkubiert, Flüssigkulturen bei 200 - 250 rpm und 37 °C geschüttelt. Dauerkulturen wurden angelegt, indem 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl sterilem Glycerol vermischt und bei -80 °C eingefroren wurden.

2.2.2 Kulturbedingungen für *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.2.1 Nährmedien für Hefekulturen nach (Sherman, 1991) u. (Sikorski und Boeke, 1991)

YPD (YPGal):

| | |
|----------------------------|--------|
| Hefeextrakt | 10 g/l |
| Pepton (Nr. 140) | 20 g/l |
| Glucose (Galaktose) | 20 g/l |
| Adeninsulfatlösung (1 g/l) | 5 ml/l |
| Uracillösung (1 g/l) | 5 ml/l |

Synthetisches Minimalmedium (SD-Medium):

| | |
|---------------------|---------|
| Yeast Nitrogen Base | 1.7 g/l |
| Ammoniumsulfat | 5 g/l |
| Glukose | 20 g/l |

Je nach Bedarf wurden dem SD-Medium folgende Aminosäuren zugefügt:

| | |
|----------------|---------|
| Adeninsulfat | 20 mg/l |
| Uracil | 20 mg/l |
| L-Histidin-HCl | 20 mg/l |
| L-Tryptophan | 20 mg/l |
| L-Leucin | 30 mg/l |
| L-Lysin-HCl | 30 mg/l |

Synthetisches Vollmedium (SC-Medium):

| | |
|---------------------|---------|
| Yeast Nitrogen Base | 1.7 g/l |
| Ammoniumsulfat | 5 g/l |
| Glukose | 20 g/l |

Je nach Bedarf wurden dem SC-Medium folgende Aminosäuren zugesetzt:

| | | | |
|----------------|---------|------------------|----------|
| Adeninsulfat | 20 mg/l | L-Isoleucin | 30 mg/l |
| Uracil | 20 mg/l | L-Lysin-HCl | 30 mg/l |
| L-Histidin-HCl | 20 mg/l | L-Phenylalanin | 50 mg/l |
| L-Tryptophan | 20 mg/l | L-Glutaminsäure | 100 mg/l |
| L-Arginin-HCl | 20 mg/l | L-Asparaginsäure | 100 mg/l |
| L-Methionin | 20 mg/l | L-Valin | 150 mg/l |
| L-Tyrosin | 20 mg/l | L-Threonin | 200 mg/l |
| L-Leucin | 30 mg/l | L-Serin | 400 mg/l |

Sporulationsmedium: KOAc 10 g/l

Die Medien wurden 20 min bei 120 °C autoklaviert. Für Agarplatten wurde 20 g Agar je 1 Medium zugegeben. Agarplatten wurden nach dem Gießen und Erstarren bei RT oder 4 °C gelagert.

Herstellung von 5'-FOA Agarplatten:

Agarlösung (für 1 l Medium):

| | |
|---|---------|
| Bacto-Agar | 20 g |
| H ₂ O in 500 ml Flasche | 500 ml |
| Uracil | 20 mg/l |
| Weitere Aminosäuren je nach autoklavieren | |

5'-FOA Mix:

| | |
|------------------------------------|--------|
| H ₂ O in 500 ml Flasche | 500 ml |
| autoklavieren | |
| auf 50 °C abkühlen lassen | |
| 5'-FOA (1g) zugeben | |
| rühren bis das FOA gelöst ist | |

auf 40 °C abkühlen lassen,
dann mit dem 5'-FOA-Mix mischen und Agarplatten gießen

2.2.2.2 Anzucht von Hefekulturen

Hefekulturen wurden aus einer Dauerkultur oder von einer Einzelkolonie in Flüssigkultur angeimpft bzw. auf einer Agarplatte ausgestrichen. Als Kohlenstoffquelle diente entweder Glukose oder seltener Galaktose. Wenn nicht anders angegeben wurden Hefen bei 30 °C (temperatursensitive Stämme bei 25 °C) angezogen.

Zur Selektion von Hefezellen wurde geeignetes Minimalmedium verwendet.

Zur Sporulation von diploiden Hefezellen wurden logarithmisch wachsende Hefekulturen zunächst 2-4 h in YPGal-Flüssigmedium inkubiert, um die Sporulation zu induzieren. Anschließend wurden sie auf KOAc-Agarplatten gegeben und 3-5 Tage bei 25 °C oder 30 °C inkubiert.

Dauerkulturen wurden angelegt, indem 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl sterilem Glycerol vermischt und bei -80 °C eingefroren wurden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von DNA

Die im Folgenden beschriebene Methode zur Isolierung von analytischen Mengen bakterieller Plasmid-DNA basiert auf einer Vorschrift von Birnboim und Doly (1979) und wurde leicht modifiziert. Sie diente hauptsächlich der qualitativen Analyse mehrere Einzelklone nach einer Transformation.

Einzelkolonien wurden in 1,5 ml LB/Amp-Medium in einem 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäß angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 - 250 rpm inkubiert. Gleichzeitig wurde die Einzelkolonie auf LB/Amp-Agarplatten überimpft, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Die in Flüssigkultur herangewachsenen Bakterien wurden in einer Tischzentrifuge für 30 sek bei 16.000 x g zentrifugiert. Die einzelnen Zellpellet wurde in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde 200 µl alkalische SDS-Lösung dazugegeben, alles vorsichtig vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Extrakte mit den lysierten Zellen wurden durch Zugabe von 150 µl eiskalter KOAc-Lösung neutralisiert. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Zelllysate für 5 min bei 16.000 x g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Aus den klaren Überständen wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 ml 100%igem EtOH gefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 4 °C (10 min, 16.000 x g) sedimentiert und ein mal mit je 500 µl 70%igem EtOH gewaschen. Anschließend wurden die DNA-Pellets im Heizblock 5 min bei 37 °C getrocknet und in je 50 µl TE-Puffer mit RNase (10 µg/ml) gelöst. Für Restriktionsanalysen wurden

jeweils 5 µl der DNA-Lösungen verwendet. Die restlichen DNA-Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

| <u>GTE-Puffer:</u> | | <u>alkalische SDS-Lösung:</u> | | <u>Kaliumacetat-Lösung:</u> | |
|--------------------|-------|-------------------------------|----------|-----------------------------|-----|
| Glucose | 50 mM | NaOH | 200 mM | KOAc/HOAc | 5 M |
| Tris/HCl | 25 mM | SDS | 1% (w/v) | pH | 4,8 |
| EDTA | 10 mM | | | | |
| pH | 8.0 | | | | |

Zur präparativen Plasmidisolierung wurden 200 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur durch Zentrifugation (15 min, Rotor: SLA 1500, 6.000 rpm, 4 °C) geerntet und die Zellen durch alkalische Lyse nach dem Qiagen-Protokoll (QIAGEN, Hilden) aufgeschlossen. Zur Isolierung und Aufreinigung der DNA wurden die mitgelieferten Anionenaustauscher-Säulen und Puffer der Firma QIAGEN verwendet. Durch diese präparative Plasmidisolierung konnten 100 - 500 µg DNA gewonnen werden. Die DNA wurde in 200 µl H₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Lichtabsorption von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm genutzt. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine Absorption von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml für doppelsträngige DNA, 40 mg/ml für Einzelstrang-DNA oder RNA und 20 mg/ml für Oligonukleotide (Sambrook *et al.*, 1989). Bei 280 nm absorbieren aromatische Aminosäuren und Phenol. Der Quotient aus A₂₆₀ und A₂₈₀ stellt daher einen relativen Wert für die Reinheit von Nukleinsäuren dar. Relativ saubere Nukleinsäurepräparationen besitzen einen Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ von 1,8 - 2,0 (Sambrook *et al.*, 1989).

2.3.3 Enzymatische Behandlung von DNA

Restriktionsendonukleasen wurden eingesetzt, um definierte DNA-Fragmente für Klonierungsansätze herzustellen und um bei analytischen Anwendungen bestimmte Restriktionsmuster in der Plasmid-DNA zu identifizieren.

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden in entsprechenden Pufferlösungen nach den jeweiligen Angaben der Hersteller eingesetzt. In analytischen Ansätzen wurden 1-3 Units des jeweiligen Enzyms in einem Reaktionsvolumen von 20-50 µl für die Spaltung von 1 µg DNA eingesetzt. Für präparative Zwecke wurden in der Regel 4 - 6µg DNA verwendet und in

einem entsprechend größeren Volumen mit 5 Units Enzym pro μg DNA behandelt. Die Inkubationen erfolgten für 1-3 h bei den vom Hersteller angegebenen Temperaturen.

2.3.3.1 Behandlung von linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (CIP, Calf Intestinal Phosphatase, NEB) katalysiert die Hydrolyse der endständigen 5'-Phosphatgruppe von linearisierten DNA- und RNA-Fragmenten. Das Enzym wurde bei einigen Klonierungen eingesetzt, um bei linearisierten Vektoren eine Religation des Vektors ohne eingefügtes DNA-Fragment zu verhindern (Seeburg *et al.*, 1977; Ullrich *et al.*, 1977) und dadurch die Effizienz der gewünschten Ligation zu erhöhen.

Etwa 2 μg linearisierte DNA wurde in 45 μl H_2O aufgenommen und mit 5 μl 10-fach Dephosphorylierungspuffer vermischt. Nach Zugabe von 0,02 Units alkalischer Phosphatase wurde der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase hitzeinaktiviert. Hierzu wurde der Reaktionsansatz, nach Zugabe von EDTA (pH 8,0) in einer Endkonzentration von 5 mM, für 10 min bei 75°C inkubiert. Das inaktivierte Enzym wurde mit Hilfe des QIAquick-Systems der Firma QIAGEN von der DNA getrennt (s. Kap. 2.3.5).

10 x Phosphatasepuffer:

| | |
|-------------------|--------|
| Tris/HCl | 100 mM |
| ZnCl ₂ | 10 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| pH | 8,0 |

2.3.3.2 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden

Das Klenow-Fragment entsteht bei der proteolytischen Spaltung der DNA-Polymerase I (Klenow und Henningsen, 1970). Es wurde benutzt, wenn nicht zueinander passende, überhängende Enden von DNA-Fragmenten miteinander ligiert werden sollten. Das Enzym füllt an 5'-überhängenden DNA-Enden den Gegenstrang mit komplementären dNTPs auf, so dass glatte Enden entstehen.

2 – 3 μg linearisierte DNA wurden in 35 μl H_2O und 5 μl 10-fach Klenow-Puffer aufgenommen und mit 5 μl dNTP-Mix (jedes 2,5 mM) versetzt. Nach Zugabe von 1 Unit Klenow-Enzym pro μg DNA wurden die Ansätze 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden, nach Zugabe von EDTA (pH 8,0) in einer Endkonzentration von 10 mM, für 10 min auf 75°C erhitzt. Das inaktivierte Enzym wurde mit Hilfe des QIAquick-Systems der Firma QIAGEN von der DNA abgetrennt (s. Kap. 2.3.5).

10x Klenow-Puffer:

| | |
|-------------------|--------|
| Tris/HCl | 500 mM |
| MgCl ₂ | 100 mM |
| DTT | 1 mM |
| pH | 7,2 |

2.3.3.3 Ligation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten.

Linearisierte DNA-Moleküle können durch Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen miteinander verbunden werden. Diese Reaktion katalysiert die T4-DNA-Ligase unter Hydrolyse von ATP.

Ligationsansätze nach Sambrook *et al.* (1989) enthielten 50-100 ng linearisierte Vektor-DNA, einen 3-10-fachen molaren Überschuss des zu integrierenden DNA-Fragments, 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10 x Ligase Puffers und 1 Unit T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Parallel dazu wurde für jede Ligation ein entsprechender Reaktionsansatz ohne Insert-DNA angemischt. Ligations- und Religationsansätze wurden 1 - 20 h bei 16 °C inkubiert und anschließend direkt zur Transformation von kompetenten *E. coli* eingesetzt.

2.3.4 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-flachbettgele verwendet. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Moleküle wurde eine Agarosekonzentration von 0,8 - 2,0% gewählt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und in eine entsprechende Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Auftragspuffer ohne Bromphenolblau bzw. mit 1/6 Auftragspuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichts-Standard (1 kb DNA Ladder oder 100 bp DNA Ladder, New England Biolabs, Schwalbach) aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Je nach Größe des Agarosegels wurde die elektrophoretische Trennung bei einer konstanten Spannung von 70 - 100 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit dem fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid anzufärben, um die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar zu machen (Sharp *et al.*, 1973). Ethidiumbromid absorbiert UV-Licht bei 302 nm und 366 nm und emittiert die aufgenommene Energie bei 590 nm, wodurch die DNA rötlich-orange erscheint (LePecq und Paoletti, 1967).

TAE-Puffer:

| | |
|-----------|-------|
| Tris/HOAc | 40 mM |
| NaOAc | 20 mM |
| EDTA | 1 mM |
| pH | 7,2 |

Auftragspuffer (6x):

| | |
|----------------|-------------|
| Bromphenolblau | 0,25% (w/v) |
| Xylencyanol | 0,25% (w/v) |
| Glycerol | 30% (w/v) |

Ethidiumbromid-Färbebad:

Ethidiumbromid (10 mg/ml) in H₂O Endkonzentration 2 µg/ml

2.3.5 Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen wurde das QIAquick-System der Firma QIAGEN (Hilden) nach Angaben des Herstellers angewendet. Das DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Präparation erfolgte nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll. Das getrocknete DNA-Pellet (5 min, 37 °C) wurde mit 30 - 50 µl destilliertem, sterilem H₂O eluiert.

2.3.6 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen**2.3.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen**

Zur Aufnahme von rekombinanter Plasmid-DNA durch Transformation müssen *E. coli* Zellen zunächst vorbereitet werden (Cohen *et al.*, 1972). Ein ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurde in 300 ml LB-Medium gegeben und bei 37 °C und 200 - 250 rpm bis zu einer Zelldichte von 0.5 - 0.6 OD₆₀₀ angezogen. Durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 x g (Rotor SLA 1500) und 4 °C wurden die Zellen geerntet. Bei allen folgenden Schritten wurden die Zellen ständig auf Eis gekühlt. Das Zellpellet wurde in 90 ml RF-I Puffer resuspendiert und für 90 - 120 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (4000 x g, Rotor SLA 1500, 4 °C) wurden die Zellen in 12 ml RF-II Lösung aufgenommen. 300 µl Aliquots wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

RF-I Puffer:

| | |
|-------------------|-----------|
| KOAc | 90 mM |
| RbCl | 100 mM |
| MnCl ₂ | 10 mM |
| CaCl ₂ | 10 mM |
| LiCl | 0.5 mM |
| Glycerol | 15% (w/v) |
| pH | 5,8 |

RF-II Puffer:

| | |
|-------------------|-----------|
| MOPS | 10 mM |
| CaCl ₂ | 75 mM |
| Glycerol | 15% (w/v) |
| pH | 7.0 |

Lösung sterilfiltrieren

Lösung sterilfiltrieren.

2.3.6.2 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Elektrokompente *E.coli* Zellen wurden nach einem Protokoll von Dower *et al.* (1988) hergestellt. 10 ml einer *E. coli* -Übernachtskultur wurden in 1 l LB-Medium überführt und bei 37 °C und 200 - 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 - 0.8 angezogen. Durch Zentrifugation (10 min, 4000 x g, Rotor SLA 1500, 4 °C) wurden die Zellen geerntet und bei allen folgenden Schritten ständig auf Eis gekühlt. Das Zellpellet wurde in 1 l eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 500 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Zellpellet mit 20 ml 10%igem eiskaltem Glycerol gewaschen und nach einer letzten Zentrifugation in 2 ml 10%igem Glycerol aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Aliquots á 50 µl aufgeteilt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.7 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.3.7.1 Transformation mittels Hitzeschock-Methode

Die Transformation von *E. coli* Zellen mittels Hitzeschock erfolgte nach Standardvorschrift (Sambrook *et al.*, 1989). Je Transformationsansatz wurden etwa 100 µl Zellsuspension verwendet. Die tiefgefrorenen kompetenten *E. coli*-Zellen wurden kurz auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 10-20 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock im Heizblock bei 42 °C für 45 sek. Anschließend wurden die Zellen für 2 min erneut auf Eis inkubiert, bevor sie, nach Zugabe von 1 ml vorgewärmten LB-Medium, für 60 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert wurden. Nach dieser Zeit konnte davon ausgegangen werden, dass die transformierten Zellen das plasmidkodierte Resistenzgen exprimieren. Die Zellen wurden 30 sek. bei 5000 x g (Tischzentrifuge) abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen konnten die gewachsenen Klone für eine analytische Plasmidisolierung angeimpft werden (s. Kap. 2.3.1) und anschließend durch Restriktionsanalyse auf Anwesenheit der rekombinanten Plasmid-DNA überprüft werden.

2.3.7.2 Transformation mittels Elektroporation

Die Elektroporation von *E. coli* Zellen erfolgte nach Standardvorschrift (Sambrook *et al.*, 1989) unter Verwendung eines BioRad GenePulser. 50 µl einer Suspension elektrokompenter *E. coli* Zellen (s. Kap. 2.3.6.2) wurden 5 min auf Eis inkubiert, mit 1 -

40 ng Plasmid-DNA vermischt und in eine GelePulser-Küvette überführt. Die Elektroporation wurde bei $C = 25 \mu\text{F}$, $U = 2.5 \text{ kV}$, $R = 200 \Omega$ sowie $t = 4,3 \text{ s}$ durchgeführt. Anschließend wurden die Bakterienzellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 200 - 250 rpm inkubiert, bevor sie auf LB/Amp-Platten ausgestrichen wurden.

2.3.8 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Polymerase-Ketten-Reaktionen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Als Polymerase wurde Deep-Vent-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach), Pfu-Turbo-DNA-Polymerase (Stratagene, Niederlande) oder AmpliTaq-Polymerase (Perkin-Elmer, USA) unter Verwendung der mitgelieferten 10 fach konzentrierten Puffer. Die Deep-Vent- und die Pfu-Turbo-DNA-Polymerase besitzen ein 3'-Exonukleaseaktivität und weisen daher eine höhere Genauigkeit während der Reaktion auf als die Taq-DNA-Polymerase. Als DNA-Matrize für die Polymerase-Reaktion diente entweder Vektor-DNA oder genomische Hefe-DNA. Es wurden 20 - 100 ng der entsprechenden Vektro- bzw. 1-3 μg chromosomaler DNA und jeweils 50 pmol der beiden Oligonukleotide pro 100 μl Reaktionsansatz eingesetzt. Nach der PCR-Amplifikation wurden 10 μl des Reaktionsansatzes mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert, um die Anwesenheit des Produkts zu überprüfen. Das restliche PCR-Produkt konnte für weitere Klonierungsschritte eingesetzt werden.

Reaktionsansatz:

| | |
|--|------------------|
| Vektor-DNA (10 ng/ μl) | 2 μl |
| Oligonukleotid 1 (10 pmol/ μl) | 5 μl |
| Oligonukleotid 2 (10 pmol/ μl) | 5 μl |
| dNTP-Mix (je 2,5 mM) | 4 μl |
| 10 x PCR-Reaktionspuffer | 10 μl |
| H ₂ O | 76 μl |
| DNA-Polymerase | 1 Unit |

Standard PCR-Profil:

| | | | |
|--------------------------|-----------------|---------------------------|--------|
| 1 Zyklus | Denaturierung: | 94 °C | 3 min |
| 18 Zyklen bzw. | Denaturierung: | 94 °C | 30 s |
| 33 Zyklen bei genom. DNA | Hybridisierung: | 53-60 °C | 1 min |
| | Polymerisation: | 72 °C (Taq) | 2 min |
| | | 68 °C (Pfu und Deep-Vent) | |
| 1 Zyklus | Polymerisation: | 72 / 68°C | 10 min |

2.3.9 Zielgerichtete Mutagenese mittels Quick-Change-PCR (Stratagene)

Punktmutationen innerhalb eines Gens wurden mit der „QuickChange“ Methode (Site-Directed-Mutagenesis Kit, Stratagene, Niederlande) unter Verwendung des Hersteller-Protokolls durchgeführt.

Diese Mutagenesemethode beruht darauf, dass zwei komplementäre Oligonukleotide, welche beide die gewünschte Mutation enthalten, an die plasmidische wildtyp DNA binden. Mittels PCR werden beide DNA-Stränge des Plasmids in voller Länge amplifiziert (Hemsley *et al.*, 1989). Anschließend wird die Eltern-DNA unter Zuhilfenahme von *DpnI*, welches nur methylierte und hemimethylierte DNA erkennt, verdaut (Vovis und Lacks, 1977). Die mutierte DNA wird in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Bakterien ligieren die Strangenden und mutierte Plasmide können präpariert werden.

Die verwendeten Oligonukleotide (s. 2.1.10) wurden nach Herstellerangaben konstruiert. Der Erfolg der Mutationen konnte durch neu eingefügte Restriktionsschnittstellen, die als stille Mutationen eingeführt wurden, überprüft werden. Die Inserts der Punktmutanten wurden durch Sequenzierung überprüft.

Die nachfolgende Tabelle gibt die hergestellten Punktmutanten wieder:

| Mutante | Ausgetauschte Aminosäure | Neu erzeugte Schnittstelle (durch stille Mutation) | Verwendete Oligonukleotide |
|--------------|--------------------------|--|----------------------------|
| <i>bet1Q</i> | Ser86 →Gln | <i>SacII</i> | fBET1SQ / rBET1SQ |
| <i>bet1R</i> | Ser86 →Arg | <i>SacII</i> | fBET1SR / rBET1SR |
| <i>bos1R</i> | Gln186 →Arg | <i>SspI</i> | fBOS1QR / rBOS1QR |
| <i>sed5R</i> | Gln283 →Arg | <i>BsgI</i> | fSED5QR / rSED5QR |
| <i>ufe1R</i> | Gln289 →Arg | <i>BglII</i> | fUFE1QR / rUFE1QR |

2.4 Hefegenetik

2.4.1 Chemische Transformation von *S. cerevisiae*

2.4.1.1 Klassische Transformation von Hefezellen

Die Hefetransformation wurde nach einer modifizierten Methode von Ito *et al.* (1983) (Ito *et al.*, 1983) durchgeführt. Behandlung von Hefezellen mit Alkali-Kationen, wie z. B. Lithiumionen, macht die Zellwand für DNA-Moleküle durchlässig, so dass die Hefezellen Plasmid-DNA aufnehmen können. Auch lineare DNA-Fragmente können auf diese Weise in Hefezellen transformiert und anschließend durch homologe Rekombination in das Hefegenom integriert werden (Rothstein, 1983). Zur Selektion der transformierten Zellen auf Minimalmedium enthielten die verwendeten DNA-Vektoren ein entsprechendes Markergen (z. B. *LEU2*, *URA3*, *HIS3* oder *LYS2*).

Hefezellen wurden während der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} ca. 1,0) geerntet und einmal mit TE-Puffer gewaschen. Danach wurden die Hefezellen mit einer Konzentration von etwa $2 \text{ OD}_{600}/100 \mu\text{l}$ in Lithiumacetat-Lösung resuspendiert und 1 h bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ oder bei temperatursensitiven Stämmen bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ unter leichtem Schütteln inkubiert. Zu je $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension wurde $1\text{-}2 \mu\text{g}$ DNA gegeben. Als Kontrolle diente stets ein Ansatz ohne DNA. Nach 30 min Inkubation bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde je Ansatz 1 ml PEG-Lösung dazugegeben und die Suspensionen erneut 1 h bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend folgte eine Hitzeschockbehandlung für 10 min bei $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Zellen wurden 5 min bei $5000 \times g$ bei RT abzentrifugiert und die PEG-Lösung möglichst vollständig abgenommen. Die Zellen wurden in je $100 \mu\text{l}$ TE-Puffer resuspendiert und auf selektiven Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation für 2-3 Tage bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $25 \text{ }^\circ\text{C}$ konnten Einzelkolonien auf andere Agarplatten bzw. Flüssigmedien überimpft und ihre Eigenschaften analysiert werden.

TE-Puffer

| | |
|----------|-------|
| Tris/HCl | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |
| pH | 8,0 |

Lithiumacetat-Lösung

| | |
|--------------|-------|
| LiOAc | 0,1 M |
| in TE-Puffer | |

PEG-Lösung

| | |
|--------------|-----------|
| PEG 4000 | 40% (w/v) |
| LiOAc | 0,1 M |
| in TE-Puffer | |

2.4.1.2 Chemische Transformation mit Träger-DNA

Die Transformation wurde nach einer modifizierten Methode von Gietz *et al.* (1992) durchgeführt.

Hefezellen wurden in flüssigem Selektiv- oder YPD-Medium angeimpft und über Nacht bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ (OD_{600}/ml von 0,5-1; 2×10^7 Zellen = OD_{600} 1) angezogen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 1:10 in frischem, vorgewärmten YPD-Medium verdünnt und bis zu einer Dichte von 2×10^7 Zellen angezogen. Die Zellen wurden geerntet, mit einem Volumen sterilen H_2O gewaschen, in 1 ml sterilem H_2O resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übergeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml TE/LiOAc-Lösung gewaschen (frisch hergestellt aus den sterilen 10-fach Stammlösungen) und auf eine Konzentration von 2×10^9 ($OD_{600}/ml=100$) resuspendiert. Die Kalbsthymus Träger-DNA wurde 10-15 min bei $100^\circ C$ aufgeköcht und sofort auf Eis gestellt. 50 μl Hefezellsuspension wurden mit 100 ng zu transformierender DNA und 50 μg einzelsträngiger Träger-DNA gut gemischt. Anschließend wurden 300 μl steriles 40% PEG-4000 in 1x TE/LiOAc (frisch hergestellt aus einer 50% PEG-Stammlösung und 10-fach TE- und LiOAc-Stammlösungen) dazugegeben und der Reaktionsansatz gründlich gemischt. Nach sorgfältigem Mischen des Reaktionsansatzes wurde dieser unter leichtem Schütteln für 30 min bei $30^\circ C$, bzw. bei temperatursensitiven Stämmen bei $25^\circ C$, inkubiert. Nach Zugabe von 40 μl DMSO (Reinheitsgrad: Zellkultur) erfolgte der Hitzeschock bei $42^\circ C$ für 15 min. Der Reaktionsansatz wurde kurz abzentrifugiert, der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml 1x TE-Puffer resuspendiert. Geeignete Volumina wurden auf Selektivmedium ausplattiert. Als Negativkontrolle wurde immer ein Ansatz ohne DNA parallel dazu aufgearbeitet.

10-fach TE:

| | |
|----------|--------|
| Tris/HCl | 100 mM |
| EDTA | 10 mM |
| pH | 7.5 |

10-fach LiOAc:

| | |
|-------|-----------------------------------|
| LiOAc | 1 M |
| pH | 7.5 |
| | (eingestellt mit verdünnter HOAc) |

2.4.2 Elektroporation von *S. cerevisiae*

Um eine höhere Transformationseffizienz zu erzielen, wurde Plasmid-DNA auch mit einem Gene Pulser (BioRad, USA) durch Elektroporation in Hefezellen eingeschleust werden. Dabei wurde ein modifiziertes Protokoll von Becker und Guarente (1991) verwendet. Nach dieser Methode werden Hefezellen zunächst mit Lithium-Kationen vorbehandelt, bevor sie dann elektrokompetent gemacht werden.

Hefezellen wurden in 100 ml Selektiv- oder YPD-Medium über Nacht angezogen, so dass sie am nächsten Morgen eine $OD_{600} < 1,2$ besaßen. Die Zellen wurden 5 min bei 3000 rpm (Rotor SLA 1500) bei 4 °C geerntet, in 17 ml frisch angesetzter LiOAc-Lösung vorsichtig aufgenommen und für 45 min bei 30 °C (bzw. 25 °C bei temperatursensitiven Stämmen) und 100 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 420 µl 1 M DTT-Lösung wurden die Zellen weitere 15 min bei 30 °C (bzw. 25 °C) und 100 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 67 ml kaltem, sterilem Wasser wurden die Hefezellen 5 min bei 3000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und für die Elektroporation vorbereitet. Hierfür müssen alle Ionen möglichst aus der Zellsuspension herausgewaschen werden. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurden die Zellen jeweils bei 4 °C für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde ein mal mit 100 ml und anschließend ein mal mit 50 ml sterilem, eiskaltem Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 20 ml sterilem eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen und schließlich in 500 µl eiskaltem 1 M Sorbitol vorsichtig aufgenommen und in Aliquots à 40 µl aufgeteilt. Nicht benötigte Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C aufbewahrt. 40 µl vorbereitete Zellen wurden mit max. 5 µl DNA gemischt (entsprechend 100 ng plasmidischer DNA bzw. 2 µg DNA bei Integration) und für 5 min. auf Eis inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde in einer vorgekühlten sterilen Transformationsküvette bei einem Puls von 1,5 kV, 25 µF und 200 Ω transformiert. Sofort danach wurde 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol zum Ansatz gegeben, alles vorsichtig gemischt und schließlich der gesamte Ansatz in ein steriles Röhrchen übergeführt. Zum Transformationsansatz wurden 3 ml vorgewärmtes YEPD Medium gegeben und die Hefezellen für mindestens 2 h bei 30 °C (bzw. bei temperatursensitiven Stämmen 25 °C) zur Regeneration inkubiert. Nach der Regenerationsphase wurden die Hefezellen für 5 min bei RT und 500 x g zentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml YPD aufgenommen und geeignete Volumina auf Selektivmedium ausplattiert und bei 30 °C bzw. 25 °C inkubiert.

LiOAc-Lösung:

| | |
|-----------------|--------|
| LiOAc | 100 mM |
| Tris-HCl pH 7,5 | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

2.4.3 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung von Plasmiden aus *S. cerevisiae* wurde ein Protokoll verwendet, das auf der Methode von Hoffman und Winston (1987) basiert. Zwei ml stationär gewachsene Hefekultur wurden für 1 min bei 16.000 x g abzentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl Aufschlußpuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Äquivalent säuregewaschener Glasperlen und 200 µl Phenol/Chloroform (1:1) wurde die Suspension für 2 min bei RT gevortext. Zur Trennung der wässrigen Phase von der organischen Phase, den Glasperlen und den nicht aufgebrochenen Zellen wurde der Ansatz für 5 min bei 16.000 x g bei RT zentrifugiert und die wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die gelöste DNA wurde durch Zugabe von 600 µl 100 %igem Ethanol gefällt, das Präzipitat für 10 min bei 16.000 x g bei RT zentrifugiert und Salze durch zweimaliges Waschen mit je 500 µl 70%igem Ethanol entfernt. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl H₂O gelöst. Jeweils 2 µl des Ansatzes wurden zur Transformation von elektrokompetenten *E. coli* verwendet, um das Plasmid für weitere Analysen zu amplifizieren.

Aufschluß-Puffer:

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

2.4.4 Präparation genomischer DNA aus Hefezellen

Diese Methode eignet sich sowohl zur Präparation genomischer DNA, als auch zur Extraktion plasmidischer DNA aus Hefe (Sambrook *et al.*, 1989). Die Hefe-DNA kann hiermit sowohl aus Flüssigkulturen, als auch aus frisch auf Agarplatten wachsenden Hefezellen extrahiert werden. Nach dieser Methode präparierte DNA wurde direkt als Template-DNA für PCR-Ansätze eingesetzt oder in kompetente *E. coli* transformiert.

Mit einer sterilen Impföse wurden eine oder mehrere große Einzelkolonien in ein Reaktionsgefäß, das 50 µl STES Puffer enthält, übergeführt. 1,5 ml Übernachtskultur wurden für 5 min bei RT und 3000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert und das Pellet in 50 µl STES Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl Äquivalent säuregewaschener Glasperlen und 20 µl TE Puffer (pH 7,6) wurden die Reaktionsansätze für 1 min gevortext und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden pro Reaktionsansatz 60 µl Phenol/Chloroform (1:1; v/v) zugegeben und die wässrige und organische Phase durch 1 min vortexen gemischt. Die

Ansätze wurden 5 min bei RT und 16.000 x g zentrifugiert um organische und wässrige Phase wieder zu trennen. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß übergeführt. Durch Zugabe von zwei Vol. 100% Ethanol 15 min bei 0°C wurde die DNA gefällt und durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 16,000 x g pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet in 100 µl 70%igem Ethanol kurz gespült und 1 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Die Ethanollösung wurde abgenommen, das DNA-Pellet für 15 min luftgetrocknet und in 40 µl TE-Puffer (pH 7,6) gelöst.

TE-Puffer:

| | |
|----------|-------|
| Tris/HCl | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |
| pH | 7,6 |

STES Puffer:

| | |
|----------|----------|
| Tris/HCl | 200 mM |
| NaCl | 500 mM |
| EDTA | 10 mM |
| SDS | 1% (w/v) |
| pH | 7,6 |

2.4.5 Kreuzung von Hefezellen

Hefestämme mit unterschiedlichem Paarungstyp wurden mit einer sterilen Impföse strichförmig auf eine YPD-Platte senkrecht zu einander ausgestrichen, und an der Stelle, an der die aufgebrachten Hefestämme aufeinander trafen mit der Impföse vermischt. Nach Inkubation über Nacht bei 25 °C wurden die gewachsenen Zellen zur Selektion von diploiden Zellen auf geeignetes SD- oder SC-Medium überstempelt und erneut über Nacht bei 25 °C inkubiert.

2.4.6 Sporulation von Hefezellen

Die Sporulation von Hefezellen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Kassir und Simchen (1991). 5 ml einer in geeignetem SD- oder SC-Medium gewachsenen über Nacht Kultur des zu sporulierenden diploiden Hefestammes wurden bei 800 x g abzentrifugiert. Zur Induktion der Sporulation wurde das Zellpellet in 5 ml YPGal-Medium resuspendiert und die Hefezellen für weitere 4 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und der Mediumüberstand dekantiert. Die pelletierten Hefezellen wurden mit dem im Röhrchen verbliebenen Medium resuspendiert und die konzentrierte Zellsuspension als Tropfen auf eine Kaliumacetat-Platte gegeben (s. Kap. 2.2.2.1). Die Hefezellen wurden 3-5 Tage bei 25 °C inkubiert und die Ausbildung der Asci unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

2.4.7 Analyse von Hefetetraden

Hefetetraden werden durch Mikromanipulation analysiert (Sherman und Hicks, 1991). Durch Behandlung der sporulierten Hefezellen mit einem Schnekenenzym werden die Asciwände partiell abgebaut. Meistens bleiben die vier Ascussporen zusammen und können unter dem Lichtmikroskop mit der Glasspitze eines Mikromanipulators vorsichtig getrennt und einzeln an definierte Positionen auf einer Agarplatte ausgelegt werden.

Sporulierte Hefezellen wurden mit einer Impföse in eine Lösung aus 10 µl β -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *H. pomatia* in 500 µl sterilem Wasser gegeben und für 10 - 30 min bei RT inkubiert. 10 µl der Zellsuspension wurden am Rand einer YPD-Agarplatte aufgebracht und vier sporige Tetraden mit dem Mikromanipulator isoliert.

Zum Auskeimen der Sporen wurden die Platten für 2-4 Tage bei 25 °C inkubiert. Nachdem Kolonien gewachsen waren, wurden diese auf Selektivplatten zur Verfolgung der Markergene und auf frische YPD-Platten zur Überprüfung des Wachstumsverhaltens bei kritischen Temperaturen (z. B. 37 °C) überstempelt.

2.4.8 Nachweis von sezerniertem α -Faktor durch den Halo-Test

Um die Sekretion des α -Pheromons nachzuweisen, wurde der Halo(Hof)-Test verwendet (Ciejek und Thorner, 1979; Julius *et al.*, 1984). Zunächst wurden 1 g Agar in 100 ml YPD-Medium durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle und vorsichtiges Schwenken gelöst. Anschließend wurde das Medium in einem Wasserbad auf 42 °C abgekühlt und mit 1 OD₆₀₀ logarithmisch wachsender RC898-Hefezellen vermischt. Die Zellsuspension wurde möglichst dünn in Kulturschalen gegossen. Die Agarplatten sind ca. 10 Tage bei 4 °C lagerungsfähig.

Die Sensitivität des MATa Testerstammes beruht auf Mutationen im *BARI*- und im *SST2*-Gen. Der Stamm RC898 endozytiert das durch den Agar diffundierende α -Pheromon, kann aber aufgrund der defekten Gene das Anhalten in der mitotischen G1-Phase nicht aufheben. Dadurch bildet sich um α -Pheromon sezernierende Hefestämme ein klarer Hof (Halo).

2.4.9 Bestimmung des Wachstums von Hefezellen auf Agarplatten

Zur Kontrolle des Wachstumsverhalten wurden Hefezellen zunächst in Flüssigkultur in Vollmedium oder Minimalmedium bei 25 °C oder 30 °C angezüchtet. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Stämme hergestellt, so dass die höchsten Konzentrationen einer Zelldichte von 1 OD₆₀₀/ml entsprachen. Diese Zellsuspensionen wurden nun sukzessiv 1:2 verdünnt. Von den Verdünnungen wurde jeweils 10 µl als Tropfen auf Vollmedium- oder

Selektivmedium-Agarplatten aufgebracht und die Platten wurden bei unterschiedlichen Temperaturen (in der Regel 25 °C, 30 °C, 32 °C, 35 °C und 37 °C) inkubiert. Nach 1-3 d wurde das Wachstum der Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen dokumentiert.

2.4.10 Austausch von Plasmiden mittels 5'-FOA

Mit dieser Methode der Negativ-Selektion lassen sich sehr effizient und selektiv *ura3*-mutierte Zellen identifizieren (Sikorski und Boeke, 1991). Sie wird eingesetzt, um auf den Verlust eines *URA3*-Plasmides zu selektieren.

5'-Fluoroorotatsäure ist ein Fluor-Analogon der Orotatsäure, einem natürlichem Intermediat in der Uracil-Biosynthese. Die Orotidin-5'-phosphat Decarboxylase, das *URA3*-Genprodukt, wandelt Orotatsäure in Uracil um, kann nicht zwischen seinem natürlichem Substrat und 5'-FOA unterscheiden. Deshalb wird in Uracil-prototrophen Hefezellen 5'-FOA in das stark toxische 5'-Fluorouracil umgewandelt, das zum Zelltod führt. Uracil-auxotrophe Hefezellen dagegen sind auf die externe Zufuhr von Uracil angewiesen und können somit auf Fluoroorotat-haltigem Medium wachsen .

Hefezellen mit einem *URA3*-Plasmid, welches sie verlieren sollten, wurden auf 5'-FOA-haltigen Agarplatten (s. 2.2.2.1) ausgestrichen und 1-2 d bei 30 °C (25 °C) inkubiert. Der Verlust des Plasmids wurde durch Umstreichen geeigneter Einzelkolonien auf Agarplatten aus Selektivmedium ohne Uracil kontrolliert.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Alkalischer Aufschluß von Hefezellen

Der Aufschluß von Hefezellen mittels alkalischer Lyse wurde nach einer modifizierten Methode von Yaffe und Schatz (1984) durchgeführt.

Drei OD₆₀₀ logarithmisch wachsende Hefezellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 x g geerntet, in jeweils 540 µl Lysepuffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden durch Zugabe von 60 µl 100% iger TCA innerhalb von 10 min auf Eis gefällt und durch anschließende Zentrifugation für 5 min bei 16000 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Durch Zugabe von 10 µl 1.5 M Tris/HCl pH 8,5 wurde die im Pellet verbleibende TCA neutralisiert. Das Pellet wurde nochmal für 5 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Proteinpellet in 150 µl Lämmli-Auftragspuffer aufgenommen und im Heizblock für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben konnten nun direkt für eine SDS-PAGE-Analyse eingesetzt werden.

Lyse-Puffer:

NaOH 2 M
β-Mercaptoethanol 5 % (w/v)

TCA-Lösung:

TCA 100% (w/v)

2.5.2 Zellaufschluß mit Glasperlen

Zum Aufschluß von Hefezellen mittels Glasperlen wurde eine modifizierte Methode nach Schuyler und Pellman (2002) verwendet. 50 ml einer logarithmisch wachsenden Hefezellen-Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1-2 wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g geerntet und mit eiskaltem, sterilem H₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl eiskaltem PBS-Puffer (mit Proteinase-Inhibitor-Mix, s. 2.1.3) aufgenommen und mit dem gleichen Volumen Glasperlen (Durchmesser: 0,5 mm) vermischt. Durch kräftiges Mischen mit einem Vortex-Gerät (6 min bei 4 °C) und anschließendem Schockfrieren in flüssigem Strickstoff wurden die Hefen aufgeschlossen. Die Zell-/Glasperlensuspension wurde 10 min bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen und für weitere Analysen verwendet.

2.5.3 Messung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte entweder durch Abschätzung der Proteinnmenge im Polyacrylamidgel oder nach der Methode von Bradford (1976). Diese Methode beruht auf der Eigenschaft des Coomassie-Farbstoffes, sein Absorptionsmaximum durch die Bindung an Proteine von einer Wellenlänge von 465 nm auf 595 nm zu verschieben. Die quantitative Bestimmung wurde mit einer Färbelösung und nach Vorschrift der Firma BioRad (Richmond, USA) durchgeführt. Eichkurven wurden unter Verwendung definierter Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) oder Immunglobulin G hergestellt.

2.5.4 Trennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die elektrophoretische Beweglichkeit von Proteinen in einer Acrylamid-Gelmatrix ist von ihrer Größe und Form abhängig und wird durch die Nettoladung des Proteins bestimmt (Sambrook *et al.*, 1989). Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wird von Proteinen in großer Menge gebunden und bewirkt in Gegenwart von Thiolreagenzien wie β-Mercaptoethanol zumeist eine vollständige Denaturierung der Proteine. Die Ladungen der Sulfatgruppen des gebundenen SDS führen zu einer stark negativen Gesamtladung des SDS-Proteinkomplexes, so dass die Ladung des nativen Proteins vernachlässigbar wird. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(SDS-PAGE) wird somit hauptsächlich durch den Siebeffekt der Gelmatrix und die angelegte Stromstärke bestimmt und korreliert sehr gut mit dem Molekulargewicht der Proteine.

Die SDS-PAGE wurde als diskontinuierliche Gelelektrophorese mit Trenn- und Sammelgel mit unterschiedlicher Konzentrations- und Pufferzusammensetzung nach dem von Laemmli (1970) beschriebenen System durchgeführt. Die SDS-PAGE wurde mit vertikalen Plattengelen (170x180x1,5mm) und einer Acrylamidkonzentration des Trenngels von 8 - 16%, je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine, durchgeführt. Das Trenngel wurde nach Zugabe von 240 µl APS (10%, w/v) und 12 µl TEMED zwischen zwei Glasplatten bis etwa 3 cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol sorgfältig entfernt. Das Sammelgel wurde nach Zugabe von 30 µl APS und 10 µl TEMED bis zum oberen Rand der Glasplatten gegossen. Ein 1,5 mm dicker Probenkamm wurde zur Aussparung der Auftragstaschen in den oberen Gelrand eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Probenkamm entfernt. Das Zwischen den Glasplatten fixierte Gel konnte nun in eine passende Elektrophorese-Kammer eingespannt werden, so dass der obere und untere Gelrand mit Elektrophorese-Puffer überschichtet werden konnte. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag mit dem gleichen Volumen 2x Laemmli-Auftragspuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung 5 min im Heizblock bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA und wurde beendet, sobald der im Auftragspuffer enthaltene Farbmarker Bromphenolblau die untere Kante der Gelmatrix erreicht hatte.

Laemmli-Auftrags-Puffer (2 fach):

| | |
|-------------------|----------------|
| Tris/HCl | 0.1 M |
| β-Mercaptoethanol | 2 % (w/v) |
| Glycerin | 20 % (w/v) |
| BPB | 0,0002 % (w/v) |
| pH | 8,0 |

Elektrophorese-Puffer:

| | |
|-----------|------------|
| Glycin | 0.19 M |
| Tris-Base | 25 mM |
| SDS | 0.1% (w/v) |

Acrylamid-Stammlösung (30%):

| | |
|--------------|--------------|
| Acrylamid | 29.2 % (w/v) |
| Bisacrylamid | 0.8 % (w/v) |

Trenngel (16%):

| | |
|-----------------------|--------|
| Acrylamid-Stammlösung | 13 ml |
| Tris/HCl (pH 8,8) | 6 ml |
| 10%ige SDS-Lösung | 250 µl |
| H ₂ O | 4,5 ml |

Trenngel (12,5%):

| | |
|-----------------------|--------|
| Acrylamid-Stammlösung | 10 ml |
| Tris/HCl (pH 8,8) | 6 ml |
| 10%ige SDS-Lösung | 250 µl |
| H ₂ O | 7,5 ml |

Trenngel (8%):

| | |
|-----------------------|--------|
| Acrylamid-Stammlösung | 6,5 ml |
| Tris/HCl (pH 8,8) | 6 ml |
| 10%ige SDS-Lösung | 250 µl |
| H ₂ O | 11 ml |

Sammelgel (5%):

| | |
|-----------------------|--------|
| Acrylamid-Stammlösung | 1,7 ml |
| Tris/HCl (pH 6,5) | 2,5 ml |
| 10%ige SDS-Lösung | 100 µl |
| H ₂ O | 5,7 ml |

2.5.5 Anfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel von den Glasplatten abgelöst und unter leichtem Schütteln in der Färbelösung bei 37°C für 15 - 30 min inkubiert (modifiziert nach Meyer und Lamberts, 1965). Durch Waschen in Entfärber-Lösung wurde überschüssige Coomassie-Färbelösung aus der Gelmatrix entfernt. Anschließend konnte es unter Vakuum bei 60 °C getrocknet werden.

Färbe-Lösung:

| | |
|-----------------|------------|
| MeOH | 50% (v/v) |
| HOAc | 10% (v/v) |
| Serva Blau R250 | 0,1% (w/v) |

Entfärbe-Lösung:

| | |
|------|-----------|
| MeOH | 45% (v/v) |
| HOAc | 10% (v/v) |

2.5.6 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Der elektrophoretische Transfer aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran ermöglicht den Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern. Nach der SDS-PAGE wurden das nicht gefärbte Gel, die zugeschnittene Nitrozellulose-Membran und das Chromatographiepapier in Transferpuffer getränkt und schichtweise, gemäß der Western-Blot-Methode (Burnette, 1981) übereinander gelegt. In einer speziellen Western-Blot-Apparatur, die mit Transferpuffer gefüllt wurde, erfolgte der Transfer der Proteine aus der Gelmatrix auf den Nitrozellulose-Filter bei einer angelegten Stromstärke von 30 - 100 mA innerhalb von 2-16 h.

Transfer-Puffer:

| | |
|-----------|-----------|
| Tris-Base | 20 mM |
| Glycin | 150 mM |
| MeOH | 20% (w/v) |

2.5.7 Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Filtern mit Ponceau S

Um die Qualität der Proteintrennung durch SDS-PAGE und des Transfers auf Nitrozellulose bewerten zu können, wurden die Proteine durch Ponceau S-Rot reversibel angefärbt (Salinovich und Montelaro, 1986). Hierzu wurde die Membran für 1 min in Ponceau S-Lösung geschwänkt und anschließend vorsichtig mit dH₂O entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden.

Ponceau-S-Lösung:

| | | |
|---------------|------------|-------------------------|
| MeOH | 40 % (v/v) | |
| HOAc | 15 % (v/v) | |
| Ponceau S-Rot | 2,5 g/l | Lösung sterilfiltrieren |

2.5.8 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Filtern (Immunoblot-Analyse) nach (Harlow und Lane, 1988)

Die Nitrozellulose-Membran wurde nach dem Western-Blot-Prozeß und der Ponceau S-Färbung in Puffer A, versetzt mit 5% (w/v) Magermilchpulver mit einer entsprechenden Menge eines spezifischen Antiserums für 1-3 h bei RT oder ü. N. bei 4 °C geschüttelt. Der Filter wurde dann je 10 min in Puffer A, Puffer B und wieder in Puffer A gewaschen. Die Markierung der gebundenen Antikörper erfolgte durch einstündige Inkubation des Filters in Puffer A, versetzt mit 5% (w/v) Magermilchpulver und einer 1:5000 Verdünnung eines Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpers. Danach wurde der Filter nochmals wie oben beschrieben gewaschen.

Der Nachweis der immunreaktiven Proteine auf der Nitrozellulose-Membran wurde unter Anwendung eines Reaktionssystems zur Chemilumineszenz (ECL-System, NEN Life Science Product, Belgien) durchgeführt. Hierzu wurde die Membran mit einem 1:1 Gemisch aus den beiden ECL-Lösungen (je 1-2ml) für 1 min benetzt. Zur Detektion und Auswertung der entstehenden Chemilumineszenz wurde ein Lumi-Imager der Firma Roche (Mannheim) verwendet.

Die Antikörper der ersten immunologischen Reaktion ließen sich durch eine Inkubation mit „Stripp-Puffer“ für 30 min bei 70 °C wieder entfernen, so dass die Membran mit einem weiteren Antikörper inkubiert werden konnte.

Puffer A:

| | |
|----------|-------------|
| Tris/HCl | 10 mM |
| NaCl | 0,9% (w/v) |
| Tween 20 | 0,05% (v/v) |

Puffer B:

| | |
|--------------|------------|
| SDS | 0,2% (w/v) |
| NaCl | 0,9% (w/v) |
| Triton X-100 | 0,5% (v/v) |

Stripp-Puffer:

| | |
|-------------------|----------|
| Tris/HCl | 62,5 mM |
| SDS | 2% (w/v) |
| β-Mercaptoethanol | 100 mM |
| pH | 6,7 |

2.6 Zellbiologische Methoden**2.6.1 Immunofluoreszenz von Hefezellen** nach (Schröder *et al.*, 1995)

Entsprechende Transformanten wurden über Nacht in geeignetem Selektiv-Medium angezüchtet. Am nächsten Morgen wurden die Zellen in vorgewärmtem YPD-Medium so verdünnt, dass sie nach zwei Generationen eine Dichte von ca. 0,8 - 1,0 OD₆₀₀ besaßen. Je 3.5 OD₆₀₀ wurden geerntet (3000 rpm, RT), zwei mal in PBS/Sorbitol gewaschen, in 400 µl Fixativ resuspendiert und für 2 h bei RT inkubiert. Die fixierten Zellen wurden bei 500 x g für 2 min zentrifugiert, mit je 1 ml PBS/Sorbitol gewaschen und in 100 µl Lytikase-Puffer aufgenommen. Durch Inkubation der Suspension unter leichtem Schütteln für 30 min bei 30 °C wurden die Zellen sphäroblastiert. Die Sphäroblasten wurden durch eine Zentrifugation bei 500 x g für 1 min geerntet, 2 mal mit je 1 ml PBS/Sorbitol gewaschen und anschließend in 50 µl PBS/Sorbitol resuspendiert.

Je 15 µl der Sphäroblastensuspension wurden pro Loch auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten 10-Loch-Objektträger gegeben. Nach 10 min haben sich die Zellen auf der Oberfläche angeheftet und die überstehende Flüssigkeit konnte abgesaugt werden. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden je 20 µl Block-Lösung für 10 min auf die angehefteten Zellen gegeben. Anschließend wurde der gewünschte primäre Antikörper, in Block-Lösung auf eine geeignete Verdünnung gelöst, auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei RT in einer Feuchthaltekammer inkubiert.

Nachdem der Objektträger fünf mal mit je 20 µl pro Loch PBS/Sorbitol gewaschen wurde, wurden die Zellen mit Sekundärantikörper (Cy2- oder Cy3-konjugiertes Schaf-anti-Kaninchen oder -anti-Maus-IgG), in Block-Lösung 1:200 verdünnt, für 40 min in einer lichtgeschützten Feuchthaltekammer inkubiert. Da dieser Antikörper besonders lichtempfindlich ist, wurden alle folgenden Schritte möglichst im Dunkeln durchgeführt. Es folgten zehn Waschschriffe mit je 20 µl PBS/Sorbitol je Vertiefung, wobei jede Inkubation jeweils 1-2 min andauerte. Anschließend wurden die Zellen mit je 20 µl Einbettmedium überschichtet, dem zuvor 1 µl/ml einer DAPI-Stammlösung (1 mg/ml) zugesetzt wurde, und

durch ein entsprechendes Deckglas versiegelt. Überschüssiges Einbett-Medium wurde vorsichtig entfernt.

Die so behandelten Zellen wurden mikroskopisch untersucht und waren für einige Tage bei 4 °C im Dunkeln lagerungsfähig.

PBS/Sorbitol:

| | |
|----------------------------------|------------|
| NaCl | 137 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 4,3 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,4 mM |
| Sorbitol | 10 % (w/v) |
| pH | 7,0 |

Fixativ:

| | |
|-----------------|-------------|
| p-Formaldehyd | 3,5 % (w/v) |
| in PBS/Sorbitol | |

DAPI-Stammlösung:

| | |
|------|---------|
| DAPI | 1 mg/ml |
|------|---------|

Lytikase-Lösung:

| | |
|---------------------|--------|
| Lytikase (10 mg/ml) | 10 µl |
| β-Mercaptoethanol | 1,4 µl |
| in PBS/Sorbitol | |

Block-Lösung:

| | |
|-----------------|-------------|
| BSA | 1 % (w/v) |
| Triton-X-100 | 0,5 % (v/v) |
| in PBS/Sorbitol | |

Einbettmedium:

| | |
|----------------|---|
| Phenylendiamin | 100 mg |
| PBS | 10 ml |
| pH | 8,5-9,5 |
| | mit 0,5 M Na ₂ CO ₃ eingestellt |
| Glycerin | ad 100 ml |

Beschichtung des Objektträgers mit Poly-L-Lysin-Lösung

Je Vertiefung mit 20 µl Poly-L-Lysin überschichtet und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde jedes Loch zwei mal mit je 20 µl H₂O dest , 10 min bei RT anschließend abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde noch ein weiteres Mal durchgeführt, das Wasser abgesaugt und der nun beschichtete Objektträger wurde über Nacht bei RT getrocknet.

2.6.2 Analyse der Glycosylierung und Sekretion von Invertase durch Aktivitätsfärbung

Das hierfür verwendete Protokoll basiert auf einer Methode von Ballou *et al.* (1986).

In geeignetem Selektivmedium bei 30 °C (bzw. 25 °C) gewachsene Übernachtskulturen der Hefezellen wurden in frischem YPD-Medium verdünnt und bei 30 °C (bzw. 25 °C) bis zu einer OD₆₀₀ = 1 angezogen. Zur Induktion der Invertase-Synthese wurden 20 OD₆₀₀ Zellen abzentrifugiert, mit 5 ml YPD-Medium mit 0,1% Glukose gewaschen und in 20 ml YPD-

Medium mit 0,1% Glukose resuspendiert. Anschließend wurde ein Teil der Kultur bei 25 °C, ein anderer Teil bei 37 °C im Wasserbad bei 150 rpm inkubiert. Nach 1-2 h Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 x g, 5 min) geerntet, in 1 ml eiskalter 10 mM NaN₃-Lösung aufgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße übergeführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 µl Lytikase-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 Units Lytikase wurden die Zellen für 30 – 60 min bei 30 °C sphäroblastiert. Der Zellwandverdau wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestätigt. Die nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Sphäroblasten wurden durch Zentrifugation (3000 x g, 5 min) pelletiert und so von der periplasmatischen Fraktion getrennt. Die lösliche Fraktion wurde vorsichtig abgehoben, noch einmal bei 3000 x g zentrifugiert und der Überstand bis zur Elektrophorese auf Eis gelagert. Das Sphäroblastenpellet wurde mit 1 ml 1 M Sorbitol vorsichtig gewaschen, ein weiteres Mal bei 3000 x g zentrifugiert und in 100 µl Lyse-Puffer aufgenommen. Zur vollständigen Lyse der Sphäroblasten wurden diese mehrfach mit einem Vortex-Gerät geschüttelt. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 14000 x g pelletiert. Der Überstand mit der intrazellulären Fraktion wurde mit 20 µl einer 1 M Sorbitol-Lösung versetzt, um das gleiche Endvolumen wie bei der löslichen Fraktion zu erhalten und um ein Auftragen auf das Gel zu ermöglichen. Wenn es nicht erforderlich war, nach intrazellulärer und sekretierter Invertase zu unterscheiden wurden beide Fraktionen vereinigt. 15 µl jeder Fraktion wurden auf ein 7 %iges nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde im Kühlraum bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Nach etwa 3 h Laufzeit wurde das Gel 30 min bei 37 °C in Saccharose-Puffer geschwenkt und anschließend kurz mit Wasser gewaschen. Die durch die Invertaseaktivität gebildeten Monosaccharide können im Gel nachgewiesen werden. Dazu wurde das Acrylamidgel in frisch angesetzter Färbelösung gelegt und über Wasserdampf erhitzt, bis eine deutliche rötliche Färbung sichtbar wurde. Durch Waschen des Gels mit Wasser und Zugabe von Entfärbelösung wurde die Farbreaktion gestoppt.

Lytikase-Puffer:

| | |
|-------------------------|-------|
| Sorbitol | 1,4 M |
| K-Phosphatpuffer pH 7,5 | 50 mM |
| β-Mercaptoethanol | 80 mM |
| NaN ₃ | 10 mM |

Lyse-Puffer:

| | |
|-------------------------|-------------|
| K-Phosphatpuffer pH 7,5 | 50 mM |
| NaN ₃ | 10 mM |
| Triton-X-100 | 0,1 % (v/v) |

Elektrophorese-Puffer:

| | |
|--|-------|
| Tris-Base | 5,2 g |
| In 1 l H ₂ O | |
| Mit Glycin (ca. 3g) auf pH 9 einstellen | |

Saccharose-Puffer:

| | |
|---------------------------|-------|
| Saccharose | 0,1 M |
| Kaliumacetatpuffer pH 4,8 | 0,1 M |

Färbelösung:

| | |
|--|--------|
| H ₂ O | 150 ml |
| NaOH | 4 g |
| 2,3,5-Triphenyl- tetrazoliumchlorid | 300 mg |

Acrylamidgel (7%):

| | |
|-----------------------------|--------|
| Acrylamid-Stammlösung (30%) | 8,7 ml |
| 0,6 M Tris/HCl (pH 8,4) | 5 ml |
| H ₂ O | 30 ml |
| TEMED | 17 µl |
| APS-Lösung (10 %ig) | 333 µl |

Entfärbelösung:

10 %ige Essigsäurelösung

2.6.3 Analyse der Kar2p-Sekretion von Hefezellen**2.6.3.1 Filtertest** modifiziert nach (Lewis *et al.*, 1997)

Je 0.1 OD₆₀₀ logarithmisch wachsende Hefezellen wurden auf YPD-Platten getropft, antrocknen gelassen und mit angefeuchtetem (in sterilem dest. H₂O) Nitrozellulosefiltern überdeckt. Nach Inkubation bei der angegebenen Temperatur für 12 h wurde die Membran entnommen, 3 x in Western-Blot Waschpuffer A gewaschen und einer Immunoblot Analyse (anti-Kar2p polyklonal, s. Kap. 2.1.5) unterzogen.

2.6.3.2 Aceton-Präzipitation sezernierter Proteine modifiziert nach (Semenza *et al.*, 1990)

In geeignetem Selektivmedium bei 25 °C und 150 rpm gewachsene Übernachtskulturen der zu analysierenden Hefestämme wurden bei 500 x g für 3 min zentrifugiert und die Zellen wurden in frischem YPD-Medium auf eine OD₆₀₀/ml von 0,3 - 0,6 verdünnt und bei 25 °C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 1 angezogen. 15 OD₆₀₀ Zellen wurden durch Zentrifugation bei 500 x g vom Medium getrennt und ins Medium sezernierte Proteine durch Zugabe von 3 Volumina -20 °C kaltem Aceton für 1 h bei -20 °C gefällt. Die präzipitierten Proteine wurden durch 20 min Zentrifugation bei 4 °C und 7000 rpm (Sorvall, SS34 Rotor) vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde dekantiert. Das Proteinpellet wurde zur Entfernung von Acetonresten 10 min an der Luft getrocknet, in 200 µl Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und im Heizblock 5 min bei 95 °C erhitzt. Die BiP/Kar2p-Sekretion wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse bestimmt.

2.6.4 Immunpräzipitation von radioaktiv markierten Proteinen aus Zellextrakten („Pulse-Chase“-Experiment)

„Pulse-Chase“-Experimente wurden nach einem modifizierten Protokoll von Paravicini *et al.* (1992) durchgeführt. Hefekulturen bzw. entsprechende Transformanden wurden über Nacht in SD-Medium ohne Methionin bei 25 °C angezogen, so dass sie am nächsten Morgen eine OD₆₀₀ von ca. 1 besaßen. Met- Stämme wurden über Nacht in YPD-Medium angezogen und am nächsten Morgen für 2-3 h auf geeignetes SD-Medium geschiftet. Die gewünschte Zellzahl (3 OD₆₀₀ je Zeitpunkt) wurde durch Zentrifugation für 3 min bei 500 x g geerntet, ein mal mit 5 ml frischem SD-Medium gewaschen und in 50 µl SD-Medium pro 1 OD₆₀₀ Zellen aufgenommen. Die Suspensionen wurden für 15 min bei der gewünschten Temperatur (in der Regel 37 °C) unter Schütteln inkubiert. Nach der Adaptationszeit wurde zu jedem Ansatz pro 1 OD₆₀₀ Zellen x mCi Trans³⁵S-Label (Gemisch aus ³⁵S-Cystein und ³⁵S-Methionin, 14 mCi/ml) zugegeben und für weitere 5 min bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Direkt nach Zugabe von 5 µl 10 fach konzentrierte „chase“-Lösung pro 1 OD₆₀₀ Zellen wurde jeweils ein 160 µl Aliquot als Null-Wert entnommen und in ein auf Eis gekühltes Reaktionsgefäß mit 18 µl 100%iger TCA-Lösung pipettiert. Der restliche Ansatz wurde weiter bei der gewünschten Temperatur inkubiert und nach 30 min ein weiteres Aliquot entnommen, mit dem ebenso verfahren wurde wie mit dem Null-Wert-Aliquot. Die einzelnen Proben wurden mindestens 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Das TCA-Pellet wurde zweimal mit je 1 ml -20 °C kaltem Aceton gewaschen um überschüssiges TCA zu entfernen und für 10 min bei RT unter dem Abzug getrocknet. Falls notwendig, konnten diese Proteinpellets für einige Tage bei -20 °C gelagert werden. Das Pellet wurde in 100 µl Boiling-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 200 mg säuregewaschener Glasperlen 3 mal für 1 min gevortext und zwischendurch für 1 min auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Falls notwendig konnten die Proben für einige Tage bei -20 °C gelagert werden. Die Proben wurden nach dem Auftauen für 3-5 min bei 35 °C im Heizblock erhitzt. Zu jeder Probensuspension wurde 1 ml Tween-IP-Puffer mit 1 mg/ml BSA gegeben und sorgfältig gemischt. Die Suspension wurde 15 min bei 16000 x g zentrifugiert. Um zu vermeiden, dass Pelletmaterial in die nachfolgende Immunpräzipitation gelangt, wurden nur 900 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert.

Für die Immunpräzipitation wurde das entsprechende Antiserum (in der Regel 10 µl) und 50 µl mit Twee-20-IP-Puffer äquilibrierte Protein-A-Sepharose (30% slurry) zu den Proben hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert.

Die Proben wurden für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand konnte entweder sofort für die nächste Immunpräzipitation verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für einige Zeit bei -20 °C gelagert werden. Die Protein-A-Sepharose wurde mit je 1 ml Tween-20-IP-Puffer, Tween-20-Harnstoff-Puffer, erneut mit Tween-20-IP-Puffer und mit TBS gewaschen. Die Proteine wurden durch Zugabe von 70 µl Laemmli-Puffer und Erhitzen für 5 min auf 95 °C von der Sepharose eluiert.

Aliquots wurden über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. Kap. 2.5.4). Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur Überprüfung der Immunpräzipitation (Detektion der schweren IgG-Ketten) für 15 min in Coomassie-Färbelösung angefärbt und anschließend für 30 - 60 min in Entfärber-Lösung entfärbt und fixiert. Anschließend wurde das Gel zur Verstärkung des radioaktiven signals in Amplify-Lösung der Firma Amersham für 30 min geschwenkt. Nach dem Trocknen bei 60 °C unter Vakuum wurde das Gel mit einem Röntgenfilm in eine lichtdichte Kassette gelegt und für 2 - 7 Tage bei -80 °C gelagert. Danach konnte der Röntgenfilm entwickelt werden.

Tween-20-IP-Puffer:

| | |
|----------|------------|
| Tris/HCl | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |
| Tween-20 | 0,5% (w/v) |
| EDTA | 0,1 mM |
| pH | 7,5 |

Tween-Harnstoff-Puffer:

| | |
|-----------|------------|
| Tris/HCl | 100 mM |
| NaCl | 200 mM |
| Harnstoff | 2 M |
| Tween-20 | 0,5% (w/v) |

Boiling-Puffer:

| | |
|-----------|-----------|
| Tris/HCl | 50 mM |
| EDTA | 1 mM |
| Harnstoff | 6 M |
| SDS | 1 % (w/v) |
| pH | 7,5 |

10-Fach "Chase"-Lösung:

| | |
|-------------|-----------|
| Methionin | 100 mM |
| Cystein | 10 mM |
| Glukose | 2 % (w/v) |
| Hefeextrakt | 4 % (w/v) |

TBS:

| | |
|----------|--------|
| Tris/Hcl | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |
| EDTA | 0,1 mM |
| pH | 7,5 |

2.6.5 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Salminen und Novick (1987) verwendet.

Je 20 OD₆₀₀ wurden durch Zentrifugation (5 min, 500 x g, RT) geerntet, 1x mit 20 ml H₂O_{dd} gewaschen. Die Zellen wurden in frischem YPD-Medium auf eine OD₆₀₀/ml <0.3 verdünnt und für 2 h bei 25°C und 150 rpm inkubiert. Die Hefezellen wurden bis zu einer OD₆₀₀/ml ~ 0.8 – 1.2 angezogen, bevor sie für 1 h auf 37° C (30 °C bei Stamm YCG15) geshiftet wurden. Je 10 OD₆₀₀ Hefezellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 500 x g, RT) geerntet, 3 x mit 0.1 M Cacodylatpuffer pH 6.8 (10 ml, 2 ml) gewaschen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Hefezellen vorsichtig in 2 ml 0.1 M Cacodylatpuffer mit 2% Glutaraldehyd resuspendiert und zunächst 2 h bei 25°C, danach ü.N. bei 4 °C fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 2 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5 wurden die Hefezellen vorsichtig in 2 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5 mit 125µg Zymolyase 100T (Seikagaku Corporation) aufgenommen. Durch Inkubation unter leichtem Schütteln für 40 min bei 30 °C wurden die Zellen sphäroblastiert. Die Sphäroblasten wurden pelletiert (5 min, 500 x g, RT), 2 x mit je 2 ml Cacodylat-Puffer pH 6.8 gewaschen und nochmals mit 2 % Glutaraldehyd ü. N. bei 4 °C fixiert. Nach Resuspension der Zellen in Cacodylatpuffer mit 2 % OsO₄ wurden sie für 1 h bei 0 °C inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation in Uranylacetat für 2 h. Kleine Agaroseblocks wurden gefertigt, durch steigende Ethanolkonzentrationen konsekutiv dehydriert und in Agar 100 eingebettet. Ultra-Dünnschnitte wurden hergestellt und mit 1 %iger wässriger Uranylacetat-Lösung und Bleizitrat (Reynolds lead citrate) kontrastiert.