

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Es wurden bezogen:

Firma	Produkt
ABgene, Epsom (U.K.)	Taq DNA Polymerase und Puffer (10x)
Amersham Biosciences, Freiburg (BRD)	IgG Sepharose [®] 6 Fast Flow-Affinitätschromatografie, Glutathion Sepharose 4B, Lambda-DNA, ECL-Immuno-Blotting-Detektionssystem, ECL-Hyperfilm
Adefo Chemie, Nürnberg (BRD)	Entwicklungsreagenzien
Bio-Rad, München (BRD)	Bradford Reagenz zur Proteinbestimmung, SDS-PAGE Standard Marker „Low range“, 100 bp Standard Marker, Blocking Reagent
Boehringer Ingelheim, Heidelberg (BRD)	Ampicillin, Digitonin, Triton X-100
Difco Laboratories, Detroit, Michigan (USA)	Agarose, Agar, Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren und Hefeextrakt für Ölsäure und Petrosellinsäure -Medium
Dynal, Oslo (Norwegen)	Dynabeads M-280
Eurogentec (Belgien)	Herstellung der laboreigenen polyklonalen Antikörper
ICN Biomedicals, Ohio (USA)	Acrylamid, N, N'-Methylenbisacrylamid
Merck, Darmstadt (BRD)	EDTA, β -Mercaptoethanol, Ölsäure, PMSF
MWG Biotech AG (BRD)	Oligonukleotide
New England Biolabs (UK)	Vent _R -DNA-Polymerase und Puffer (10x), Pwo-Polymerase und Puffer (10x), Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase und Ligasepuffer (10x), alkalische Phosphatase, DNA Polymerase I, Monoklonaler MBP-Antikörper
peQ Lab Biotechnologie, Erlangen (BRD)	Plasmid Miniprep Kit, IPTG
Promega, Madison (USA)	genomische DNA von <i>S.cerevisiae</i>
Qiagen, Hilden (BRD)	DNA Gel-Elutionskit
Roche Diagnostics, Mannheim (BRD)	Complete (Proteaseinhibitorenmix)
Schleicher und Schuell, Dassel (BRD)	Nitrozellulose-Folie (0,45 μ m) und Einmal-Sterilfilter (0,2 μ m)
Serva, Heidelberg (BRD)	APS, Bromphenolblau, BSA, Coomassie Brilliant Blue, DTT, PEG, SDS, Low Range“, Serva Blau R-250 (Coomassie Brilliant Blue), Temed, Tween 20, Tween 40, Tween 80, X-Gal
Sigma, München (BRD)	Aminosäuren, ECL- α -Kaninchen-Antikörper und ECL- α -Maus-Antikörper, α -Protein A Antikörper, Lysozym, Herings-DNA, Lytikase, 3-Amino-1,2,4-Triazol
Whatman, Maidstone (UK)	Whatman 3 MM

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.A. Qualität von üblichen in der BRD vertretenen Firmen bezogen.

2.2 Geräte

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

2.3 Mikroorganismen

2.3.1 *Escherichia coli*

Die verwendeten *Escherichia coli* Stämme sind im Folgenden aufgeführt.

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> , (r_k^- , m_k^+) <i>supE44</i> , <i>rel A1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169	Stratagene, San Diego (USA)
C41 (DE3)	F $^-$, <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r_B^- , m_B^+), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3)	Prof. Dr. John Walker, MRC, Cambridge (GB)

2.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die folgenden *Saccharomyces cerevisiae* Wildtypstämme und Mutanten wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name	Genotyp	Quelle
UTL-7A	<i>MATα leu2-3, 112 ura3-52 trp1</i>	(Erdmann <i>et al.</i> , 1989)
HF7c	<i>MATα 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)
UTL-7A <i>pex7Δ</i>	<i>pex7Δ::LEU2</i>	(Marzioch <i>et al.</i> , 1994)
UTL-7A <i>pex13Δ</i>	<i>pex13Δ::kanMX4</i>	(Huhse <i>et al.</i> , 1998)
UTL-7A <i>pex14Δ</i>	<i>pex14Δ::LEU2</i>	(Albertini <i>et al.</i> , 1997)
UTL-7A <i>pex18Δ</i>	<i>pex18Δ::kanMX4</i>	W. Kunau, Bochum
UTL-7A <i>pex21Δ</i>	<i>pex21Δ::loxP</i>	W. Kunau, Bochum
yKat36	<i>UTL-7A pex18Δ::kanMX4 pex21Δ::loxP</i>	diese Studie
yKat110	<i>UTL-7A pex14Δ::LEU2 pex18Δ::kanMX4 pex21Δ::loxP</i>	diese Studie
HF7c <i>pex7Δ</i>	<i>pex7Δ::LEU2</i>	W. Kunau, Bochum
HF7c <i>pex21Δ</i>	<i>pex21Δ::loxP</i>	W. Kunau, Bochum
yKat12	<i>HF7c pex18Δ::kanMX4 pex21Δ::loxP</i>	diese Studie
yHPR251	<i>UTL-7A [pHPR131]</i>	diese Studie
yHPR252	<i>UTL-7A pex7Δ::LEU2 [pHPR131]</i>	diese Studie
yHPR255	<i>UTL-7A [pHPR132]</i>	diese Studie
yKat92	<i>UTL-7A pex13Δ::kanMX4 [pHPR131]</i>	diese Studie
yKat111	<i>UTL-7A pex18Δ::kanMX4 pex21Δ::loxP [pHPR131]</i>	diese Studie

2.4 Vektoren

Die folgenden Vektoren und Plasmidkonstrukte fanden in dieser Arbeit Verwendung:

Vektor	Beschreibung	Primerpaar	Restriktions- Enzyme	Quelle
Käufliche Vektoren				
pBluescript SK ⁺ (pSK ⁺)				Stratagene, San Diego, (USA)
pRS416				(Sikorski und Hieter, 1989)
pPC86, pPC97				Dr. Chevray, Baltimore, (USA)
pUG35				(Mumberg <i>et al.</i> , 1994)
pQE 31				Quiagen, Hilden (BRD)
pMAL TM -c2-X				NEB, Beverly, MA, (USA)

pGEX-4T-1/ pGEX-4T-2				Amersham Biosciences, Freiburg (BRD)
-------------------------	--	--	--	---

Hefeexpressionskonstrukte

yEP204				(Gietz und Sugino, 1988)
pADH2-OAF1				(Rottensteiner <i>et al.</i> , 1997)
pADH2-PIP2				(Baumgartner <i>et al.</i> , 1999)
pRS-FoxPterm				C. Clayton, Heidelberg (BRD)
pHPR126	<i>DsRed</i> in SK ⁺	RE 197/198		Dr. H. Rottensteiner
pHPR131	<i>ADH2pr-PTS2-DsRed</i>			Dr. H. Rottensteiner
pHPR132	<i>ADH2pr-DsRed</i>			Dr. H. Rottensteiner
pJR233				(Lametschwandtner <i>et al.</i> , 1998)
pMS9	<i>Pex13p₁₋₃₈₆-GFP</i>	RE 432/435	<i>EcoRI, BamHI</i>	Monika Schaerig
pKat136	<i>Pex13p₁₅₁₋₃₈₆-GFP</i>	RE 550/435	<i>EcoRI, BamHI</i>	diese Studie
pKat46	<i>PEX13_{pr}</i> in SK ⁺	RE 98/99	<i>EcoRI, BamHI</i>	diese Studie, Abb. 3.13
pKat111	<i>PEX13_{pr}-PEX13₁₋₃₈₆</i> in SK ⁺	RE 421/423	<i>SphI, HindIII</i>	diese Studie, Abb. 3.13
pKat112	<i>PEX13_{pr}-PEX13₅₆₋₃₈₆</i> in SK ⁺	RE 422/423	<i>SphI, HindIII</i>	diese Studie, Abb. 3.13
pKat113	<i>PEX13_{pr}-PEX13₁₋₁₃₈₆</i> in pRSTERM		<i>BamHI, HindIII</i>	diese Studie, Abb. 3.13
pKat122	<i>PEX13_{pr} PEX13₅₆₋₃₈₆</i> in pRSTERM		<i>BamHI, HindIII</i>	diese Studie, Abb. 3.13

E.coli Expressionskonstrukte

pKat79	GST-Pex19p	RE 103/104	<i>BamHI, SalI</i>	diese Studie
pKat117	MBP-Pex13p ₁₋₁₀₀	RE 298/379	<i>EcoRI, XbaI</i>	diese Studie
pKat118	GST-Pex13p ₁₋₁₀₀	RE 298/379	<i>EcoRI, XhoI</i>	diese Studie
pKat128	MBP-PEX7	RE 79/80	<i>SacI, PstI</i>	diese Studie
pQE31-PEX7	His ₆ -PEX7	RE 79/80		Xinji Hong
pQE31-PEX14	His ₆ -PEX14	RE 87/88		Xinji Hong

Two-Hybrid Konstrukte

pKat16	pPC86 PEX13 (1-151)	RE 25/32	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat31	pPC97PEX13 (1-151)	RE 25/32	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat17	pPC86PEX13 (1-166)	RE 25/33	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat32	pPC97PEX13 (1-166)	RE 25/33	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat18	pPC86PEX13 (1-264)	RE 25/34	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat33	pPC97PEX13 (1-264)	RE 25/34	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat19	pPC86PEX13 (1-280)	RE 25/35	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat34	pPC97PEX13 (1-280)	RE 25/35	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat20	pPC86PEX13 (1-310)	RE 25/36	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie

pKat35	pPC97PEX13 (1-310)	RE 25/36	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat21	pPC86PEX13 (1-340)	RE 25/37	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat36	pPC97PEX13 (1-340)	RE 25/37	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat22	pPC86PEX13 (1-370)	RE 25/52	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat37	pPC97PEX13 (1-370)	RE 25/52	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat23	pPC86PEX13 (1-386)	RE 25/38	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat38	pPC97PEX13 (1-386)	RE 25/38	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat24	pPC86PEX13 (151-386)	RE 26/38	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat39	pPC97PEX13 (151-386)	RE 26/38	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat25	pPC86PEX13 (166-386)	RE 27/38	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat40	pPC97PEX13 (166-386)	RE 27/38	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat26	pPC86PEX13 (264-386)	RE 28/38	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat41	pPC97PEX13 (264-386)	RE 28/38	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat27	pPC86PEX13 (280-386)	RE 29/38	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat42	pPC97PEX13 (280-386)	RE 29/38	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat28	pPC86PEX13 (310-386)	RE 30/38	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat43	pPC97PEX13 (310-386)	RE 30/38	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat29	pPC86PEX13 (340-386)	RE 31/38	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat44	pPC97PEX13 (340-386)	RE 31/38	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat30	pPC86PEX13 (370-386)	RE 53/38	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat45	pPC97PEX13 (370-386)	RE 53/38	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat86	pPC86-PEX13 (1-55)	RE 25/378	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat88	pPC97-PEX13 (1-55)	RE 25/378	<i>Sall, SacI</i>	diese Studie
pKat87	pPC86-PEX13 (1-100)	RE 25/379	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat89	pPC97-PEX13 (1-100)	RE 25/379	<i>Sall, SacI</i>	diese Studie
pKat90	pPC86-PEX13 (55-100)	RE 380/379	<i>EcoRI, SpeI</i>	diese Studie
pKat91	pPC97-PEX13 (55-100)	RE 380/379	<i>SmaI, SpeI</i>	diese Studie
pKat66	pPC86-PEX18	RE 169/170	<i>Sall, SacI</i>	diese Studie
pKat68	pPC97-PEX18	RE 169/170	<i>Sall, SacI</i>	diese Studie
pKat59	pPC86-PEX21	RE 173/174	<i>Sall, SacI</i>	diese Studie
pKat60	pPC97-PEX21	RE 173/174	<i>Sall, SacI</i>	diese Studie
pKat61	pPC86-PEX19	RE 171/172	<i>Sall, SacI</i>	diese Studie
pKat63	pPC97-PEX19	RE 171/172	<i>Sall, SacI</i>	diese Studie
pKat146	pPC86-FOX3		<i>Sall, SacI</i>	diese Studie
pPC97-FOX3				(Rehling <i>et al.</i> , 1996b)
pPC86-PEX14				(Albertini <i>et al.</i> , 1997)
pPC86-PEX5				(Albertini <i>et al.</i> , 1997)
pPC97-PEX7				(Albertini <i>et al.</i> , 1997)

2.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')
RE 25	GTGAATTCGGATCCATATGTCATCCACAGCAGTACCA
RE 26	GTGAATTCGGATCCATATGTTAATAGAAAGTTTGATAGGC
RE 27	GTGAATTCGGATCCATATGCTGGAATCTACTTATATGGCC
RE 28	GTGAATTCGGATCCATATGCCGCTACTATTTTTTTTGATG
RE 29	GTGAATTCGGATCCATATGAACAAATTTATTACTAAACTACAG
RE 30	GTGAATTCGGATCCATATGTTTGCAAGAGCGTTATATGAT
RE 31	GTGAATTCGGATCCATATGAAAGACCCTCTTGGGAGGGAT
RE 32	GCTCTAGAACTAGTTAACTGAAAGGTGGCCTTCGT
RE 33	GCTCTAGAACTAGTCAGCATTGTGCAAATCCAGT
RE 34	GCTCTAGAACTAGCGGTTTCCATGAAATTTTCCT
RE 35	GCTCTAGAACTAGTGTAGTAGATATGGAAAACC
RE 36	GCTCTAGAACTAGTAAATTCTAAGGATCGAAGGATC
RE 37	GCTCTAGAACTAGTTTCTTACTCAAATTTGCCAT
RE 38	GCTCTAGAACTAGTCTAGTGTGTACGCGTTTCATC
RE 52	GCTCTAGAACTAGTTATGATCTCAATATAGTTATA
RE 53	GTGAATTCGGATCCATATGATAAAAAGACGGAAGAAAATTGAG
RE 79	GCTCTAGAGAGCTCACATATGCTCAGATATCACATGCAAGG
RE 80	GGGGTACCCCTCGAGCTGCAGTCAACCTAAGCCGTTCCATAC
RE 87	GCTCTAGAGCTAGCAAGGATCCAATGAGTGACGTGGTCAG
RE 88	GGGGTACCGAATCCCTGCAGCTATGGGATGGAGTCTTC
RE 98	CGGGATCCCTGCAGCTATTTATTCATAGTGTG
RE 99	CGGAATTCGCATGCTGACATCGCAGGTATTGTTATAGT
RE 103	GGACTAGTGGATCCCATATGCCAAACATACAACAC
RE 104	CCCTCGAGGTCGACTTATTGTTGTTTGCAACC
RE 132	AGTGGTGAGTAACCATGCATC
RE 169	GCGTCGACTATGAATAGTAACCGATGC
RE 170	GCGAGCTCTTAAGCAATTCTGTCTTCAAC
RE 171	CGGAATTCATATGCCAAACATACAACAC
RE 172	GCGAGCTCTTATTGTTGTTTGCAACC
RE 173	GCGTCGACTATGCCAGTGTCTGCCAT
RE 174	GCGAGCTCTCAATCAAGTATGTCTTTGTG
RE 197	GCGGCCGCACCATGGTGAGGTCTTCCAAGAATGTT
RE 198	GGATCCGTCGCGGCCGCTAAAGGAAC
RE 221	GTATAATCAGGTATGTAAGGG
RE 222	CGACAATAAGTTCCAGAAAAG
RE 223	ACCAATATGCTAACAACCTC
RE 298	CGGAATTCATATGTCATCCACAGCAGTACCA
RE 378	GCTCTAGAACTAGTCTAAGCAGACTCACTTGCACT
RE 379	GCTCTAGAACTAGTCTATATAGAGTTCATACTATACGG

RE 380	GTGAATTCGGATCCATATGCCCGAAGTTTTGCCGCGG
RE 421	GCATGCGGCGGCCGCTCATCCACAGCAGTACCA
RE 422	GCATGCGGCGGCCGCCCCGAAGTTTTGCCGCGG
RE 423	AAGCTTCTAGTGTGTACGCGTTTCAT
RE 432	GAGGATCCTGCGATGTCATCCACA
RE 435	TCTGAATTCGTGTGTACGCGTTTCATC
RE 550	GAGGATCCTGCGATGTTAATAGAAAGTTTGATAGGC

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (BRD) im Auftrag synthetisiert.

2.6 Antiseren

Mit Ausnahme der monoklonalen Antikörper gegen das *myc*-Epitop, das Maltosebindeprotein (MBP), Protein A und gegen den His₆-Tag wurden polyklonale Antikörper verwendet:

Antikörper gerichtet gegen	Charge	Konz.	Quelle
His ₆ -Pex7p	DE 9945 SA7328	1:1000	AG R. Erdmann
MBP-Pex13p-SH3	DE 96346 SA3129	1:10000	AG R. Erdmann
His ₆ -Pex14p	DE 01156 SA277	1:5000	AG R. Erdmann
Pex11p (6-Peptid)	DE 95758 SA 2571	1:3000	AG W.-H. Kunau, Bochum
Fox3p (Thiolase)		1:10000	AG R. Erdmann
<i>myc</i> -Epitop		1:1000	Dr. H. Otto, Berlin
His ₆		1:10000	Amersham Pharmacia, Freiburg, BRD
MBP		1:10000	New England Biolabs (UK)
Protein A		1:10000	Sigma, München (BRD)

2.7 Analytische Methoden

2.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Gesamtproteinkonzentration nach der Extraktion zu bestimmen, wurde der Farbstoffbindungstest nach Bradford (1976) durchgeführt. Für jede Extraktion wurden zwei Werte bestimmt, indem jeweils 5 µl des Proteinüberstandes abgenommen wurden. Diese wurden mit 200 µl H₂O und 800 µl Bradfordreagenz (Biorad, BRD) versetzt. Nach 15 min Inkubation wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in Referenz zum Leerwert gemessen. Hieraus errechnete sich die relative Proteinmenge, die auf ein SDS-Gel aufgetragen wurde, um in den entsprechenden Extrakten gleiche Proteinmengen zu erhalten.

2.7.2 Bestimmung der optischen Dichte von Zellkulturen

Die optische Dichte von *E.coli* und *S.cerevisiae* Kulturen wurde nach steriler Probeentnahme bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Spektralphotometer bestimmt.

2.8 Kultivierung der Hefe *S. cerevisiae*

2.8.1 Medien und Wachstumsbedingungen

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* Stämmen auf Agarplatten und in Submerskulturen erfolgte bei 30°C in Vollmedium (YPD) oder Minimalmedium (SD) (Erdmann *et al.*, 1989). Je nach Fragestellung variierten die zugesetzten Kohlenstoffquellen. Festagarplatten wurden durch Hinzufügen von 2 % (w/v) Select Agar zu den Medien hergestellt. Auxotrophe Bedingungen wurden nach (Ausubel, 1989) eingehalten. Die Medien wurden bei 120°C für 20 min autoklaviert. Bei Anzuchten zur Co-Immunopräzipitation wurden zur Induktion von Genen, die unter der Kontrolle des *CUP1*-Promotors stehen, die Medien gemäß (Marzioch *et al.*, 1994) mit CuSO₄ supplementiert.

YPD-Medium

2 % (w/v) D-Glukose
2 % (w/v) Select Pepton
1 % (w/v) Hefeextrakt
pH 6,0

SD-Medium

0,3 % bzw. 2 % (w/v) Glukose
0,17 % Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat
10 ml/l Aminosäuren (100x)
pH 6,0

YNO-Medium

0,1 % (w/v) Glukose
0,67 % Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat
10 ml/l Markerlösung (100x)
0,1 % (w/v) Hefeextrakt
0,1 % Ölsäure
0,05 % Tween 40
pH 6,0

Ethanol-Medium

2 % Ethanol
0,67 % Hefe-Stickstoff-Basis ohne Aminosäuren
0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat
100 ml/l Markerlösung (10x)
0,5 % Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0

Ölsäure wurde vor Zugabe zu den Medien für Festagarplatten in 0,5 % beziehungsweise für Submerskulturen in 0,05 % Tween 40 emulgiert.

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

Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 – 7,4

$K_2HPO_4 \times 3H_2O$
 KH_2PO_4

2.8.2 Wachstum auf Festagarplatten

Prototrophien wurden auf SD-Festagarplatten nach Ausstrich von Zellmaterial bzw. nach dessen Transfer durch Replikaplattierung durch 2-7 tägige Inkubation bei 30°C überprüft.

2.8.3 Dauerkulturen

Unter sterilen Bedingungen wurden YPD-Festagarplatten beimpft, 2 Tage bei 30°C inkubiert und je nach Stamm 8-16 Wochen bei 4°C gelagert. 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.

2.8.4 Ölsäure-Wachstumstest

Die zu analysierenden Hefen wurden in 0,3 % SD-Medium kultiviert, geerntet und in sterilem H₂O aufgenommen. Nach Bestimmung der OD_{600nm} dieser Hefeverdünnung (OD_{600nm}=1 entspricht ca. 3x10⁶ Zellen) wurde eine relative Zellzahl von 2x10⁴, 2x10³ und 2x10² auf Ölsäure-, Petrosellinsäure-, Ethanol- und SD-Platten getüpfelt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für mindestens 7 Tage. Wachstumsunterschiede und vor allem das Erscheinen der charakteristischen klaren Höfe um die Kolonien herum zeigten Wachstumsfähigkeit auf Ölsäure.

2.9 Anzucht zur biochemischen Charakterisierung

Die Anzucht von Wildtyp- und Mutantenstämmen für eine anschließende biochemische Charakterisierung erfolgte wie von (Höfeld *et al.*, 1991) beschrieben. Abweichend davon wurde die Hauptkultur auf eine Zelldichte von 2-3x10⁶ Zellen/ml angeimpft und eine Induktionszeit von 14 h gewählt. Die Zellausbeute lag je nach Stamm zwischen 2-5 g Zellen pro 1 l Medium.

2.10 Anzucht zur mikroskopischen Analyse

Die Transformanten wurden auf 0,3 % Glukose enthaltenen SD-Festagarplatten angezogen und anschließend auf Ölsäureplatten und/oder Ethanolplatten überführt. Nach einer Induktionszeit von 2-4 Tagen wurde etwas Zellmaterial in H₂O eingerührt, zu gleichem Anteil mit einer niedrig schmelzenden Agarose versetzt und auf einem Objektträger abgedeckt.

2.11 Aufschluß von *S. cerevisiae* Zellen

2.11.1 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Eine 10 ml Hefekultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 2,5 angezogen. Die Zellen wurden geerntet, mit H₂O gewaschen und in 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Hinzu kamen 300 µl Glasperlen (Ø 0,5 mm) und 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1). Die Zellen wurden dann durch 3 mal einminütigem Vortexen aufgeschlossen, dazwischen erfolgte eine einminütige Kühlung auf Eis. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer wurde der Ansatz bei 13000 rpm in einer Heraeus-Tischzentrifuge für 5 min zentrifugiert. Die genomische DNA enthaltene obere, wässrige Phase wurde abgenommen und zu gleichem Anteil mit Chloroform extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) wurde die wässrige Phase abgenommen, mit 1 ml Ethanol versetzt und 2 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 400 µl TE-Puffer aufgenommen. Die im Präzipitat enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 8 µl RNase (1 mg/ml) und einer zehnminütigen Inkubation bei 37°C verdaut. Nach wiederholter Ethanolfällung wurde die genomische DNA in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Lysispuffer

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

TE-Puffer

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

2.11.2 Zellaufschluss von *S. cerevisiae* nach Yaffe und Schatz

Nach der Anzucht (2.9) wurden 30 mg Zellen in 1 ml H₂O resuspendiert, mit 148 µl 2 M NaOH und 12 µl β-Mercaptoethanol versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 160 µl 50 % TCA wurden die Proben für weitere 10 min auf Eis gestellt. Die durch eine Zentrifugation in einer Eppendorf-Tisch-Zentrifuge erhaltenen Sedimente wurden in SDS-Probenpuffer gelöst, 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend zur Gelelektrophorese (2.17.1) verwendet.

2.11.3 Zellaufschluss von *S. cerevisiae* für Co-Immunopräzipitationen

Zellen wurden nach der Anzucht geerntet, gewaschen und gegebenenfalls bei -80°C gelagert. Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes (0,8-1 g) wurden die Zellen in 3 ml Aufschlusspuffer resuspendiert, mit 3 g Glasperlen (\varnothing 0,5 mm) versetzt und auf 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch 30-minütiges Mischen mit einem Vibrax bei 4°C . Zur Abtrennung der Glasperlen wurden die Eppendorfgefäße mit einer heißen Nadel an der Spitze angestochen, in ein 2 ml Gefäß gesteckt und bei $300 \times g$ in einer Eppendorf-Tisch-Zentrifuge abzentrifugiert.

Aufschlusspuffer für CoIP

50 mM Tris-HCl pH 7,5

50 mM NaCl

0,2 % Triton X-100

pro 50 ml/1 Tablette Proteaseinhibitor-Cocktail

0,02 % PMSF

2.12 Kompetente Zellen und Transformation in *S. cerevisiae*

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 Übernachtskultur des entsprechenden Stammes so angeimpft, dass sich eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,3 ergab. Die Kultur wurde bei 30°C bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,6 geschüttelt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (7000 rpm, 8 min, 4°C , SLA 3000 Rotor) geerntet. Nach einem Waschschrift in H_2O 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 zehnteilminütiges 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 zehnteilminütiger 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 selektiven SD-Platten (2.8.1) ausplattiert.

<u>10x TE</u>	<u>10x LiAc</u>	<u>LiAc-TE-Lösung</u>	<u>LiAc-TE-PEG-Lösung</u>
100 mM Tris-HCl, pH 8,0	1 M Li-Acetat, pH 8,0	1 ml 10x LiAc	1 ml 10x LiAc
10 mM EDTA		1 ml 10x TE	1 ml 10x TE
		8 ml H ₂ O	50 % (w/v) PEG

2.13 Homologe Rekombination

Um Plasmide homolog in das Hefegenom zu integrieren, wurde eine integrative Transformation nach Hinnen durchgeführt (Hinnen *et al.*, 1978). Zunächst wurde das Plasmid an einer einmaligen Schnittstelle im Hefegenom durch eine entsprechende Restriktionsendonuklease linearisiert. Zur Kontrolle der vollständigen Restriktion wurden 3 µl des Restriktionsansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der verbleibende Ansatz wurde für eine Hefetransformation (2.12) eingesetzt. Die erfolgreiche Rekombination wurde mittels PCR überprüft. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.5 aufgeführt. Analog wurden bei der Integration von PCR-Produkten ins Hefegenom verfahren, wobei 10 µl bis zu 50 µl des 100 µl umfassenden PCR-Ansatzes eingesetzt wurden.

2.14 Deletion eines Gens im Hefegenom

Zur Deletion von Hefegenen wurde ein KanMX-Modul nach Güldener verwendet (Güldener *et al.*, 1996). Es besteht aus dem dominanten Kanamycin-Resistenzgen aus *Escherichia coli* (Kan^R), dessen Expression durch die *TEF*-Promotor- und Terminatorsequenzen aus *Ashbya gossypii* kontrolliert werden. Dieses Expressionsmodul wird von zwei LoxP-Sequenzen flankiert (loxP-KanMX-loxP) und befindet sich auf dem Vektor pUG6. Zur Gendeletion wurde mit Hilfe einer präparativen PCR-Reaktion (2.16.10) ein PCR-Fragment erzeugt, welches sich aus der loxP-kanMX-loxP-Sequenz, flankiert von den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des zu deletierenden Gens zusammensetzte. Durch homologe Rekombinationsereignisse 5' und 3' des offenen Leserasters des zu deletierenden Gens wurde dieses PCR-Fragment in das Hefegenom integriert. Das gesamte offene Leseraster des zu deletierenden Gens wurde somit durch loxP-KanMX-loxP ersetzt. Für die Transformation in Zellen von *S. cerevisiae* (2.12) wurden 10 µl bis zu 50 µl des 100 µl umfassenden PCR-Ansatzes eingesetzt und die Transformanten zur Selektion auf YPD-Platten mit Genitacin ausplattiert.

2.15 Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

2.15.1 Das Hefe Two-Hybrid System

Die Kotransformation der Plasmide pPC86 und pPC97 bzw. der daraus abgeleiteten Konstrukte in die *S.cerevisiae* Reporterstämme HF7c erfolgte nach dem Protokoll des Matchmaker „Yeast Two-Hybrid-System“ der Fa. Clontech (Palo Alto, USA). Dabei wurden jedem Transformationsansatz ca. 1 µg Plasmid-DNA und 10 µg Lachssperma-DNA zugegeben. Doppeltransformanten wurden auf SD-Platten ohne Tryptophan und Leucin selektiert. Je 3 unabhängige Transformanten des Stammes HF7c wurden auf Histidin-Prototrophie unter Zugabe von 1-10 mM 3-Aminotriazol hin untersucht.

2.15.2 Co-Immunopräzipitation mit Hilfe von Magnetkugeln

Die Co-Immunopräzipitation eines mit dem *myc*-Epitop markierten Pex7p Fusionsproteins wurde nach (Rehling *et al.*, 1996b) durchgeführt. Pro Präzipitationsansatz wurden 50 µl anti Maus-IgG-Dynabeads (Dynal, Hamburg, BRD) in 1x PBS mit 5 % BSA für 30 min bei 4°C inkubiert, anschließend 2 mal mit 1x PBS und 5 % BSA gewaschen. Über Nacht erfolgte eine Inkubation mit einem Überschuss monoklonaler α -*myc*-Antikörper auf einem Drehrad bei 4°C. Vor einer weiteren Verwendung wurden die beschichteten Magnetkugeln mehrmals mit 1 ml Aufschlusspuffer gewaschen. *S. cerevisiae* Transformanten, die ein *myc*-Pex7p Fusionsprotein exprimieren, wurden für das Experiment, wie unter (2.11.3) beschrieben, aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 rpm für 30 min bei 4°C. Vom Überstand wurde ein Proteintest nach Bradford (2.7.1) durchgeführt. Die Proben wurden hinsichtlich ihres Proteingehaltes und Volumens aufeinander abgeglichen und mit den beschichteten Magnetkugeln für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Aufschlusspuffer wurden die Magnetkugeln in 60 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend zur Gelelektrophorese (2.17.1) verwendet.

10x PBS, pH 7,3

137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 4,3 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O
 1,4 mM KH₂PO₄

Auflösungspuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,5
 50 mM NaCl
 0,2 % Triton X-100
 0,02 % PMSF pro 50 ml 1 Proteaseinhibitor Tablette

2.15.3 Synthese von Peptiden

Die Synthese von Peptiden auf Zellulose (Spotsynthese) wurde 1992 detailliert von R. Frank beschrieben (Frank, 1992). Die Synthesedurchführung erfolgte durch Frau C. Landgraf aus der Arbeitsgruppe Schneider-Mergener, Charité, Humboldt-Universität Berlin nach der von dieser Arbeitsgruppe etablierten Methode (Kramer, 1994; Kramer und Schneider-Mergener, 1998).

Die Zellulosemembran wurde chemisch modifiziert, um geeignete Ankerfunktionen für die nachfolgende Peptidsynthese anzubringen. Diese Ankerfunktionen bestanden aus zwei β -Alanin-Einheiten. Das erste β -Alanin bildete eine Esterbindung mit den Hydroxylgruppen auf der gesamten Zellulosemembran. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen wurde das zweite β -Alanin mit einem Auto-Spot-Robot auf die definierten Punkte (Spots) der Membran aufpipettiert. Um die reaktiven Reste der Spots zu begrenzen, wurde der restliche Bereich der Membran durch Acetylierung blockiert. Anschließend wurden alle Aminosäuren des Peptids sukzessive nach der Fmoc-Strategie aufgebaut. Zuletzt wurden die Seitenschutzgruppen abgespalten.

2.15.3.1 Inkubation der Peptidscans

Der Nachweis der Bindung eines Proteins an ein Peptid erfolgte mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das Epitop des Proteins gerichtet sind. Der Peptidscan wurde 10 min in Methanol inkubiert und anschließend 3 mal für 10 min mit TBS gewaschen. Es erfolgte dann die Blockierung der unbesetzten Bindestellen mit Magermilch für 3-12 h bei 4°C. Nach dem Abwaschen der Magermilch wurde der Scan 10 min in T-TBS inkubiert und danach für 3-12 h bei 4°C mit dem gereinigten Protein inkubiert. Der Scan wurde anschließend 3 mal für 10 min mit TBS gewaschen. Diesem Schritt fügte sich eine 90 min Inkubation mit dem 2. Antikörper an. Dieser wurde anschließend 3 mal für 10 min mit TBS abgewaschen. Nach Inkubation für 5-120 sec mit dem ECL Entwicklungsreagenz erfolgte die Detektion der Spots.

TBS (Tris-Buffered-Saline)

50 mM Tris
 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 pH 8,0 mit HCl

T-TBS

50 mM Tris
 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 0,05 % Tween 20
 pH 8,0 mit HCl

Blockierungspuffer

10 % Blocking Reagent in T-TBS
 10 % (w/v) Saccharose

2.16 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den Standard-Protokollen von (Maniatis *et al.*, 1982) bzw. (Ausubel, 1989) und den Angaben der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

2.16.1 Anzucht von *E. coli* zur DNA Isolation

Transformierte *E. coli* Stämme wurden in LB-Medium mit (100 µg/ml) Ampicillin angezogen. Die Kultivierung erfolgte in Reagenzgläsern oder in Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen maximal 1/5 des Gefäßvolumens) auf einem Horizontalschüttler. Die Anzucht erfolgte auf Festagar-Platten, bzw. im Flüssigmedium bei 37°C über Nacht.

LB Medium

1 % (w/v) Pepton
 1 % (w/v) NaCl
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
 Für Festagar-Platten wurde 2 % Agar dazugegeben.

100x Ampicillin

10 mg/ml Ampicillin gelöst in 1 M Tris pH 8,0
 steril filtriert, Aufbewahrung bei -20°C
 (Endkonzentration 100 µg/ml)

2.16.2 Präparation CaCl₂-kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte nach einer Vorschrift von British Research Laboratories, Gaithersburg (USA). Hierzu wurden 400 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,2 bei 37°C kultiviert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 3500 rpm (SS34, 4°C) sedimentiert, in 40 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und erneut sedimentiert. Das Pellet wurde in 80 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und für 20 min auf Eis belassen. Die Zellen wurden nochmals bei 2000 rpm (SS34, 4°C) sedimentiert und in 4 ml 0,1 M CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in

50 µl Aliquots bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Transformationseffizienz wurde durch Transformation mit Standard-DNA überprüft

2.16.3 Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli* Zellen

Für eine Transformation wurden die CaCl₂-kompetenten Bakterienzellen (2.16.2) mit Plasmid-DNA bzw. mit 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 sec wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und auf LB-Amp-Platten ausplattiert ein. Je 5 µl des Ligationsansatzes wurde zu den kompetenten *E.coli* Zellen (DH5α) gegeben.

2.16.4 Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli*

Die Isolation der Plasmid DNA wurde modifiziert nach Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Nach erfolgreicher Klonierung wurde die DNA mit einem Plasmid-Isolierungskit (Peqlab) aufgereinigt.

2.16.5 Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wurden der Lösung 0,1 Volumen 5 M Ammoniumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol zugesetzt. Das Präzipitat wurde bei 13000 rpm 10 min (Tischzentrifuge) abzentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde vakuumgetrocknet, in 50 µl H₂O oder TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

2.16.6 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen unter Zusatz von RNase A (0,5 mg/ml).

2.16.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die zu analysierende DNA-Probe wurde mit 1/10 Volumen an DNA-Probenpuffer versetzt und je nach Fragmentgröße in 0,6-3 %igen horizontalen Agarose-Gelen aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1x TBE Puffer aufgelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt für 1h bei Raumtemperatur.

<u>TBE Puffer</u>	<u>10x DNA Probenpuffer</u>	<u>Agarose-Gel</u>
90 mM Tris	50 % (w/v) Glycerin	0,6-3 % Agarose
90 mM Borsäure	0,1 M EDTA	1x TBE-Puffer
2,5 mM EDTA	0,5 % (w/v) Bromphenolblau	0,4 µg/ml Ethidiumbromid

2.16.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die DNA Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht ausgeschnitten. Zur Isolation der DNA wurde das QIAEX II Agarose Gel Extraktion Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Diese Methode nutzt die Adhäsion von DNA zu speziell behandelte Silica Matrix aus. Die Elution erfolgte mit 30 µl TE-Puffer. Die Eluate wurden bei -20°C gelagert.

2.16.9 Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation von Insert (ca. 150 µg DNA) und Vektor (ca. 50 µg DNA) erfolgte mit 1U T4-DNA-Ligase und 10x Ligasepuffer über Nacht bei 16°C in einem Volumen von 20 µl. Anschließend wurde 1/4 des Ligationsansatzes in CaCl₂ kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

2.16.10 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Für eine präparativen PCR wurde genomische Hefe-DNA als Matrize und *Pwo*-Polymerase (mit Korrekturaktivität) (5 U/µl) mit dem entsprechenden 10x PCR-Puffer des Herstellers eingesetzt (Boehringer, Mannheim), die *Taq*-DNA-Polymerase wurde dabei nur zu analytischen Zwecken verwendet. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl in einem Tri-Block PCR Heizblock durchgeführt.

Alternativ wurde eine analytische PCR mit Plasmid-DNA von transformierten Hefen durchgeführt. Hierzu wurde eine Hefekolonie in 50 µl Lytikase (20 U/µl) eingerührt, 7 min bei RT inkubiert, für 1 min in einer Heraeus Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Das Pellet wurde anschließend 5 min bei 95°C denaturiert (Aufbrechen der Hefezellen). Darauf wurde dann 20 µl eines PCR-Ansatzes hinzugegeben. Die Analyse des amplifizierten DNA-Abschnitts erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung.

Ein 50 µl PCR-Ansatz setzte sich in der Regel wie folgt zusammen:

1x PCR-Puffer (10x)
 0,2 mM dNTP
 25 pmol spezifische Oligonukleotide (sense/antisense)
 20-100 ng DNA-Matrize
 1-2 U *Pwo* bzw. *Taq*-DNA-Polymerase
 ad 50 µl mit bidest Wasser

Im Allgemeinen wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Schritt	Reaktion	Zeit	Temperatur
1.	Denaturierungsreaktion	5 min	94°C
2.	Aufschmelzen der DNA	1 min	94°C
3.	Bindung der Primer, Temperatur je nach Primer	90 sec	ca. 55°C
4.	Synthese des komplementären Stranges	90-120 sec	72°C
5.	Rest-Synthese	10 min	72°C
6.	Ende		4°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden 29 mal wiederholt.

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

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

Nach der Amplifikationsreaktion wurden die PCR-Produkte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Ammoniumacetat und dem 2,5-fachen Volumen 95 %igen Ethanol bei -20°C präzipitiert. Das in 20 µl sterilem Wasser aufgenommene DNA-Sediment konnte zur Restriktion (2.16.6) und nachfolgender Klonierung eingesetzt werden.

2.17 Proteinchemische Methoden

2.17.1 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurde SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach (Laemmli, 1970) durchgeführt. Als Gelapparatur wurde das System „Mini-Protean II“ der Fa. Biorad, München verwendet.

12 % Trenngel

2 ml 30 % Acrylamid
1 ml 2 M Tris, pH 8,8
1,9 ml H₂O
50 µl 10 % SDS
20 µl 10 % APS
2,5 µl TEMED
pro Gel 3,4 ml einsetzen

Sammelgel

0,2 ml 30 % Acrylamid
0,18 ml 0,5 M Tris, pH 6,8
1,85 ml H₂O
15 µl 10 % SDS
15 µl 0,1 % BPB
7,5 µl 10 % APS
1,25 µl TEMED

1x SDS Probenpuffer

10 % (v/v) Glycerin
62,5 mM Tris pH 6,8
3 % (w/v) SDS
5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
1 % (w/v) Bromphenolblau

5x Laufpuffer (PAGE)

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

Coomassie-Blau-Färbung (R250)

0,5 % (w/v) Coomassie-Blau
10 % (v/v) Essigsäure
40 % (v/v) Methanol

Coomassie-Entfärber

10 % (v/v) Essigsäure
35 % (v/v) Methanol

Amido-Schwarz-Färbelösung

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

Als Standardmarker wurde der „Molecular Weight Low Range Standard“ benutzt. Der Marker enthält Proteine mit den Molekulargewichten 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 21 kDa und 14 kDa. Die Proteinbanden wurden mit kolloidalem Coomassie angefärbt.

2.17.2 Immunoblotting und Immundetektion

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte in einer Mini-Transblot-Zelle nach Herstellerangaben bei einer Stromstärke von 300 mA und für

1 Stunde. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde vor der Antikörperdetektion eine Amidoschwarz-Färbung der Membran durchgeführt. Zur Absättigung der unbesetzten Bindungsstellen wurde die Membran 30 min in Blotwaschpuffer mit 5 % Magermilchpulver leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Membran eine Stunde lang mit dem entsprechenden ersten Antikörper inkubiert. Nach 1 Stunde Waschen mit Blotwaschpuffer, erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten und an Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper. Die Membran wurde mehrmals mit Blotwaschpuffer gewaschen. Der Nachweis der Peroxidase des zweiten Antikörpers erfolgte mit dem ECL-Immunoblot-Detektionssystem (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Entwicklung des Filmes fand in einer Konica Anlage (SRX 101A) statt.

Blotpuffer, pH 9,0

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

Blotwaschpuffer

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

20x PBS, pH 7,5

94,04 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
6,79 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
175,32 g NaCl
ad 1 l H_2O

2.18 Heterologe Expression

2.18.1 Bakterielle Expression der Fusionsproteine

Die Fusionskonstrukte wurden in den *E. coli* Stamm C41 transformiert. Die Anzucht der Transformanten erfolgte über Nacht in 50 ml LB/Amp Medium bei 37°C. Die Kultur wurde auf eine optische Dichte OD_{600} von 0,2 in 500 ml LB/Amp Medium verdünnt und bei 37°C bis zur einer optischen Dichte OD_{600} von 0,6 kultiviert. Es folgte die Induktion mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (1 mM - 0,1 mM) und eine Inkubation für 1 - 5 h bei Raumtemperatur. Zur Überprüfung der Überexpression wurden vor der Induktion, sowie in einstündigen Intervallen Proben entnommen, mit einer Tischzentrifuge sedimentiert, in 100 µl 2x SDS Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Von den analysierten Proben wurden Glycerinkulturen angelegt, die fortan zur Beimpfung von Flüssigkulturen eingesetzt wurden.

2.18.2 Zellaufschluss und Löslichkeitstest

Nach Induktion der Zellen wie unter (2.18.1) beschrieben wurden die Zellen für 10 min bei 7000 rpm sedimentiert (SLA 3000) mit H₂O gewaschen. Nach Bestimmung des Feuchtgewichts erfolgte die Aufnahme in 10fachen Vol. entsprechendem Lysispuffer. Der Aufschluss erfolgte danach durch 6x 40 sec Ultraschallbehandlung unter Kühlung im Eiswasserbad. Das Zellhomogenat wurde anschließend 30 min bei 12000 rpm (SS34) sedimentiert. Der gewonnene Überstand wurde dann zur Affinitätschromatographie eingesetzt. Zur Kontrolle, ob sich die Proteine im Überstand befinden, wurde das Sediment im Lysispuffer aufgenommen. Aus dieser Lösung sowie aus dem Homogenat und dem Überstand wurden jeweils 100 µl entnommen und mit 100 µl 2x SDS Puffer versetzt. Danach erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung mit anschließender Coomassie-Färbung.

Lysispuffer für die unterschiedlichen Fusionsproteine:

GST-Fusion

10x PBS pH 7,3
1,4 M NaCl
27 mM KCl
101 mM Na₂HPO₄
18 mM KH₂PO₄

His₆-Fusion

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
pH 8,0

MBP-Fusion

20 mM Tris-HCl pH 7,4
200 mM NaCl
1 mM EDTA

Den eisgekühlten Lysispuffern wurde vor dem Gebrauch jeweils 0,02 % PMSF und pro 50 ml 1 Proteaseinhibitortablette zugesetzt.

2.18.3 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie

a) **Aufreinigung von Glutathion S-Transferase-Fusionsproteinen**

Zur Überexpression von Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen in *E.coli* Zellen wurde das Glutathion S-Transferase Gen-Fusions-System der Fa. Amersham Bioscience (Freiburg, BRD) verwendet. Bei diesem Expressionssystem wird der Glutathion S-Transferase Anteil aminoterminal an das zu exprimierende Protein fusioniert. Die Expression des resultierenden Fusionsprotein steht unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren tac-Promotors. Für die Überexpression erfolgte die Anzucht wie unter (2.18.1) beschrieben. Die Affinität von GST zur Glutathion Sepharose 4B Matrix wurde zur Aufreinigung der Proteine ausgenutzt. Dazu wurde 1 ml Glutathion Sepharose Matrix in einer Säule vorgelegt, mit ca. 10 ml 1x PBS gewaschen und mit den löslichen Proteinextrakten, die das induzierte

Fusionsprotein enthielten, inkubiert. Die ungebundenen Proteine wurden über einen Waschschrift mit 1x PBS entfernt. Als nächster Schritt folgte die Trennung von Protein und Matrix mittels reduziertem Glutathion oder aber bei *in vitro* Bindungs-Studien erfolgte anschließend die Inkubation mit dem Bindungspartner. Hierbei wurden nicht gebundene Proteine durch einen Waschschrift mit 1x PBS entfernt und danach mit Elutionspuffer eluiert. Die Elution erfolgte für 3x je 15 min mit 500-800 µl Elutionspuffer. Schließlich wurden Aliquots mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS PAGE analysiert. Die Regeneration der Matrix erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Glutathion Elution Puffer

10 mM reduziertes Glutathion
50 mM Tris-HCl ,pH 8,0

6x SDS-Probenpuffer

0,35 M Tris-HCl, pH 6,8
10,28 % (w/v) SDS
36 % (w/v) Glycerol
0,6 M DTT
0,012 % (w/v) Bromphenolblau

b) *Aufreinigung von His₆-Fusions-Proteinen*

Zur heterologen Überexpression eines 6xHis-Fusionsproteins wurde das His-Expressionssystem der Firma Qiagen verwendet. Bei diesem Expressionssystem werden 6 Histidine an das zu exprimierende Protein N-terminal fusioniert, was die spätere Aufreinigung des Proteins gewährleisten soll. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren T5-Promotors. In diesem Versuch wurde die Affinität von Histidin zur Ni-NTA-Matrix ausgenutzt. Dazu wurden 0,3 ml Ni-NTA-Matrix vorgelegt. Nachdem das aufzureinigende Protein an die Ni-NTA-Matrix gebunden hatte, folgte der erste Waschschrift mit Wasch-Puffer. Sollte das Protein zur Antikörpergewinnung eingesetzt werden, erfolgte intensives Waschen mit anschließender Elution. Für *in vitro* Bindungsstudien wurde nach dem Waschen die Matrix mit dem putativen Bindungspartner für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend intensiv gewaschen. Dann erfolgte die Elution mit 3x 500-800 µl Elutionspuffer. Aliquots der Elution wurden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und über SDS-PAGE analysiert.

Wasch-Puffer

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
20 mM Imidazol
mit NaOH pH 8,0 einstellen

Elutionspuffer

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
200-500 mM Imidazol

c) Bakterielle Überexpression von Maltose bindenden Fusions-Proteinen

Für bakterielle Überexpression von Maltose bindenden Fusions(MBP)-Proteinen wurde das Protein-Fusion- und Reinigungssystem der Fa. NEB eingesetzt. Hierbei wird der MBP-Anteil N-terminal an das zu exprimierende Protein fusioniert. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren *tac*-Promotors. Bei diesem Expressionssystem wurde die Affinität des maltosebindenden Proteins an Amylose-Harz ausgenutzt. Dazu wurde 0,3 ml Amylose-Harz vorgelegt und mit dem löslichen Überstand eines MBP-Fusionsproteins inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4°C wurde die Matrix mit Säulenpuffer gewaschen und eluiert, bzw. für *in vitro* Bindungsstudien mit dem Bindepartner inkubiert (1 h, bei 4°C), anschließend gewaschen und dann für 3x 15 min mit Elutionspuffer eluiert. Die Proben wurden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt.

Säulen-Puffer

20 mM Tris-HCl pH 7,4
200 mM NaCl
1 mM EDTA

Elutionspuffer

20 mM Tris-HCl pH 7,4
200 mM NaCl
1 mM EDTA
10 mM Maltose