

**Untersuchung der CO₂-abhängigen Regulation der
Carboanhydrase *NCE103* in Hefepilzen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen
Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von M. Sc. Susann Pohlars

geboren am 06.09.1987 in Meerane

2017

Die vorliegende Arbeit wurde im Zentrum für Innovationskompetenz (ZIK) Septomics sowie im Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut in der Forschungsgruppe Fungal Septomics unter der Leitung von Prof. Dr. med. Oliver Kurzai durchgeführt.

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Oliver Kurzai

Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

2. Prof. Dr. Axel A. Brakhage

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena

3. Prof. Dr. Joachim Morschhäuser

Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Datum der öffentlichen Verteidigung: 15.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	IV
Summary	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. CO ₂ – Biologie und Bedeutung	1
1.1.1. Aufnahme von CO ₂	2
1.2. Einfluss von CO ₂ auf Pilze	4
1.3. CO ₂ -Detektion und Signalübertragung in Pilzen.....	7
1.3.1. CO ₂ -Signalübertragung durch cAMP und Adenylylcyclasen	8
1.3.2. CO ₂ -Signalübertragung durch Carboanhydrasen.....	8
1.4. Regulation der CO ₂ -Signalübertragung	10
1.5. Ziel der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Verwendete Stämme und Plasmide	16
2.2. Kultivierung von Hefen zur Bestimmung der Genexpression unter verschiedenen CO ₂ - Bedingungen.....	24
2.3. Nukleinsäuremethoden.....	26
2.3.1. RNA-Isolation und qRT-PCR	26
2.3.2. Überexpression von <i>ScNCE103</i> , <i>ScCST6</i> und <i>ScSCH9</i> in <i>Escherichia coli</i>	27
2.3.3. Überexpression von Genen in <i>S. cerevisiae</i> mithilfe des <i>GAL1</i> Promoters.....	28
2.3.4. Expression von Genen in <i>S. cerevisiae</i> Δ <i>cst6</i> und Δ <i>sch9</i>	29
2.3.5. Spezifische Mutagenese von <i>S. cerevisiae</i> <i>SCH9</i>	30
2.3.6. Herstellung einer <i>C. glabrata</i> Δ <i>sch9</i> -Mutante.....	31
2.4. Proteinbiochemische Methoden.....	33
2.4.1. Zellaufschluss in <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i>	33
2.4.2. Western Blot	34
2.4.3. Aufreinigung rekombinanter Proteine mit immobilisierter Metallchelat- Affinitätschromatographie (IMAC).....	35
2.4.4. Aufreinigung rekombinanter Proteine durch Größenausschlusschromatographie	36
2.4.5. Produktion und Testung spezifischer Antikörper gegen <i>ScNce103</i> und <i>ScCst6</i>	36
2.4.6. Immunpräzipitation	37
2.4.7. Radioaktiver Phosphorylierungs-Assay.....	38
2.4.8. Massenspektrometrische Analyse der <i>ScCst6</i> -Phosphorylierung	39

2.5. Messung der ScNCE103 Promotoraktivierung mittels GFP	44
2.6. Statistische Auswertung	44
3. Ergebnisse	45
3.1. Identifizierung möglicher Cst6-spezifischer Enzyme mit Einfluss auf die NCE103 Expression	45
3.1.1. Die ScNCE103 Expression wird CO ₂ -abhängig reguliert.....	45
3.1.2. Die Kinasemutanten $\Delta tpd3$, $\Delta bud32$, $\Delta ptk2$, $\Delta ptp1$ und $\Delta sch9$ zeigen eine erhöhte Expression von ScNCE103 in 5% CO ₂	46
3.1.3. ScSch9 ist der wahrscheinlichste ScCst6- Kinasekandidat	49
3.1.4. Identifizierung möglicher Phosphatasekandidaten	50
3.2. Herstellung rekombinanter Proteine und spezifischer Antikörper für die Untersuchung auf Proteinebene	52
3.2.1. Überexpression von ScNCE103, ScCST6 und ScSCH9.....	53
3.2.2. Aufreinigung von ScNce103-His, ScCst6-His und ScSch9-His.....	53
3.2.3. Herstellung spezifischer Antikörper gegen ScNce103 und ScCst6	57
3.3. ScSch9-Mangel erhöht ScNce103 Proteinlevel und ScNCE103 Promoteraktivierung unter 5% CO ₂	59
3.4. Protein-Protein-Interaktionen zwischen ScCst6 und ScSch9	62
3.4.1. ScSch9 bindet ScCst6	62
3.4.2. ScSch9 phosphoryliert ScCst6	63
3.5. Identifizierung möglicher Phosphorylierungsstellen von ScCst6 mittels LC-MS/MS	65
3.5.1. <i>S. cerevisiae</i> WT Cst6 ist stark phosphoryliert.....	65
3.5.2. Vergleich der Cst6-Phosphorylierungsmuster von <i>S. cerevisiae</i> $\Delta sch9$ und WT zeigt keine eindeutigen Unterschiede	69
3.5.3. Cst6-Phosphorylierung an S266 ist entscheidend für die ScNCE103 ^{CO₂} Regulation	70
3.6. Die Funktion von Sch9 in der Carboanhydrase-Regulation ist konserviert in <i>C. albicans</i> und <i>C. glabrata</i>	71
3.6.1. Deletion von SCH9 erhöht die NCE103 Expression in <i>C. glabrata</i>	71
3.6.2. Deletion von SCH9 erhöht die NCE103 Expression in <i>C. albicans</i>	72
3.7. Sch9-Aktivierung durch Pkh1/2 ist entscheidend für die ScNCE103 Regulation.....	73
4. Diskussion	78
4.1. Identifizierung von Sch9 als Cst6-spezifische Kinase mit Einfluss auf die NCE103 Regulation	78
4.1.1. Funktion von Sch9.....	79
4.1.2. Regulation von Sch9.....	80
4.2. Bedeutung von weiteren auffälligen Kinasen mit Einfluss auf die Expression von NCE103	82
4.3. Identifizierung von Cst6 S266 als entscheidende Phosphorylierungs-stelle für die NCE103 Regulation	83

4.4. Alternative Regulationsmechanismen von <i>NCE103</i>	85
4.4.1. Aca1 als weiterer Aktivator der <i>NCE103</i> Expression	86
4.4.2. HOG-Signalweg	87
4.4.3. pH-Regulation	91
5. Schlussfolgerungen und Ausblick	93
6. Literaturverzeichnis	95
7. Abkürzungsverzeichnis	VII
8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	X
9. Anhang.....	XII
9.1. Zusätzliche Daten	XII
9.2. Lebenslauf.....	XVI
9.3. Publikationsverzeichnis	XVII
9.4. Danksagung	XIX
9.5. Selbstständigkeitserklärung	XXI

Zusammenfassung

Die Anpassung an sich ändernde CO₂-Bedingungen ist essentiell für das Überleben aller Organismen. Vor allem Mikroorganismen, die den menschlichen Körper besiedeln und infizieren, sind stark schwankenden CO₂-Konzentrationen ausgesetzt. Diese reichen von 0,04% in der Luft bis hin zu 5% und mehr im menschlichen Körper. Carboanhydrasen sind ubiquitär vorkommende Metalloenzyme, die die Fixierung von CO₂ durch Umwandlung in Bikarbonat ermöglichen. Dieser Prozess spielt vor allem unter CO₂-Mangelbedingungen eine Rolle, da nur so die metabolischen Anforderungen der Zelle erfüllt werden können. So ist die Carboanhydrase Nce103 in Pilzen essentiell für das Wachstum in Luft. Die Expression der Carboanhydrase wird dabei selbst CO₂-abhängig reguliert. Im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt die Induktion von *NCE103* durch den aktivierenden Transkriptionsfaktor Cst6, in den verwandten humanpathogenen Hefepilzen *Candida albicans* und *Candida glabrata* durch dessen Homolog Rca1. Der dem Transkriptionsfaktor übergeordnete Regulationsmechanismus war jedoch unbekannt. In dieser Arbeit wurde Sch9 als Cst6/Rca1-spezifische Kinase identifiziert, die durch Phosphorylierung von Cst6/Rca1 die *NCE103* Expression CO₂-abhängig reguliert. Dies basierte darauf, dass die Deletion von *SCH9* eine Deregulation der *NCE103* Expression in 5% CO₂ zur Folge hat. Dieser Effekt war auch auf Proteinebene nachweisbar. Die Untersuchung der Interaktion zwischen Sch9 und Cst6 zeigte nicht nur das Bindungsvermögen beider Proteine, sondern auch die Phosphorylierung von Cst6 durch Sch9 und bestätigte Sch9 als Cst6-spezifische Kinase. Als Regulationsstelle in Cst6 wurde S266 identifiziert, denn Sch9-vermittelte Phosphorylierung an S266 ist entscheidend für die *NCE103* Repression in 5% CO₂. Sch9 wird über Phosphorylierung, hauptsächlich vermittelt durch die beiden Kinasen TORC1 und Pkh1/2, aktiviert. Die Funktion von Sch9 hinsichtlich der *NCE103* Regulation wird jedoch allein durch Pkh1/2 bestimmt. Eine Phosphorylierung durch TORC1 scheint für die *NCE103* Regulation überflüssig zu sein. Damit stellt Sch9 die Verbindung zwischen CO₂-Anpassung und Lipid-Signalübertragung via Pkh1/2 dar. Die zunächst im Modellorganismus *S. cerevisiae* identifizierte CO₂-Anpassung über Sch9/Cst6 ist in den humanpathogenen Hefepilzen *C. albicans* und *C. glabrata*

| Zusammenfassung

konserviert. Auch in diesen beiden Spezies beeinträchtigte die Deletion von *SCH9* die CO₂-abhängige Regulation der Carboanhydrase. Da sich Homologe von Cst6/Rca1 zudem in weiteren pathogenen Pilzspezies finden, wird eine umfassende Konservierung dieser Signalkaskade angenommen. Dies charakterisiert die identifizierten Schlüsselfaktoren als mögliche Ziele neuer therapeutischer Ansätze.

Summary

The ability to adapt to changing CO₂ conditions is essential for all living organisms. Particularly microorganisms colonizing and infecting the human body are exposed to highly variable CO₂ concentrations ranging from 0.04% in the atmosphere to 5% and even more in the blood and specific bodily niches. Carbonic anhydrases are ubiquitous metalloenzymes that enable fixation of CO₂ via its conversion into bicarbonate. This process ensures adequate metabolic requirements for cells in CO₂-limiting environment. Thus, in fungi and other eukaryotes, carbonic anhydrases are essential for growth in low CO₂. The fungal specific carbonic anhydrase *NCE103* of the model organism *Saccharomyces cerevisiae* is expressed in response to CO₂ availability and regulated by the transcriptional activator Cst6. In the *S. cerevisiae* related human pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata*, *NCE103* expression is regulated by the Cst6 homolog Rca1. To identify the kinase acting upstream of Cst6/Rca1, a *S. cerevisiae* kinase/phosphatase mutant library was screened for altered *NCE103* regulation. From this screen we identified Sch9 as the Cst6-specific kinase regulating *NCE103* expression CO₂-dependently via phosphorylation of Cst6. This was based on the findings that deletion of *SCH9* deregulates *NCE103* expression at the mRNA and protein level in 5% CO₂ and the ability of Sch9 to bind and phosphorylate Cst6. Furthermore, we found that phosphorylation of Cst6 at residue S266 is crucial for carbonic anhydrase repression in 5% CO₂. The activity of the kinase Sch9 is mediated by phosphorylation of its two regulators, Pkh1/2 and TORC1, but only phosphorylation by Pkh1/2 influences *NCE103* regulation. In contrast, Sch9 phosphorylation by TORC1 seems to be dispensable. The identified *NCE103* regulation cascade involving Sch9/Cst6 was shown to be conserved in *C. albicans* and *C. glabrata*, because *SCH9* deletion affected CO₂-dependent regulation of *NCE103* in these species too. Since homologs of Cst6/Rca1 are also found in other pathogenic fungi, a broader conservation of the identified signaling cascade is likely. This research identifies key players of this novel CO₂ sensing cascade, which are promising targets of new therapeutic approaches.

1. Einleitung

1.1. CO₂ – Biologie und Bedeutung

Das Treibhausgas Kohlenstoffdioxid (CO₂) macht mit ~ 0,036% nur einen geringen Anteil der Atmosphäre aus, hat allerdings weitreichenden Einfluss auf das Leben aller Organismen. CO₂ ist das Produkt der Zellatmung eukaryontischer Zellen und entsteht im Zuge der Oxidation von Glucose während des Citrat-Zyklus in den Mitochondrien (Cummins et al, 2014). Damit ist CO₂ ein Nebenprodukt der Energiebereitstellung in Form von ATP, einem Prozess der lebenswichtig für alle Eukaryonten ist. Zudem ist CO₂ als anorganische Verbindung Ausgangsstoff für die Photosynthese von Pflanzen und Bakterien. Dabei wird CO₂ und Wasser unter der Einwirkung von Licht zu organischen Kohlenstoffverbindungen und Sauerstoff umgewandelt (Janssen et al, 2014). CO₂ ist Substrat für das Enzym RUBISCO, welches CO₂ als ersten Schritt des Calvin-Zyklus durch Bindung an Ribulose-1,5-bisphosphat fixiert und dadurch die Photosynthese von Pflanzen und Bakterien ermöglicht (Andersson & Backlund, 2008). Die durch Photosynthese entstehenden Kohlenhydrate dienen zum einen als Energieträger aber auch als Baustoff zur Synthese einer Vielzahl weiterer Substanzen. Neben Zellatmung und Photosynthese spielt CO₂ eine essentielle Rolle als Substrat für Carboxylierungsreaktionen und Produkt von Decarboxylierungen (Raven, 2006).

Zudem ist CO₂ ein wichtiges Signalmolekül in allen Eukaryonten, von Säugetieren über Insekten und Nematoden bis hin zu Pilzen (Sharabi et al, 2009). Daher kommt der Detektion und Anpassung an extrazelluläre CO₂-Konzentrationen eine große Bedeutung zu. Gerade Mikroorganismen, die sowohl in der Umwelt überleben als auch den menschlichen Organismus kolonisieren oder infizieren können, sind enormen CO₂-Schwankungen ausgesetzt. So beträgt die CO₂-Konzentration im Blut ~ 5% und ist damit um ein Vielfaches höher als in der Luft. In spezifischen Nischen wie Biofilmen kann die CO₂-Konzentration aufgrund chemischer Heterogenität sogar noch höher sein (Stewart & Franklin, 2008). In zu hohen Konzentrationen kann CO₂ den mikrobiellen Metabolismus negativ beeinflussen.

Beispielsweise wirkt es bei Pilzen durch Hemmung von Zellwachstum, Knospung und Hyphenbildung toxisch (Chen & Gutmans, 1976; Jain & Agrawal, 1994).

1.1.1. Aufnahme von CO₂

CO₂ gelangt durch passive Diffusion in die Zellen (Missner et al, 2008), allerdings ist unklar, ob dieser Prozess allein genügt um ausreichende Mengen CO₂ in die Zellen zu transportieren (Kaldenhoff et al, 2014). Eine wichtige Rolle im CO₂-Transport diverser Spezies besitzen Aquaporine (Endeward et al, 2006; Nakhoul et al, 1998; Uehlein et al, 2003). Hierbei handelt es sich um membrandurchspannende Proteine, die Tetramere bilden und neben Wasser auch volatile Substanzen wie CO₂ transportieren (de Groot et al, 2003; Murata et al, 2000; Uehlein et al, 2003). Neben Aquaporinen wurde in der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* das Rhesusprotein Rh1, dessen Expression CO₂-abhängig reguliert wird, mit dem Transport von CO₂ in Verbindung gebracht (Soupene et al, 2004; Soupene et al, 2002). Auch im Menschen wurden Rhesusproteine als CO₂-Transporter identifiziert. Hier wurde gezeigt, dass eine Deletion des Rhesusproteins RhAG in Erythrozyten den CO₂-Transport verringert (Endeward et al, 2008).

Einmal in die Zelle aufgenommen, reagiert CO₂ spontan mit Wasser zu Bikarbonat ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$), wodurch es zu einer Fixierung von CO₂ in der Zelle kommt. Bei hoher extrazellulärer CO₂-Konzentration durchdringen entsprechend viele CO₂-Moleküle die Zellmembran. Die spontane Umwandlung der diffundierenden CO₂-Moleküle in HCO₃⁻ genügt, um die metabolischen Ansprüche der Zelle zu erfüllen (Abb. 1). Unter niedrigen CO₂-Bedingungen wie Luft genügt die spontane Fixierung von CO₂ im Zellinneren nicht, um ausreichend hohe Level HCO₃⁻ zur Aufrechterhaltung metabolischer Prozesse zu erzeugen. Stattdessen ist die reversible Umwandlung von CO₂ zu HCO₃⁻ in Luft abhängig von Carboanhydrasen, wodurch diese eine zentrale Rolle im CO₂-Metabolismus spielen (Abb. 1). Carboanhydrasen sind ubiquitär vorkommende, meist Zink enthaltende Metalloenzyme, die die reversible Reaktion von CO₂ zu HCO₃⁻ katalysieren (Supuran, 2008a). Dabei kommt es zu einer

Beschleunigung auf bis zu 10^6 Reaktionen pro Sekunde (Lindskog, 1997). Dadurch beeinflussen Carboanhydrasen neben Biosynthesewegen wie Carboxylierungsreaktionen auch die pH-Homöostase, da die Produktion von HCO_3^- eine pH-Verringerung zur Folge hat (Aguilera et al, 2005b; Supuran, 2008a). Carboanhydrasen wurden in allen 3 Domänen des Lebens entdeckt und werden in 6 verschiedene Klassen (α , β , γ , δ , ζ , η) unterteilt, die sich evolutionär unabhängig voneinander entwickelten und sich stark in Aminosäuresequenz und Struktur unterscheiden (Tabelle 1) (Del Prete et al, 2014; Elleuche & Poggeler, 2009). Tierische Carboanhydrasen gehören ausnahmslos zur α -Klasse. In Säugetieren wurden 16 verschiedene gewebe- und organspezifische Carboanhydrasen und Carboanhydrase-verwandte Proteine beschrieben (Supuran, 2008a).

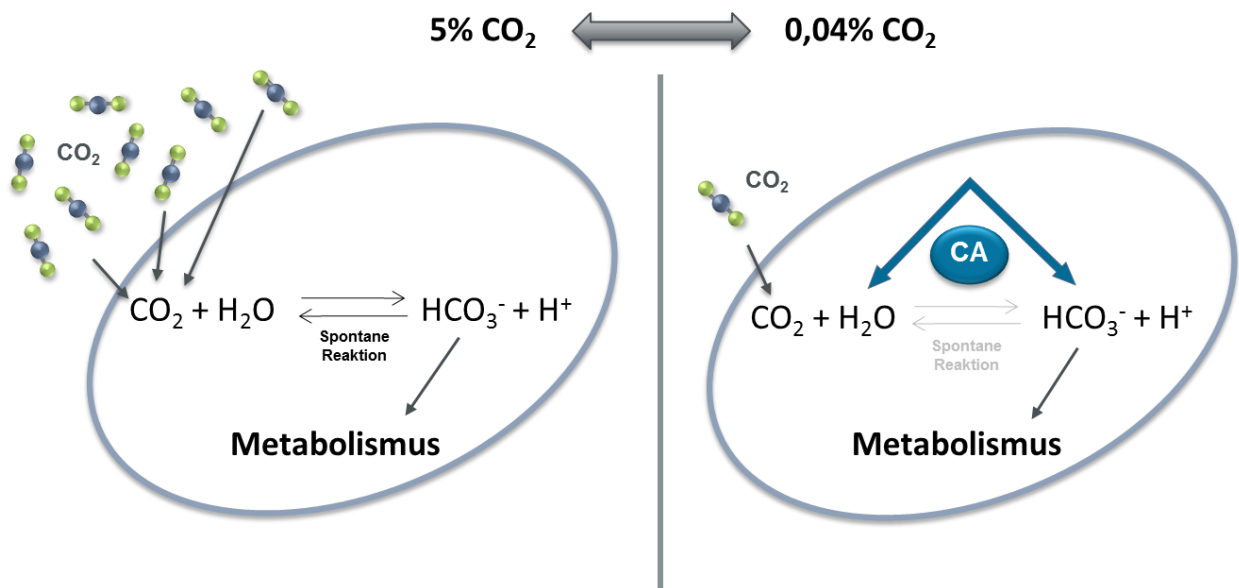


Abb. 1 Fixierung von CO_2 durch Umwandlung in Bikarbonat unter sich ändernden CO_2 -Konzentrationen

In Umgebungen mit hoher extrazellulärer CO_2 -Konzentration (5%) gelangen durch Diffusion viele CO_2 -Moleküle in die Zelle und reagieren spontan mit Wasser zu HCO_3^- , wodurch es zu einer Fixierung von CO_2 kommt. In Form von HCO_3^- kann dieses dann für metabolische Prozesse genutzt werden. In CO_2 -armem Milieu wie Luft (0,04% CO_2) diffundieren entsprechend wenige CO_2 -Moleküle in die Zelle und eine spontane Umwandlung zu HCO_3^- findet kaum noch statt. Stattdessen katalysieren Carboanhydrasen die reversible Reaktion von CO_2 zu HCO_3^- , wodurch sie essentiell sind für das Wachstum in Nischen mit niedriger CO_2 -Konzentration.

Tabelle 1: Unterteilung der Carboanhydrasen und deren Vorkommen

Klasse	Vorkommen/Beispiele
α	Tiere, Bakterien, Pflanzen, Algen, Pilze z. B. humane CA1 - CA15
β	Bakterien, Pflanzen, Algen, Pilze z. B. NCE103 von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida albicans</i> und <i>Candida glabrata</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> CAN1/2
γ	Archäen (Methanogene)
δ	Kieselalgen
ζ	Chemolithotrophe Bakterien, Cyanobakterien
η	<i>Plasmodium falciparum</i>

1.2. Einfluss von CO₂ auf Pilze

Einmal in die Zelle aufgenommen, wirkt CO₂ als Signalmolekül und kann dadurch die Expression spezifischer Gene beeinflussen (Taylor & Cummins, 2011). Gerade für Organismen, die starken CO₂-Schwankungen, wie sie zwischen menschlichem Körper und Umwelt auftreten, ausgesetzt sind, ist eine Anpassung an sich ändernde Bedingungen essentiell. Als humanpathogene Mikroorganismen spielen neben Bakterien auch Pilze eine große Rolle. Die Erfassung und Messung der CO₂-Konzentration wurde besonders in den Hefepilzen *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* untersucht (Bahn & Muhlschlegel, 2006; Mitchell, 2005).

C. albicans ist ein polymorpher Hefepilz, der als Kommensale auf Haut und Schleimhäuten des Menschen zu finden ist. Für gesunde Individuen ist diese Besiedelung aufgrund der ausgeglichenen Balance mit anderen Vertretern der Mikroflora harmlos (da Silva Dantas et al, 2016; Neville et al, 2015). Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikroflora durch Antibiotika, Beeinträchtigungen des Immunsystems durch Immunsuppression oder Stress, sowie Änderungen der lokalen Umgebung, wie pH Wert und Nährstoffangebot, können jedoch zu vermehrtem Wachstum und Infektionen führen (Nobile & Johnson, 2015). Dies reicht von oberflächlichen Infektionen der Haut bis hin zu lebensgefährlichen systemischen Infektionen von Geweben und Blut (Nobile & Johnson, 2015). Das Erfassen der extrazellulären CO₂-Konzentration ermöglicht und veranlasst den Wechsel zwischen Kommensalismus und Pathogenität in *C. albicans* (Abb. 2). So wurde gezeigt, dass

C. albicans bei Wachstum unter 6% CO₂ von der Hefeform zum filamentösen Wachstum wechselt, was zur erhöhten Virulenz des Pilzes beiträgt (Mayer et al, 2013; Sheth et al, 2005). Diese CO₂-induzierte Filamentierung manifestiert sich vorwiegend in Form von Pseudohyphen und ist unabhängig von Kulturmedium und pH Wert (Klengel et al, 2005). Persi *et al.* beobachteten, dass hohe CO₂-Konzentrationen zu einer gesteigerten Adhäsion von *C. albicans* an vaginale Epithelzellen führt (Persi et al, 1985). Zur effektiven Paarung wandelt sich *C. albicans* phänotypisch von weiß zu opaque (white-to-opaque switch). Physiologische CO₂-Konzentrationen von 5% induzieren diesen Wechsel und stabilisieren den opaque-Phänotyp, wodurch die Paarung im menschlichen Wirt ermöglicht wird (Huang et al, 2009). Die durch Carboanhydrasen katalysierte Umwandlung von CO₂ in HCO₃⁻ ist essentiell für das Wachstum des Pilzes in Luft. Damit ist sie Voraussetzung für die Gewebsschädigung in Nischen, in denen geringe CO₂-Level vorherrschen (Klengel et al, 2005). Als möglicher CO₂-Sensor wurden Adenylylcyclasen identifiziert (Cummins et al, 2014). Eine Mutation der Adenylylcyclase *CDC35* (auch *CYR1* genannt) in *C. albicans* vermindert die Virulenz in Modellen für oberflächliche als auch systemische Infektionen drastisch (Rocha et al, 2001). *Cyr1* reguliert darüber hinaus die Biofilmbildung (Hogan & Muhlschlegel, 2011; Verstrepen & Klis, 2006). Folglich bedingt die Erfassung extrazellulärer CO₂-Level auch direkt die Pathogenität und Virulenz des Pilzes. Darüber hinaus reguliert CO₂/HCO₃⁻ die Genexpression. Beispielsweise führt 5% CO₂ in *C. albicans* zur Herunterregulation der Carboanhydrase *NCE103* und des Hitzeschockproteins *HSP12* (Cottier et al, 2012; Sheth et al, 2008).

C. neoformans ist ein exogener humanpathogener Pilz, der ubiquitär in der Umwelt zu finden ist. Die Inhalation von Sporen kann zu invasiven Infektionen führen, lebensgefährliche Infektionen treten jedoch fast ausschließlich in immunsupprimierten Patienten auf (Lin & Heitman, 2006). Während seines Lebens- und Infektionszyklus ist *C. neoformans* sowohl den niedrigen CO₂-Konzentrationen in der Atmosphäre als auch hohen CO₂-Leveln im menschlichen Körper ausgesetzt (Brown et al, 2007). Auf einen Anstieg der CO₂-Konzentration reagiert *C. neoformans* mit der Ausbildung einer Polysaccharidkapsel, welche eine effektive Phagozytose vermindert und essentiell für die Virulenz *in*

vivo ist (Abb. 2) (Granger et al, 1985; Zaragoza et al, 2003). In 5% CO₂ wird zudem die sexuelle Differenzierung von *C. neoformans* gehemmt: Die Repression der Pheromonbildung hemmt den Pheromon-induzierten MAP (Mitogen activated protein) Kinase-Signalweg und blockiert dadurch die Zell-Zell-Fusion als ersten Schritt der sexuellen Reproduktion (Bahn et al, 2005). Wie auch für *C. albicans* beschrieben, ist die Carboanhydrase *CAN2* essentiell für das Wachstum von *C. neoformans* in Luft (Bahn et al, 2005). Abhängig von *CAN2*, und damit von der Umwandlung von CO₂ in HCO₃⁻, ist auch die Expression des Transkriptionsfaktors *ATF1*, welcher neben der Kapselbildung die Melaninproduktion negativ beeinflusst (Kim et al, 2010). Melanin gilt ebenfalls als Virulenzfaktor und schützt *C. neoformans* vor Phagozytose und anderen Angriffen des Immunsystems (Wang et al, 1995).

Verglichen mit *C. albicans* und *C. neoformans* ist über den Einfluss von CO₂ auf *Candida glabrata* weitaus weniger bekannt (Abb. 2). *C. glabrata* ist, wie *C. albicans*, sowohl ein Kommensale als auch ein opportunistischer, humanpathogener Hefepilz. Phylogenetisch ist *C. glabrata* jedoch näher mit *Saccharomyces cerevisiae* verwandt als mit *C. albicans* (Dujon et al, 2004). Erhöhte CO₂-Konzentrationen führen in *C. glabrata* zur Repression der Carboanhydrase *NCE103*, reguliert durch den Transkriptionsfaktor *Rca1* (Cottier et al, 2013). Dieser CO₂-assoziierte Transkriptionsfaktor reguliert auch die Expression des Adhäsins *EPA6*, welches durch starke Hochregulation die Biofilmbildung beeinflusst (Riera et al, 2012). Eine Deletion des Transkriptionsfaktors *RCA1* resultiert in einer erhöhten *EPA6*-Expression und führt dadurch zu verstärkter Biofilmbildung (Riera et al, 2012).

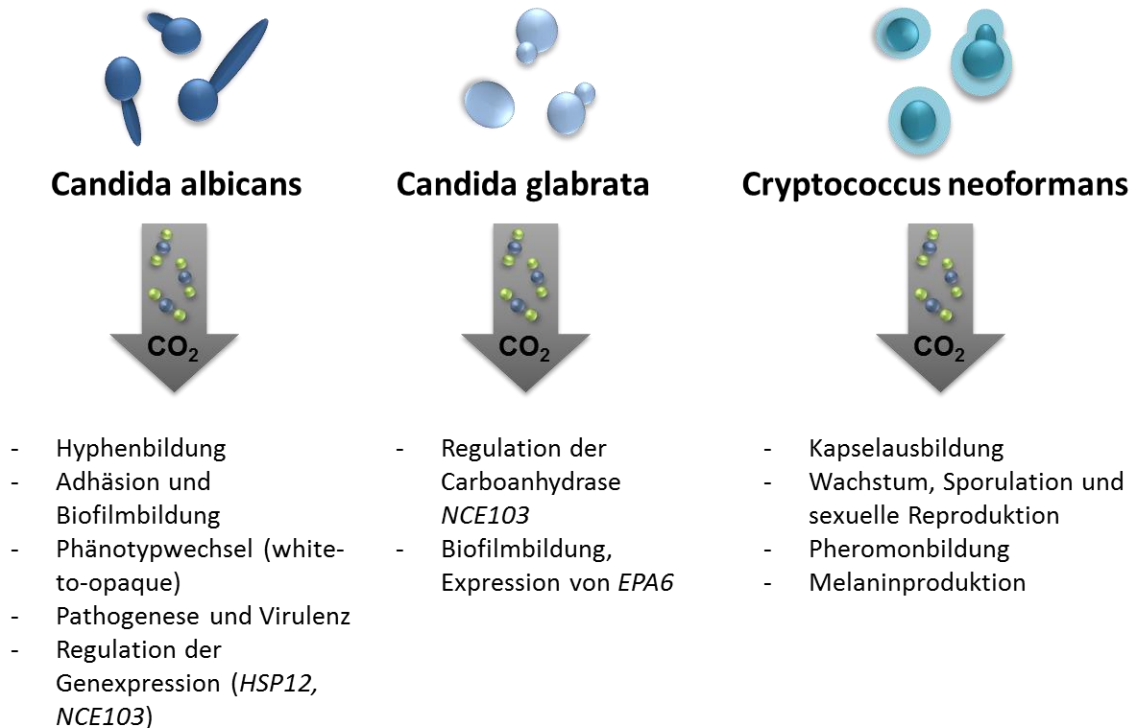


Abb. 2 Einfluss von CO₂ und HCO₃⁻ auf humanpathogene Pilze

Dargestellt sind bisher beschriebene Auswirkungen von CO₂ und HCO₃⁻ auf die humanpathogenen Hefepilze *C. albicans*, *C. glabrata* und *C. neoformans*.

1.3. CO₂-Detektion und Signalübertragung in Pilzen

Als nicht-polares Molekül gelangt CO₂ vorwiegend über Diffusion in Pilzzellen. Zwar wurden in Pilzen auch Aquaporin-ähnliche Proteine identifiziert, allerdings ist unklar, ob diese auch zum Transport von CO₂ beitragen (Bahn & Muhlschlegel, 2006). Eine Aquaporin-Mutante von *C. albicans* zeigte keine Beeinträchtigung der CO₂-abhängigen Filamentierung (Klengel et al, 2005). Gleichermäßen beeinflusste auch die Mutation eines Aquaporin-ähnlichen Gens in *C. neoformans* das Zellüberleben unter 5% CO₂ nicht (Bahn & Muhlschlegel, 2006). Eine weitere Möglichkeit der CO₂-Aufnahme stellen Rhesus-Proteine dar. Deren Pendant in Pilzen sind Methylaminpermeasen und Ammoniumtransporter (Mep/Amt). Mep Proteine wurden zwar auch in Hefepilzen identifiziert, jedoch nicht im Zusammenhang mit Transport oder Aufnahme von CO₂ (Bahn & Muhlschlegel, 2006). Folglich gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass CO₂ auf anderen Wegen als passiver Diffusion in Pilzzellen gelangt.

1.3.1. CO₂-Signalübertragung durch cAMP und Adenylylcyclasen

In Säugetieren wurde gezeigt, dass Konzentrationen von CO₂ und HCO₃⁻ von löslichen Adenylylcyclasen erfasst werden, die den Second Messenger zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) synthetisieren und in der Folge zu einer Aktivierung der Proteinkinase A führen (Chen et al, 2000). Dieser Zusammenhang zwischen CO₂/ HCO₃⁻ und cAMP ist in *C. albicans* und *C. neoformans* konserviert (Klengel et al, 2005; Mitchell, 2005) .

In *C. albicans* wurde Cyr1 als lösliche Adenylylcyclase identifiziert, welche hauptsächlich durch HCO₃⁻ aktiviert wird (Klengel et al, 2005). In 5% CO₂ reicht die spontane Umwandlung von CO₂ in HCO₃⁻ aus, um die Adenylylcyclase Cyr1 zu aktivieren. Ansteigende Level von cAMP und Aktivierung von Proteinkinase A (PKA) führen zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Efg1 oder Flo8 (Du et al, 2012; Inglis & Sherlock, 2013). Dadurch reguliert Cyr1 die Gewebeadhäsion, invasives Wachstum aufgrund von Hyphenbildung, den Phänotyp-Wechsel von weiß zu opaque und die Biofilmbildung (Abb. 2) (Hogan & Muhlschlegel, 2011; Rocha et al, 2001; Verstrepen & Klis, 2006). In Luft dagegen ist die Funktion der Adenylylcyclase abhängig von der Carboanhydrase, welche ausreichend hohe Mengen HCO₃⁻ zur Aktivierung der Adenylylcyclase bereitstellen muss (Klengel et al, 2005). Für *C. neoformans* wurde Cac1 als Adenylylcyclase identifiziert, die unter anderem die Virulenzfaktoren Kapselsynthese und Melaninproduktion CO₂-abhängig steuert (Abb. 2) (Alspaugh et al, 2002; Mogensen et al, 2006).

1.3.2. CO₂-Signalübertragung durch Carboanhydrasen

Carboanhydrasen katalysieren die reversible Umwandlung von CO₂ zu HCO₃⁻. Pilze besitzen α - und β -Carboanhydrasen, wobei α -Carboanhydrasen vorwiegend als Monomere, β -Carboanhydrasen dagegen als Oligomere vorkommen (Lehneck & Poggeler, 2014).

Die erste Carboanhydrase in Pilzen, Nce103 in *S. cerevisiae*, wurde als Bestandteil des nichtklassischen Proteinexports (**Non-classical protein export**) entdeckt (Cleves et al, 1996). Erst später erfolgte die Einordnung als Pflanzen-ähnliche β -Carboanhydrase. Nce103 bildet ein Homodimer. Das aktive Zentrum, welches Zink gebunden hat, befindet sich an der Schnittstelle beider Monomereinheiten (Teng et al, 2009). Eine Deletion von *NCE103* ist unter Luft-Bedingungen aufgrund der unzureichenden Bereitstellung von HCO_3^- letal, kann allerdings durch Expression von heterologem *NCE103* komplementiert werden (Gotz et al, 1999). Unter allen Eukaryonten wurde bisher einzig für den filamentösen Ascomyzet *Sordaria macrospora* beschrieben, dass ein Überleben in Luft trotz deletierter Carboanhydrase möglich ist (Lehneck et al, 2014). Das Wachstum von Pilzen in 5% CO_2 dagegen ist bei Deletion der Carboanhydrase unverändert. *NCE103* wird in *S. cerevisiae* auf mRNA-Ebene in Abhängigkeit von CO_2 reguliert (Aguilera et al, 2005a). In Luft kommt es zu einer starken Hochregulation von *NCE103*, was sich *in vivo* in einer 10-20-fach höheren Enzymaktivität in Luft im Vergleich zu 5% CO_2 äußert (Amoroso et al, 2005).

In den beiden *S. cerevisiae* nah verwandten Spezies *C. albicans* und *C. glabrata* wurden Homologe der Carboanhydrase mit vergleichbaren Funktionen identifiziert. Eine Deletion von *C. albicans NCE103* weist vergleichbare CO_2 -abhängige Wachstumsdefekte auf, wie sie für *S. cerevisiae* $\Delta nce103$ bekannt sind (Cottier et al, 2012). Hall *et al.* zeigten jedoch, dass *C. albicans* $\Delta nce103$ in geschlossenen Systemen oder aber innerhalb eines Biofilms auch in Luft überleben kann, da vom Pilz selbst produziertes CO_2 akkumuliert und minimale metabolische Ansprüche erfüllt (Hall et al, 2010). *C. albicans NCE103* wird, wie auch in *S. cerevisiae*, auf transkriptioneller Ebene CO_2 -abhängig reguliert. Darüber hinaus zeigte eine *C. albicans* $\Delta nce103$ Mutante bei Oberflächeninfektionen unter 5% CO_2 die Fähigkeit zur Schädigung und Invasion des Epithels, in Luft dagegen erwartungsgemäß nicht (Klengel et al, 2005). *C. albicans* Wildtyp (WT) wie auch ein mit *NCE103* rekonstituierter Stamm schädigten das Epithelium dagegen CO_2 -unabhängig (Klengel et al, 2005). In systemischen Infektionsmodellen, in denen Erreger den hohen CO_2 -Konzentrationen des Blutes ausgesetzt sind, zeigte sich kein Unterscheid in der Virulenz von *C. albicans* WT und $\Delta nce103/\Delta nce103$. Folglich

scheint *NCE103* in *C. albicans* essentiell für die Pathogenität in spezifischen Nischen zu sein, in denen nicht genügend CO_2 vom Wirt bereitgestellt wird (Klengel et al, 2005).

C. glabrata NCE103, identifiziert durch Sequenz-Abgleich, wird wie in *S. cerevisiae* und *C. albicans* in Luft zur Fixierung von verbliebenem CO_2 stark hochreguliert und ist dadurch essentiell für das Wachstum des Pilzes in Luft (Cottier et al, 2013).

C. neoformans besitzt 2 Gene, die für 2 β -Carboanhydrasen codieren, *CAN1* und *CAN2* (Bahn et al, 2005). *CAN2* wird dabei deutlich stärker exprimiert als *CAN1* und gilt als wesentliche Carboanhydrase in *C. neoformans* (Mogensen et al, 2006). Ebenso wie $\Delta nce103$ ist die Mutante $\Delta can2$ nicht fähig unter Luft-Bedingungen zu wachsen (Bahn et al, 2005). Dies ist möglicherweise auf eine Beeinträchtigung der Fettsäuresynthese durch zu geringe Bikarbonatlevel zurückzuführen (Bahn et al, 2005). Im Gegensatz zu *NCE103* wird die Expression von *CAN2* jedoch nicht CO_2 -abhängig reguliert (Bahn et al, 2005). Die Ausbildung von Virulenzfaktoren wie Stressresistenz, Melaninproduktion oder Kapselsynthese wird durch Deletion von *CAN2* nicht beeinträchtigt. Selbst unter Luft-Bedingungen zeigte sich kein Unterschied in der Virulenz (Bahn et al, 2005). Statt auf eine Virulenz-assoziierte Funktion weist dies vielmehr auf eine metabolische Funktion der Carboanhydrase in *C. neoformans* hin (Bahn et al, 2005).

1.4. Regulation der CO_2 -Signalübertragung

Die Regulation der CO_2 -Signalübertragung ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben des Pilzes. Der cAMP/PKA-Signalweg in Pilzen ist bereits intensiv untersucht worden (Inglis & Sherlock, 2013), die Regulation des zweiten Signalweges über Carboanhydrasen dagegen nicht. Zudem ist der Adenylylcyclase/cAMP/PKA-Weg in Luft abhängig von der Aktivität der Carboanhydrase, welche ausreichend HCO_3^- bereitstellen muss um eine Aktivierung der Adenylylcyclase zu gewährleisten (Klengel et al, 2005). Daher kommt der Regulation der Carboanhydrase eine besondere Bedeutung zu.

In *C. albicans* wurde die Adenylylcyclase Cyr1 als wichtiger CO₂-Sensor identifiziert, welcher die Hyphenbildung unter Hoch-CO₂-Bedingungen induziert (Hall et al, 2010; Klengel et al, 2005). Daher lag die Vermutung nahe, dass auch die CO₂-abhängige Expression der Carboanhydrase über die Adenylylcyclase und dessen Produkt cAMP reguliert wird. Jedoch wurde gezeigt, dass eine *C. albicans* Δ *cyr1/cyr1* Mutante die CO₂-abhängige Regulation von *NCE103* nicht beeinträchtigt (Cottier et al, 2012). Auch eine Zugabe von cAMP zum Medium beeinflusste die hohe *NCE103* Expression des WT in Luft nicht (Cottier et al, 2012). Folglich ist die CO₂-abhängige Regulation der Carboanhydrase in *C. albicans* unabhängig von dem bekannten CO₂-Sensor Cyr1. Vielmehr verweisen diese Experimente auf einen neuen cAMP-unabhängigen Signalweg in Hefen (Cottier et al, 2012). Mithilfe eines Screening-Ansatzes von 158 potentiellen Transkriptionsfaktor-Mutanten wurde *Rca1* als Regulator der Carboanhydrase in *C. albicans* identifiziert (Cottier et al, 2012). Als einzige Mutante führte Δ *rca1* nicht zu der für den WT typischen Luft-induzierten Hochregulation von *NCE103*. Die Reintegration von *RCA1* kompensierte diesen Phänotyp (Cottier et al, 2012). Dies charakterisierte *Rca1* als möglichen transkriptionellen Aktivator der Carboanhydrase *NCE103* in *C. albicans* (Cottier et al, 2012).

C. albicans *RCA1* wurde mit Empfindlichkeit und Resistenz gegenüber Antimykotika in Verbindung gebracht. Eine Deletion von *RCA1* führt zu erhöhter Resistenz gegenüber dem zellwandangreifenden Wirkstoff Caspofungin, möglicherweise aufgrund einer deregulierten Expression von Zellwandgenen (Vandeputte et al, 2012). Verglichen mit dem WT weist Δ *rca1* einen deutlich niedrigeren Ergosterolgehalt der Plasmamembran auf, höchstwahrscheinlich aufgrund der Modulation des cAMP/PKA-Signalweges (Vandeputte et al, 2012). Daher ist die Resistenz von Δ *rca1* gegenüber Fluconazol, welches die Bildung von Ergosterol als Baustein der Zellmembran hemmt, ebenfalls stark erhöht (Vandeputte et al, 2012). Der Einfluss von *RCA1* auf die Hyphenbildung von *C. albicans* ist widersprüchlich. Cottier *et al.* stellten fest, dass Δ *rca1* unfähig zur Filamentierung ist, während Vandeputte *et al.* Hyphenbildung selbst unter Hefe-induzierenden Bedingungen beobachteten (Cottier et al, 2012; Vandeputte et al, 2012).

RCA1 besitzt ein Homolog in *S. cerevisiae*, *CST6*, welches für einen Transkriptionsfaktor mit C-terminalem Leucin-Zipper codiert (Cottier et al, 2012). Cst6 gehört zur Familie der aktivierenden Transkriptionsfaktoren/cAMP response element-bindenden Proteine (ATF/CREB) und nutzt als Bindemotiv die DNA-Sequenz TGACGTCA (Garcia-Gimeno & Struhl, 2000). *CST6* wurde bei Überexpression zunächst mit einer möglichen Funktion in Chromosomenstabilität und DNA-Metabolismus beschrieben (Ouspenski et al, 1999). Zudem weisen mehrere Publikationen auf eine Bedeutung für die Stressregulation hin. So zeigte die Mutante Δ *cst6* im Vergleich zum Referenzstamm bis zu zweifach höhere intrazelluläre Level an Glutathion, einem Peptid, das Zellen vor oxidativem Stress schützt (Suzuki et al, 2011). Jedoch wurde auch gezeigt, dass Δ *cst6* bei Wachstum auf Ethanol hypersensitiv gegenüber oxidativem Stress ist (Liu et al, 2016). Ursache hierfür scheint die Bindung von Cst6 am Promoter von *YAP1* zu sein, einem durch H₂O₂ aktivierbaren Transkriptionsfaktor, der notwendig für die oxidative Stresstoleranz ist (Liu et al, 2016). Wu und Li haben Cst6 als Hitze-induzierbaren Regulator der Hitzeschock-Antwort beschrieben (Wu & Li, 2008).

C. albicans RCA1 besitzt, neben *S. cerevisiae CST6*, ein weiteres Homolog in *C. glabrata*. *C. glabrata RCA1* reguliert die *NCE103* Expression ebenfalls CO₂-abhängig (Cottier et al, 2013). Darüber hinaus scheint *RCA1* auch eine Rolle in der Biofilmbildung zu spielen, indem es das Adhäsion-codierende Gen *EPA6* negativ reguliert (Riera et al, 2012). Eine Deletion von *RCA1* zeigte im Vergleich zum WT eine 3- bis 4-fach höhere Fähigkeit zur Biofilmbildung und eine doppelt so hohe *EPA6* Expression. Diese Regulation erfolgt unabhängig von den bekannten *EPA6*-Regulatoren Yak1/Sir4 und weist damit auf einen neuen, unabhängigen Regulationsmechanismus hin (Riera et al, 2012).

Das Cst6/Rca1-spezifische DNA-Bindemotiv TGACGTCA findet sich in den Promoterregionen von *S. cerevisiae* (285 bp vor ATG) und *C. glabrata NCE103* (236 bp vor ATG), jedoch nicht im *C. albicans* Homolog (Cottier et al, 2013; Cottier et al, 2012). Dies verdeutlicht die enge Verwandtschaft zwischen *S. cerevisiae* und *C. glabrata* sowie die Separierung zu *C. albicans*. Allerdings wurde eine vermehrte Bindung von *C. albicans Rca1* am *NCE103* Promoter sowie in der für *NCE103* codierenden Region bei Kultivierung in Luft nachgewiesen (Cottier et al, 2012). Ein Vergleich der

Proteinsequenzen von Rca1 in *C. albicans*, *S. cerevisiae* und *C. glabrata* zeigte 3 Serinreste (S124, S126 und S222 bezüglich *C. albicans* Rca1), die in ausgeprägten homologen Bereichen aller 3 Proteine zu finden waren. Eine genauere Untersuchung dieser 3 Aminosäuren zeigte, dass Serin an Position 124 kritisch für die Regulation der *NCE103* Expression ist (Cottier et al, 2012). Bei Substitution mit Alanin (A) erfolgte keine Regulation mehr, was sich in gleichartig hoher *NCE103* Expression in Luft und 5% CO₂ äußerte (Cottier et al, 2012).

Die CO₂-abhängige Regulation von *NCE103*, die Letalität von $\Delta nce103$ in Luft sowie die ausgeprägten Homologien hinsichtlich Bindemotiv und möglicher Regulationsstellen in *C. albicans*, *S. cerevisiae* und *C. glabrata* deuten auf eine Konservierung der CO₂-Anpassung und -Regulation in Hefen hin. Dies wurde bisher jedoch nicht nachgewiesen.

1.5. Ziel der Arbeit

Der Arbeit liegt die Hypothese zu Grunde, dass die Regulation der Carboanhydrase *NCE103* durch posttranslationale Modifikation des Transkriptionsfaktors Cst6/Rca1 reguliert wird. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei um die Phosphorylierung eines spezifischen Serinrestes, wodurch es zu einer Änderung der Aktivität von Cst6/Rca1 kommt. Ausgehend davon, dass Cst6/Rca1 ein transkriptioneller Aktivator von *NCE103* ist, bedeutet dies, dass Cst6/Rca1 unter Luft-Bedingungen aktiv ist. Dadurch bindet Cst6 am Promoter und induziert *NCE103* um verbliebenes CO₂ zu fixieren, damit es für metabolische Prozesse zur Verfügung steht (Abb. 3). Unter 5% CO₂ dagegen führt eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors zu dessen Inaktivierung, was in einer geringen, basalen *NCE103* Expression resultiert, da eine zusätzliche CO₂-Fixierung nicht notwendig ist (Abb. 3). Diese Hypothese beinhaltet damit weitere Schlüsselfaktoren für die Regulation der Carboanhydrase: Die Kinase und Phosphatase, welche zur CO₂-abhängigen Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors führen. Da die Substratspezifität von Kinasen im Allgemeinen deutlich über der von Phosphatasen liegt (Cheng et al, 2011), fokussiert sich die vorliegende Arbeit auf die

Identifizierung und Charakterisierung der Cst6/Rca1-spezifischen Kinase, welche durch CO₂-abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors die Expression der Carboanhydrase *NCE103* reguliert.

Die Ziele der Arbeit waren:

- die Identifizierung möglicher Kinasen und Phosphatasen im Modellorganismus *S. cerevisiae*, welche die CO₂-abhängige *NCE103* Regulation beeinflussen
- die Untersuchung der endogenen ScNce103 Proteinlevel in unterschiedlichen CO₂-Konzentrationen im WT sowie bei Deletion der wichtigen Regulationskomponenten ScCST6 und der identifizierten ScCst6-spezifischen Kinase
- der Nachweis der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ScCst6 durch die identifizierte Kinase
- die Aufklärung der für die Aktivität von ScCst6 ausschlaggebenden Phosphorylierungsstelle und der Vergleich mit vorhandenen Ergebnissen in *C. albicans*
- die Identifizierung übergeordneter Regulationskomponenten der Kinase
- die Analyse der Konservierung des Regulationsmechanismus in den *S. cerevisiae* verwandten Hefen *C. albicans* und *C. glabrata*
- die Erstellung eines Modells der CO₂-abhängigen ScNCE103 Regulation durch Cst6/Rca1 anhand der gewonnenen Ergebnisse und der Vergleich mit der initialen Hypothese

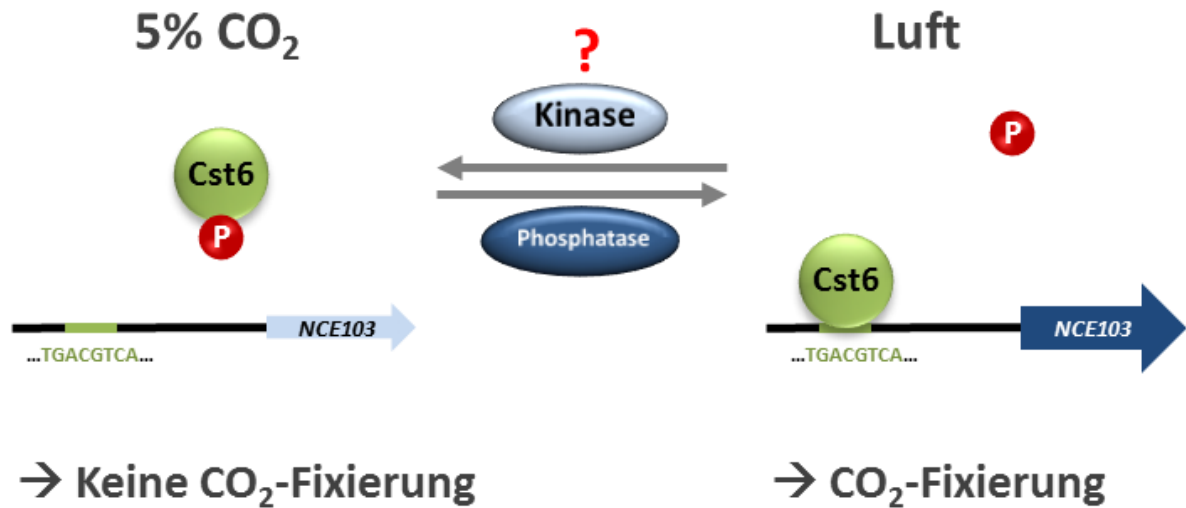


Abb. 3 Hypothesemodell zur CO₂-abhängigen Regulation von *NCE103* in Hefen

In 5% CO₂ scheint der transkriptionelle Aktivator Cst6/Rca1 posttranslational modifiziert zu werden, wahrscheinlich durch Phosphorylierung. Dadurch erfolgt eine Inaktivierung von Cst6/Rca1 und eine Bindung am Promoter der Carboanhydrase *NCE103* bleibt aus. Dies hat eine basale, geringe Expression von *NCE103* zur Folge. In Luft, bei einer geringen CO₂-Konzentration, ist Cst6/Rca1 dephosphoryliert und bindet am ATF/CREB-Motiv im Promoter von *NCE103*, wodurch eine Expression von *NCE103* induziert wird. Reguliert wird die CO₂-abhängige Expression von *NCE103* durch eine Cst6/Rca1-spezifische Kinase und Phosphatase. Beide sind bisher nicht bekannt. Die Identifizierung der Kinase steht aufgrund der angenommenen höheren Substratspezifität im Vordergrund.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Stämme und Plasmide

Tabelle 2: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Name	Deletierter systematischer Genname	Genotyp	Bezugsquelle/ Referenz
S. c. Wildtyp (WT)	-	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0	Euroscarf
WT + CST6-6x His	-	BY4741 + pRS316-promScGAL1-ScCst6-His (URA3 positiv)	diese Arbeit
WT + SCH9-6x His	-	BY4741 + pRS316-promScGAL1-ScSch9-His (URA3 positiv)	diese Arbeit
WT + promNCE103-GFP	-	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0 + pRS316-promScNCE103GFP (URA3 positiv)	diese Arbeit
15 Dau	-	MAT a leu2 ura3 trp1 his2 ade1	P. Van Dijck / (Inagaki et al, 1999)
Δ <i>akl1</i>	YBR059C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YBR059c::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>alk1</i>	YGL021W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YGL021w::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>alk2</i>	YBL009W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YBL009w::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>ark1</i>	YNL020C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YNL020c::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>atg1</i>	YGL180W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YGL180w::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>bck1</i>	YJL095W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YJL095w::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>bub1</i>	YGR188C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YGR188c::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>bud32</i>	YGR262C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YGR262c::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>cdc55</i>	YGL190C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YGL190c::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>chk1</i>	YBR274W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YBR274w::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>cka1</i>	YIL035C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YIL035c::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>cka2</i>	YOR061W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YOR061w::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>cla4</i>	YNL298W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YNL298w::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>cmk1</i>	YFR014C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YFR014c::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>cmk2</i>	YOL016C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YOL016c::kanMX4	Euroscarf
Δ <i>cmp2</i>	YML057W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YML057w::kanMX4	Euroscarf

Name	Deletierter systematischer Genname	Genotyp	Bezugsquelle/ Referenz
<i>Δcna1</i>	YLR433C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YLR433c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δcnb1</i>	YKL190W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YKL190w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δcst6</i>	YIL036W	BY4741, Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YIL036w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δcst6 + promNCE103 -GFP</i>	YIL036W	<i>Δcst6 + pRS316-promScNCE103GFP</i> (URA3 positiv)	diese Arbeit
<i>Δcst6 + CST6</i>	YIL036W	YIL036WΔ + pRS316-promScCST6-ScCST6-His (URA3 positive)	diese Arbeit
<i>Δcst6+ CST6 (S266A)</i>	YIL036W	YIL036WΔ + pRS316-promScCST6-ScCST6 (S266A) (URA3 positive)	diese Arbeit
<i>Δcst6 + CST6 (S266D)</i>	YIL036W	YIL036WΔ + pRS316-promScCST6-ScCST6 (S266D) (URA3 positive)	diese Arbeit
<i>Δctk1</i>	YKL139W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YKL139w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δctk2</i>	YJL006C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YJL006c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δctk3</i>	YML112W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YML112w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δdbf2</i>	YGR092W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YGR092w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δdbf20</i>	YPR111W	BY4742, MAT α, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YPR111w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δdcr2</i>	YLR361C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YLR361c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δdun1</i>	YDL101C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDL101c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δelm1</i>	YKLO48C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YKLO48c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δenv7</i>	YPL236C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YPL236c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δfpk1</i>	YNR047W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YNR047w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δfrk1</i>	YPL141C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YPL141c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δfus3</i>	YBL016W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YBL016w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δgal83</i>	YER027C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YER027c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δgcn2</i>	YDR283C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDR283c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δgin4</i>	YDR507C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDR507c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δgpa2</i>	YER020W	BY4741, Mat a; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0; YER020w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δhal5</i>	YJL165C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YJL165c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δhog1</i>	YLR113W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YLR113w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δhrk1</i>	YOR267C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YOR267c::kanMX4	Euroscarf

Name	Deletierter systematischer Genname	Genotyp	Bezugsquelle/ Referenz
<i>Δhsl1</i>	YKL101W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YKL101w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δime2</i>	YJL106W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YJL106w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δire1</i>	YHR079C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YHR079c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δisr1</i>	YPR106W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YPR106w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δkcc4</i>	YCL024W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YCL024w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δkdx1</i>	YKL161C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YKL161c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δkin1</i>	YDR122W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YDR122w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δkin2</i>	YLR096W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YLR096w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δkin3</i>	YAR018C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YAL018c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δkin4</i>	YOR233W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YOR233w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δkin82</i>	YCR091W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YCR091w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δkkq8</i>	YKL168C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YKL168c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δkns1</i>	YLL019C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YLL019c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δksp1</i>	YHR082C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YHR082c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δkss1</i>	YGR040W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YGR040w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δlcb5</i>	YLR260W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YLR260w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δltp1</i>	YPR073C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YPR073c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δmck1</i>	YNL307C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YNL307c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δmek1</i>	YOR351C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YOR351c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δmih1</i>	YMR036C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YMR036c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δmkk1</i>	YOR231W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YOR231w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δmkk2</i>	YPL140C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YPL140c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δmrk1</i>	YDL079C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YDL079c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δmsg5</i>	YNL053W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YNL053w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δnem1</i>	YHR004C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YHR004c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δnnk1</i>	YKL171W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YKL171w::kanMX4	Euroscarf

Name	Deletierter systematischer Genname	Genotyp	Bezugsquelle/ Referenz
<i>Δnpr1</i>	YNL183C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YNL183c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δoca1</i>	YNL099C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YNL099c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpbs2</i>	YJL128C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YJL128c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpho13</i>	YDL236W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDL236w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpho85</i>	YPL031C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YPL031c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpkh1</i>	YDR490C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDR490c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpkh2</i>	YOL100W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YOL100w::kanMX4	Euroscarf
<i>pkh1^{ts} Δpkh2</i>	YOL100W	15 Dau pkh1::PKH1D398G pkh2::LEU2	P. Van Dijck / (Inagaki et al, 1999)
<i>Δpkh3</i>	YDR466W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDR466w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpkp1</i>	YIL042C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YIL042c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpkp2</i>	YGL059W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YGL059w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δppg1</i>	YNR032W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YNR032w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpph21</i>	YDL134C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDL134c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpph22</i>	YDL188C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDL188c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpph3</i>	YDR075W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDR075w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δppq1</i>	YPL179W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YPL179w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpps1</i>	YBR276C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YBR276c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δppt1</i>	YGR123C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YGR123c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δppz1</i>	YML016C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YML016c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δppz2</i>	YDR436W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDR436w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δprk1</i>	YIL095W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YIL095w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δprr1</i>	YKL116C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YKL116c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δprr2</i>	YDL214C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDL214c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpsk1</i>	YAL017W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YAL017w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpsk2</i>	YOL045W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YOL045w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δpsr1</i>	YLL010C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YLL010c::kanMX4	Euroscarf

Name	Deletierter systematischer Genname	Genotyp	Bezugsquelle/ Referenz
<i>Δpsr2</i>	YLR019W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YLR019w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptc1</i>	YDL006W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YDL006w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptc2</i>	YER089C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YER089c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptc3</i>	YBL056W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YBL056w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptc4</i>	YBR125C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YBR125c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptc5</i>	YOR090C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YOR090c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptc6</i>	YCR079W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YCR079w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptc7</i>	YHR076W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YHR076w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptk1</i>	YKL198C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YKL198c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptk2</i>	YJR059W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YJR059w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptp1</i>	YDL230W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YDL230w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptp2</i>	YOR208W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YOR208w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δptp3</i>	YER075C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YER075c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δrck1</i>	YGL158W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YGL158w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δrck2</i>	YLR248W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YLR248w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δrim11</i>	YMR139W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YMR139w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δrim15</i>	YFL033C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YFL033c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δrtk1</i>	YDL025C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YDL025c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δrtr1</i>	YER139C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YER139c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δrts1</i>	YOR014W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YOR014w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δsak1</i>	YER129W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YER129w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δsap155</i>	YFR040W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YFR040w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δsap185</i>	YJL098W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YJL098w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δsap4</i>	YGL229C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YGL229c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δsat4</i>	YCR008W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YCR008w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δsch9</i>	YHR205W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0,; met15Δ0; ura3Δ0; YHR205w::kanMX4	Euroscarf

Name	Deletierter systematischer Genname	Genotyp	Bezugsquelle/ Referenz
$\Delta sch9 + CST6-6x His$	YHR205W	$\Delta sch9 + pRS316-promScGAL1-ScCst6-His$ (URA3 positiv)	diese Arbeit
$\Delta sch9 + promNCE103-GFP$	YHR205W	$\Delta sch9 + pRS316-promScNCE103GFP$ (URA3 positiv)	diese Arbeit
$\Delta sch9 + SCH9$	YHR205W	YHR205W $\Delta + pRS416-promScSCH9-ScSCH9-3HA$ (URA3 positive)	diese Arbeit
$\Delta sch9 + SCH9 (T570A)$	YHR205W	YHR205W $\Delta + pRS416-promScSCH9-ScSCH9-3HA$ (T570A) (URA3 positive)	diese Arbeit
$\Delta sch9 + SCH9 (6A)$	YHR205W	YHR205W $\Delta + pRS416-promScSCH9-ScSCH9-3HA$ (S711A, T723A, S726A, T737A, S758A, S765A) (URA3 positive)	diese Arbeit
$\Delta sch9 + SCH9 (T570A, 6A)$	YHR205W	YHR205W $\Delta + pRS416-promScSCH9-ScSCH9-3HA$ (T570A, S711A, T723A, S726A, T737A, S758A, S765A) (URA3 positive)	diese Arbeit
$\Delta sdp1$	YIL113W	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YIL113w::kanMX4	Euroscarf
$\Delta sip1$	YDR422C	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR422c::kanMX4	Euroscarf
$\Delta sip2$	YGL208W	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YGL208w::kanMX4	Euroscarf
$\Delta siw14$	YNL032W	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YNL032w::kanMX4	Euroscarf
$\Delta skm1$	YOL113W	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YOL113w::kanMX4	Euroscarf
$\Delta sks1$	YPL026C	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPL026c::kanMX4	Euroscarf
$\Delta sky1$	YMR216C	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YMR216c::kanMX4	Euroscarf
$\Delta slt2$	YHR030C	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YHR030c::kanMX4	Euroscarf
$\Delta smk1$	YPR054W	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPR054w::kanMX4	Euroscarf
$\Delta snf1$	YDR477W	BY4742, MAT α , his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDR477w::kanMX4	Euroscarf
$\Delta snf4$	YGL115W	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YGL115w::kanMX4	Euroscarf
$\Delta spo7$	YAL009W	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YAL009w::kanMX4	Euroscarf
$\Delta ssk2$	YNR031C	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YNR031c::kanMX4	Euroscarf
$\Delta ssk22$	YCR073C	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YCR073c::kanMX4	Euroscarf
$\Delta ssn3$	YPL042C	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YPL042c::kanMX4	Euroscarf
$\Delta ste11$	YLR362W	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR362w::kanMX4	Euroscarf
$\Delta ste20$	YHL007C	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YHL007c::kanMX4	Euroscarf
$\Delta ste7$	YDL159W	BY4741, MAT a, his3 Δ 1; leu2 Δ 0,; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YDL159w::kanMX4	Euroscarf

Name	Deletierter systematischer Genname	Genotyp	Bezugsquelle/ Referenz
<i>Δswe1</i>	YJL187C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YJL187c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δtda1</i>	YMR291W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YMR291w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δtel1</i>	YBL088C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YBL088c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δtor1</i>	YJR066W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YJR066w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δtos3</i>	YGL179C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YGL179c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δtpd3</i>	YAL016W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YAL016w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δtpk1</i>	YJL164C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YJL164c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δtpk2</i>	YPL203W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YPL203w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δtpk3</i>	YKL166C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YKL166c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δvhs1</i>	YDR247W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YDR247w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δyak1</i>	YJL141C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YJL141c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δych1</i>	YGR203W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YGR203w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δyck1</i>	YHR135C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YHR135c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δyck2</i>	YNL154C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YNL154c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δyck3</i>	YER123W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YER123w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δygg3</i>	YOL128C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YOL128c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δypk1</i>	YKL126W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YKL126w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δypk2</i>	YMR104C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YMR104c::kanMX4	Euroscarf
<i>Δypk3</i>	YBR028C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YBR028c::kanMX4	Euroscarf
<i>ΔYPL150W</i>	YPL150W	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YPL150w::kanMX4	Euroscarf
<i>Δyvh1</i>	YIRO26C	BY4741, MAT a, his3Δ1; leu2Δ0;; met15Δ0; ura3Δ0; YIRO26c::kanMX4	Euroscarf

Tabelle 3: Verwendete *C. glabrata*-Stämme

Name	Deletion	Genotyp	Bezugsquelle / Referenz
<i>C. g.</i> WT	-	ATCC 2001	F. Mühlischlegel / (Kitada et al, 1995)
AFG1	LIG4	lig4::HIS1, trp1Δ isolate A	P. van Dijck / (Cen et al, 2015)
<i>Δrca1</i>	RCA1	ATCC 2001, rca1Δ::TRP1, trp1, Δ ura3	F. Mühlischlegel / (Cottier et al, 2013)
<i>Δsch9</i>	LIG4, SCH9	lig4::HIS1, trp1Δ, sch9::NAT1	diese Arbeit

Tabelle 4: Verwendete *C. albicans*-Stämme

Name	Deletion	Genotyp	Bezugsquelle / Referenz
<i>C. a.</i> WT	-	SC5314	B. Hube / (Gillum et al, 1984)
<i>rca1ΔY</i>	<i>RCA1</i>	<i>leu2Δ/leu2Δ, his1Δ/his1Δ, arg4Δ/arg4Δ, URA3/ura3Δ::imm434, IRO1/iro1Δ::imm434, rca1::LEU2/rca1::His1 clone Y</i>	B. Hube / (Homann et al, 2009)
<i>sch9Δ</i>	<i>SCH9</i>	CAI4, <i>sch9Δ</i>	J. Ernst / (Stichternoth et al, 2011)

Tabelle 5: Verwendete *E. coli*-Stämme und Plasmide

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle / Referenz
BL21DE3	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS, λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs
C2523H	<i>fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England Biolabs
Rosetta	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cam^R)</i>	Novagen, Merck Millipore
Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle / Referenz
p41-ScNCE103-6x His	Zur rekombinanten Expression und Aufreinigung von ScNce103-6x His in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
p41-ScSCH9-6x His	Zur rekombinanten Expression von ScSch9-6x His in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
p41-ScCST6-6x His	Zur rekombinanten Expression und Aufreinigung von ScCst6-6x His in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pRS316-promScGAL1-ScCST6-His	Zur Überexpression von ScCST6 in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pRS316-promScGAL1-ScSch9-His	Zur Überexpression von ScSCH9 in <i>S. cerevisiae</i>	diese Arbeit
pRS316-pScNCE103+GFP	GFP unter Kontrolle des ScNCE103-Promoters	diese Arbeit
pRS316-promScCST6-ScCST6-His	Integration von ScCST6 in <i>Δcst6</i>	diese Arbeit
pRS316-promScCST6-ScCST6-His (S266A)	Integration von ScCST6 (S266A) in <i>Δcst6</i>	diese Arbeit
pRS316-promScCST6-ScCST6-His (S266D)	Integration von ScCST6 (S266D) in <i>Δcst6</i>	diese Arbeit
pBluescript	Zur Konstruktion der NAT1-Deletionskassette	Agilent Technologies
pMA-T-ScNce103-His	Sequenz für ScNCE103-6x His	GeneArt, Thermo Fisher Scientific
pMK-RQ-ScCst6-His	Sequenz für ScCST6-6x His	GeneArt, Thermo Fisher Scientific
pMK-RQ-ScSch9-His	Sequenz für ScSCH9-6x His	GeneArt, Thermo Fisher Scientific
pRS416-SCH9-6HA	Integration von ScSCH9 in <i>Δsch9</i>	R. Loewith / (Urban et al, 2007)

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle / Referenz
pRS416-SCH9 (T570A)-6HA	Integration von ScSCH9 (T570A) in $\Delta sch9$	R. Loewith / (Urban et al, 2007)
pRS416-SCH9 (S711A, T723A, S726A, T737A, S758A, S765A)-6HA	Integration von ScSCH9 (6A) in $\Delta sch9$	diese Arbeit
pRS416-SCH9 (T570A, S711A, T723A, S726A, T737A, S758A, S765A)-6HA	Integration von ScSCH9 (T570A, 6A) in $\Delta sch9$	R. Loewith / (Urban et al, 2007)

2.2. Kultivierung von Hefen zur Bestimmung der Genexpression unter verschiedenen CO₂-Bedingungen

Die Hefekulturen (*S. cerevisiae*, *C. glabrata* oder *C. albicans*) wurden frisch aus einer Kryokultur in YPD Medium (1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose in H₂O) angeimpft und über Nacht bei 5% CO₂ geschüttelt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C um die Bedingungen im menschlichen Körper nachzuahmen. Je 2 Kolben pro zu bestimmendem Zeitpunkt mit 10 ml YPD wurden vorbereitet und ebenfalls bei 37 °C und 5% CO₂ über Nacht vorinkubiert. Um den Einfluss von Rapamycin auf die ScNCE103 Expression zu untersuchen, wurde dem YPD-Medium der beiden aus der Übernachtskultur anzuimpfenden Kolben 200 nM Rapamycin (1 mM Stocklösung in DMSO (Carl Roth)) zugesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde das gleiche Volumen DMSO verwendet. Möglichst schnell wurden die vorbereiteten Kolben mit jeweils 500 µl der Übernachtskultur angeimpft und weitere 30 min bei 5% CO₂ geschüttelt. Während je eine Kultur für eine bestimmte Zeit (10 bis 180 min) bei 5% CO₂ verblieb, wurde die zweite Kultur zeitgleich unter Luft-Bedingungen (0,04% CO₂) inkubiert, um die ScNCE103 Expression zu induzieren. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, 5 min) geerntet. Im Anschluss erfolgten die RNA-Isolation und die Messung der Genexpression mittels quantitativer RealTime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) (2.3.1). Zur besseren Vergleichbarkeit der Genexpression wurde bei Untersuchung der *S. cerevisiae* Mutantenbibliothek der *S. cerevisiae* WT als Kontrolle immer mitgeführt (Abb. 4). Zudem wurden nicht mehr als 5 Deletionsmutanten gleichzeitig untersucht, um die Zeit während der RNA-Isolation möglichst gering zu halten.

Zur Bestimmung der *ScNCE103* Expression der Stämme 15 Dau und *pkh1^{ts} Δpkh2* wurde das Protokoll leicht abgewandelt. Die Stämme wurden zunächst über Nacht bei 30°C statt 37°C inkubiert, um ein Wachstum der temperatursensitiven Doppelmutante zu ermöglichen. Auch hier wurde *S. cerevisiae* WT als Kontrolle mitgeführt. Erst anschließend wurden die Stämme zu 37°C gebracht und überimpft. Beide Stämme wurden für weitere 4 h bei 37°C und 5% CO₂ geschüttelt, um eine möglichst vollständige Inaktivierung von Pkh1 aufgrund der erhöhten Temperatur zu erreichen. Nach dem Umsetzen der Kulturen in Luft für 60 min, erfolgte die RNA-Isolation und Bestimmung der *ScNCE103* Expression in 5% CO₂ und Luft.

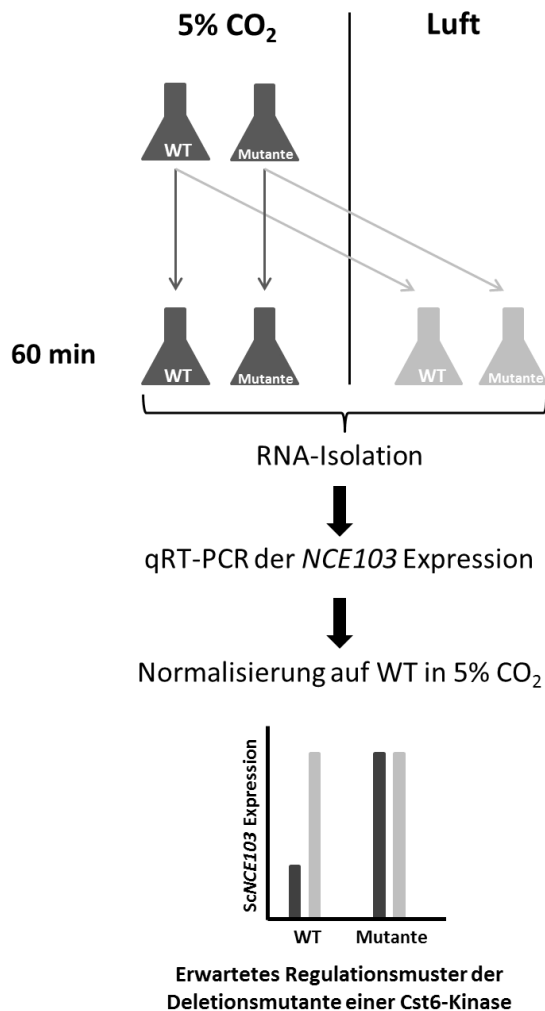


Abb. 4 Arbeitsablauf der Untersuchung der Mutantenbibliothek zur Identifizierung der Cst6-Kinase

S. cerevisiae WT und Deletionsmutanten wurden in 5% CO₂ bis zur exponentiellen Phase kultiviert. Entweder verblieben die Kulturen anschließend für 60 min bei 5% CO₂ oder sie wurden zu Luft umgesetzt. Anschließend wurde die RNA extrahiert, die *ScNCE103* Expression mittels qRT-PCR bestimmt und auf den WT in 5% CO₂ normalisiert. Mögliche Cst6-Kinase-Deletionsmutanten wurden anhand erhöhter *ScNCE103* Expression in 5% CO₂ im Vergleich zum WT identifiziert.

2.3. Nukleinsäuremethoden

2.3.1. RNA-Isolation und qRT-PCR

Die Zellpellets wurden zunächst in 440 μ l AE-Puffer (50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA) + 10% SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) aufgenommen. Anschließend wurde die gleiche Menge Phenol-Chloroform (pH 4,5) zugegeben, kurz geschüttelt und die Proben bei 65 °C für 5 min erhitzt. Nachdem die Proben mindestens 10 min bei -20 °C abgekühlt wurden, wurden diese 20 min bei 16000 g zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erhalten. Die obere, wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 50 μ l Natriumazid und 500 μ l Isopropanol sowie anschließender Inkubation bei 4 °C für 30 min wurde die RNA gefällt. Danach wurden die Proben für 10 min bei 12000 g zentrifugiert und das RNA-Pellet 2x 5 min mit 70%igem Ethanol durch erneutes Zentrifugieren gewaschen. Die RNA wurde an der Luft getrocknet und anschließend in RNase-freiem Wasser gelöst. Die Menge extrahierter RNA wurde mithilfe des NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. 100 ng/ μ l RNA wurden für die qRT-PCR eingesetzt. Hierfür wurde das Brilliant III Ultra Fast SYBR Green qRT PCR Kit mit einem Stratagene Mx3005P (beides Agilent Technologies) verwendet. Die relative Genexpression wurde mit der $\Delta\Delta$ Ct Methode, je nach Stamm bezogen auf *ScACT1*, *CgACT1* bzw. *CaACT1* als nicht-reguliertes Gen, bestimmt (Pfaffl, 2001). Die *ScNCE103* Expression der Mutanten in beiden getesteten Bedingungen wurden zudem auf die des mitgeführten WT oder Kontrollstamms unter 5% CO₂ normalisiert (Abb. 4). Verwendete Primer sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Primer für qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz
ScNCE103 fwd	GATATTGACACCATGTACCATGA
ScNCE103 rev	TGTAAGTGCTAACTGTTTGCA
ScCST6 fwd	AAAGCATGACTGTGGATTCA
ScCST6 rev	TGGGTAATGATTGGTTGTCT
ScACT1 fwd	TTCCCAGGTATTGCCGA
ScACT1 rev	TGTGGTGAACGATAGATGGA
CgNCE103 fwd	CATGAATCTGAGCTGAACCA
CgNCE103 rev	TGATTGCCATAGACCTCTCTTA
CgACT1 fwd	ATCATTGCTCCACCAGAGA
CgACT1 rev	TGTGGTGAACAATGGATGG
CaNCE103 fwd	TCCAGTTAGACATATTCGTGCTG
CaNCE103 rev	TGAGGGTTATATTCTTCTTCATCATG
CaACT1 fwd	TCAGACCAGCTGATTTAGGTTTG
CaACT1 rev	GTGAACAATGGATGGACCAG

2.3.2. Überexpression von ScNCE103, ScCST6 und ScSCH9 in *Escherichia coli*

Die Gene *ScNCE103*, *ScCST6* und *ScSCH9* wurden von der Firma GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific) synthetisiert, versehen mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag (6x His) (Tabelle 5). Zudem wurde im Falle von *ScSCH9* die DNA-Sequenz so modifiziert, dass eine natürliche Schnittstelle für *NdeI* ohne Veränderung der Aminosäuresequenz eliminiert wurde. Mithilfe der Restriktionsenzyme *NdeI/HindIII* (New England Biolabs) wurden die Protein-codierenden Sequenzen ausgeschnitten und in den Expressionsvektor p41 kloniert (Primer aufgelistet in Tabelle 7). Dieser ist für rekombinante Proteinexpression in *E. coli* mithilfe des lac-Operons optimiert. Für die Expression von *ScNCE103*-His und *ScSCH9*-His wurde der *E. coli* Stamm BL21DE3 (New England Biolabs) transformiert (Tabelle 5). Positive Klone wurden gepickt und in LB Medium (10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton) mit 50 µg/ml Ampicillin bei 37°C kultiviert. Die Expression von *ScNCE103* wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,2 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und erfolgte anschließend über Nacht bei 37 °C. Die Expression von *ScSCH9* wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,8 induziert und die Kulturen für 4 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Für die Expression von *ScCST6* wurde der *E. coli* Stamm Rosetta genutzt (Tabelle 5). Die Zellen wurden in LB Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol bei 37°C kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 0,4 erreicht war. Die Expression wurde mit

1 mM IPTG induziert und die Kulturen 4 h bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden geerntet und mittels Western Blot (2.4.2.) auf eine Überexpression 6x His-markierter Proteine untersucht.

Tabelle 7: Verwendete PCR-Primer für Überexpression in *E. coli*

Bezeichnung	Sequenz
fw ScNce103 Exp p41 Vspl	GCGCAAATTAATATGAGCGCTACCGAATC
rv ScNce103 Exp p41	GGTCAAGCTTATCAATGATGGTGATGATGGTGTGTTTTGGGGTAACTTTTGTGTAAG
rv ScCst6 Exp p41	GGTCAAGCTTATCAATGATGGTGATGATGGTGTGTTTTATCTTTTCAGAATTGGGTAATG
fw ScCst6 Exp p41	GCGCAACATATGTTTACTGGTCAGGAGTATCATTC
p41-SCH9-fwd	AAGACAGAGCGAAATTCTATATCG
p41-SCH9-rev	AGTTTGTTCCGGCCGGATCCGT

2.3.3. Überexpression von Genen in *S. cerevisiae* mithilfe des *GAL1* Promoters

ScCST6-His und ScSCH9-His wurden vom Expressionsvektor p41 mittels spezifischer Primer, die 5' *PacI*- und 3' *Ascl*-Schnittstellen integrieren, amplifiziert (Primer siehe Tabelle 8). Mithilfe dieser Restriktionsenzyme (New England Biolabs) wurden die Sequenzen in das Plasmid pRS316, welches *URA3* als Selektionsmarker enthält, kloniert. Eine Überexpression wurde durch Integration des Sc*GAL1* Promoters mithilfe von *SacI/PacI* (New England Biolabs) erreicht. Der *S. cerevisiae* WT BY4741 bzw. die Mutante $\Delta sch9$ wurden mit den Plasmiden pRS316-promSc*GAL1*-ScCST6-His bzw. pRS316-promSc*GAL1*-ScSCH9-His mithilfe der Lithiumacetat (LiAc)-Methode transformiert (Gietz et al, 1992). Hierfür wurden die Zellen in der lag-Phase geerntet, gewaschen und in 1x TE Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) mit 100 mM LiAc resuspendiert. 100 μ l Zellaliquots wurden mit Hitze-denaturierter Lachssperma-DNA und dem entsprechenden Plasmid versetzt. Anschließend wurde den Zellen 600 μ l 50% PEG3640 in 1x TE Puffer und 100 mM LiAc zugegeben und 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 70 μ l DMSO erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 min, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation auf Eis. Die Zellen wurden abzentrifugiert, gewaschen und in Minimalmedium (20 g/l Glukose, 6,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basismedium ohne Aminosäuren, pH 5,5), welchem je 2 μ l/ml Histidin (H), Methionin (M) und Leucin (L) einer 0,5 g/50 ml Stocklösung zugesetzt wurde, resuspendiert. Die Transformationsansätze wurden zur Selektion Uracil-positiver Klone auf Minimalmedium + H, M, L

ausplattiert und 2-3 Tage bei 30 °C kultiviert. Einzelkolonien wurden gepickt und erneut über Nacht bei 30 °C in Minimalmedium + H, M, L geschüttelt. Anschließend wurden die Kulturen abzentrifugiert und in YEP Medium (1% Hefeextrakt, 2% Pepton) + 2% Raffinose resuspendiert. Nach erneuter Kultivierung über Nacht bei 30 °C wurde die Überexpression von ScCST6 bzw. ScSCH9 durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Nach 6 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und hinsichtlich der Überexpression auf Proteinebene untersucht.

Tabelle 8: Verwendete PCR-Primer für Überexpression in *S. cerevisiae* mithilfe des *GAL1* Promoters

Bezeichnung	Sequenz
5'-ScGAL1prom-Sac1	ATGCGAGCTCTTATATTGAATTTTCAAAAATTCTTACTTTTTTTTTGGAT
3'-ScGAL1prom-Pac1	ACATTTAATTAATATAGTTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAG
fw ScCst6 in pRS316	TAACATTAATTAATGTTTACTGGTCAGGAGTATC
rv ScCst6 in pRS316	GAAGTGGCGCGCCTTATTTTATCTTTTCAGAATTGGGTAATG
pRS316 SCH9-Pac1 fwd	TATATTAATTAACATATGATGAATTTTTTACATCAAATCGTC
pRS316 SCH9-Asc1 rev	AAGTGGCGCGCCAAGCTTATTATCAATG

2.3.4. Expression von Genen in *S. cerevisiae* Δ cst6 und Δ sch9

Um ScCST6 in *S. cerevisiae* Δ cst6 zu reintegrieren, wurde das Plasmid pRS316 genutzt. Der zur Überexpression verwendete *GAL1*-Promoter wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *SacI/PacI* (New England Biolabs) durch den nativen Promoter für ScCST6, welcher von genomischer DNA amplifiziert wurde, ersetzt. Die Sequenzen für ScCST6^{S266A} und ScCST6^{S266D} wurden von GeneTex Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific) bezogen und mithilfe der Restriktionsenzyme *PacI/AscI* (New England Biolabs) anstelle von WT ScCST6 in das Plasmid integriert. Anschließend erfolgte die Transformation von *S. cerevisiae* Δ cst6 nach der LiAc-Methode (2.3.3.). Uracil-positive Klone wurden gepickt und durch Kolonie-PCR mithilfe von Primern, die spezifisch für das integrierte Plasmid waren (Tabelle 9), auf die Integration von *CST6* untersucht.

Für die Expression von ScSCH9 unter Kontrolle des nativen ScSCH9-Promoters in *S. cerevisiae* Δ sch9 wurde das Plasmid pRS416 verwendet, welches von Prof. Robbie Loewith zur Verfügung gestellt wurde (Urban et al, 2007). Dadurch entfiel ein Umklonieren bisher verwendeter Plasmide. Die Transformation von *S. cerevisiae* Δ sch9 erfolgte mithilfe der LiAc-Methode (2.3.3.). Uracil-positive

Klone wurden gepickt und durch Kolonie-PCR mit *SCH9*-spezifischen Primern auf die Integration von *ScSCH9* untersucht (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verwendete PCR-Primer für Genexpression in *S. cerevisiae*

Bezeichnung	Sequenz
5'pRS316-veri	CATTCGCCATTCAGGCTGCG
3'pRS316-veri	TCGAGGTCGACGGTATCGAT
5'SCH9 T570 sequ	ACATTCTACTCGATGCC
3'SCH9 6A sequ	ATCTGCGAATGGCTGTTG

2.3.5. Spezifische Mutagenese von *S. cerevisiae SCH9*

Zur spezifischen Mutagenese von *S. cerevisiae SCH9* wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) verwendet. Ausgehend vom Plasmid pRS416-SCH9 (T570A, S711A, T723A, S726A, T737A, S758A, S765A)-6HA (Urban et al, 2007) wurde das Plasmid pRS416-SCH9 (S711A, T723A, S726A, T737A, S758A, S765A)-6HA generiert, indem die Mutation T570A durch erneute Mutation rückgängig gemacht wurde. Hierfür wurden spezifische Primer genutzt, welche in der Mitte die veränderten Basen trugen (Tabelle 10). Anschließend wurde das Ausgangsplasmid durch PCR mithilfe der Primer vervielfältigt und so die gewünschte Mutation eingebaut. Die parentale DNA, welche die Mutation nicht trägt, wurde mit *DpnI* (Agilent Technologies) verdaut. Anschließend erfolgte die Transformation des mutierten Plasmids in kompetente *E. coli* Zellen. Durch Sequenzierung wurde das Vorhandensein der gewünschten Mutation überprüft. Plasmide mit korrekter Sequenz wurden zur Transformation von *S. cerevisiae Δsch9* genutzt. Um sicher zu gehen, dass *SCH9* bzw. mutiertes *SCH9* integriert wurde, wurde eine Kolonie-PCR mit *SCH9*-spezifischen Primern durchgeführt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Verwendete Primer für spezifische Mutagenese

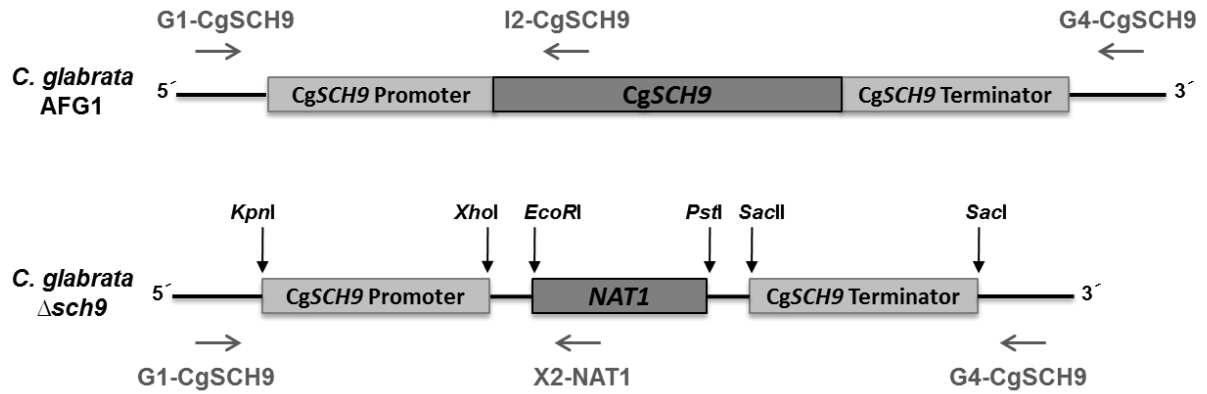
Bezeichnung	Sequenz
5'SCH9 A570T	CTTGAAGGATAGAACAACACATTTTGCGGCACCACGG
3'SCH9 A570T	CCGTGGTGCCGAAAATGTGTTTGTCTATCCTTCAAG
5'SCH9 T570 sequ	ACATTCTACTCGATGCC
3'SCH9 6A sequ	ATCTGCGAATGGCTGTTG

2.3.6. Herstellung einer *C. glabrata* Δ *SCH9*-Mutante

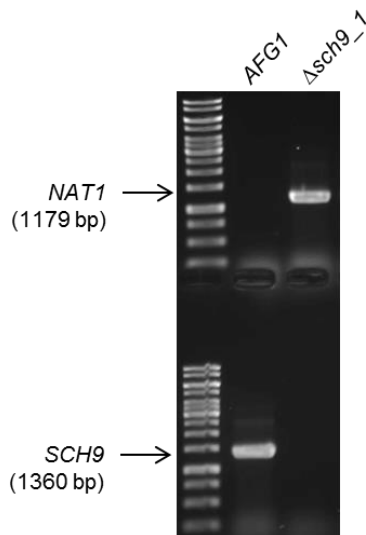
Die Deletion von *CgSCH9* erfolgte durch Ersetzen des offenen Leserahmens (ORF) mit einer *NAT1*-Kassette, welche eine Resistenz gegen Nourseotricin vermittelt. Hierfür wurde *NAT1* durch PCR mit spezifischen Primern (Tabelle 11) amplifiziert, sodass eine 5' *EcoRI*- und 3' *PstI*- Schnittstelle entstanden, welche für die Klonierung des Gens in ein pBluescript-Plasmid (Agilent Technologies) genutzt wurden. Eine homologe Region mit einer Länge von 1000 bp, die dem *CgSCH9*-ORF vorgeschaltet war und den *CgSCH9* Promoter beinhaltet, wurde mittels Kolonie-PCR mit den Schnittstellen 5' *KpnI* und 3' *XhoI* amplifiziert und in pBluescript kloniert. Genauso wurde für die Klonierung einer 1000 bp langen, dem *CgSCH9*-ORF nachgeschalteten Homologieregion verfahren, welche für den *CgSCH9* Terminator codierte. Hierfür wurden die Schnittstellen 5' *SacII* und 3' *SacI* verwendet (Abb. 5A). Das gesamte Konstrukt, die *NAT1*-Kassette flankiert von homologen Regionen, wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI/SacI* (New England Biolabs) ausgeschnitten und aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Für die Transformation wurde mit *C. glabrata* AFG1 (Cen et al, 2015) ein Stamm mit Deletion von *CgLIG4* genutzt, da dieser eine erhöhte Effizienz zur homologen Rekombination besitzt (Tabelle 3). Die Transformation wurde mittels LiAc-Methode durchgeführt (beschrieben in Abschnitt 2.3.3.), allerdings leicht abgewandelt für *C. glabrata*: Je Transformation wurden 50 μ l Zellaliquots verwendet und zunächst mit Hitze-denaturierter Lachssperma-DNA und 240 μ l 50% PEG3640 in 1x TE Puffer und 100 mM LiAc inkubiert. Erst nach kurzer Inkubation (3-4 min bei RT) wurde das *NAT1*-Konstrukt zum Transformationsansatz gegeben und 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden 45 μ l DMSO hinzugefügt und der Ansatz einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellen wurden zentrifugiert, in YPD Medium resuspendiert und erneut 2 h bei 30 °C inkubiert. Erst dann erfolgte das Ausplattieren der Zellen auf YPD mit 100 μ g/ml Nourseothricin. Nourseothricin-resistente Kolonien wurden gepickt und der korrekte Einbau von *NAT1* wurde mit Kolonie-PCR und spezifischen Primern (Tabelle 11) für *NAT1* bzw. *CgSCH9* überprüft (Abb. 5B). Die Deletion von *SCH9* wurde durch genomische PCR unter Nutzung externer Primer (Tabelle 11), welche außerhalb des ersetzten *CgSCH9*-ORF binden, validiert. Hierbei ergab sich im

Falle eines Einbaus von *NAT1* anstelle von *CgSCH9* eine Bandenverschiebung um ~900 bp von 4385 auf 3463 bp (Abb. 5C).

A



B



C

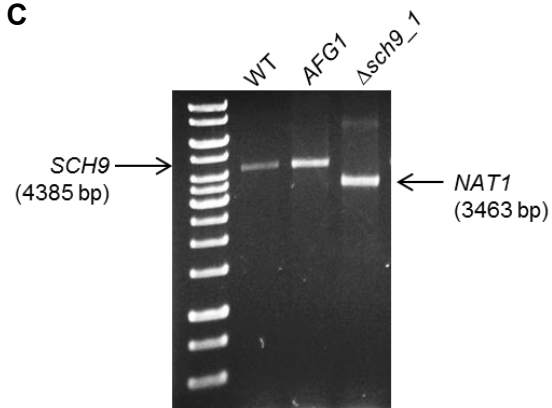


Abb. 5 Deletion von *C. glabrata* *SCH9*

(A) Dargestellt ist die Klonierungsstrategie zur Herstellung einer *Δsch9* Mutante im *C. glabrata* AFG1-Stammhintergrund. Der *CgSCH9*-ORF wurde durch *NAT1* ersetzt, welches eine Nourseotricin-Resistenz vermittelt und als Selektionsmarker diente. Zudem ist die Lage der zur Kontrolle eingesetzten Primer angegeben.

(B) Der untransformierte Kontrollstamm AFG1 sowie *Δsch9* wurden mittels Kolonie-PCR auf die Insertion von *NAT1* und Deletion von *SCH9* überprüft. Für die Amplifizierung von *NAT1* wurden die Primer G1-*CgSCH9* und X2-*NAT1* genutzt, für *CgSCH9* G1-*CgSCH9* und I2-*CgSCH9*. AFG1 zeigte ein PCR-Produkt für *SCH9*, aber nicht für *NAT1*. Die *Δsch9* Mutante dagegen wies eine Bande für *NAT1* auf, jedoch nicht für *SCH9*.

(C) Zur Verifizierung der korrekten Position der *NAT1*-Insertion, wurde eine PCR mit externen Primern (G1-*CgSCH9* und G4-*CgSCH9*) durchgeführt. Ist der *SCH9* ORF vorhanden, wie im Kontrollstamm AFG1, dann entstand ein PCR-Produkt mit einer Größe von 4385 bp. Wurde *SCH9* dagegen mit *NAT1* ersetzt, so kam es zu einer Verschiebung der Bande auf 3463 bp. Als Größenmarker in Spur 1 wurde jeweils GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) genutzt.

Tabelle 11: Verwendete PCR-Primer für die *SCH9* Deletion in *C. glabrata*

Bezeichnung	Sequenz
5' NAT1-EcoR1	TATCGAATCCATAGCTTCAAATGTTTCT
3' NAT1-Pst1	CGGGCTGCAGGCAAATTAAGCC
5' CgSCH9prom-Kpn1	TAAGGGTACCAAAAGTTGGAACCTGTAG
3' CgSCH9prom-Xho1	TATACTCGAGATAAATGTTTATTGAAGTGTGAAC
5' CgSCH9term-Sac2	TGATCCGCGGATTTGTCTTTCATTTTGGTT
3' CgSCH9term-Sac1	AGCAGAGCTCAAGGTGTTACTAATTCCATATTT
G1-CgSCH9	AAGAACTGTTATTGTATATGTTGTCCCTT
G4-CgSCH9	CTGCATCTAGACGGAGTTTGACTCTT
I2-CgSCH9	TATAGCGGGCTTATCATTAACACCAATA
X2-NAT1	CTGTGCTTGGGTGTTTTGAAGTGGTAC

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Zellaufschluss in *S. cerevisiae* und *E. coli*

S. cerevisiae Kulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und in Lysepuffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM DTT, 10% Glycerol, frisch dazu: Protease-Inhibitor EDTA-frei + PhosStop + 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) resuspendiert und durch 5x 1 min Vortexen mithilfe von Glasperlen (Durchmesser: 425-600 µm) lysiert. Dazwischen erfolgte eine einminütige Inkubation auf Eis um Überhitzung zu vermeiden. Mit einer Nadel wurde der Boden des Reaktionsgefäßes durchstoßen und das Lysat vorsichtig in ein neues Gefäß zentrifugiert (3000 g, 3 min). Die Lysate wurden durch erneute Zentrifugation geklärt (16000 g, 10 min, 4°C).

E. coli Kulturen wurden ebenfalls durch Zentrifugation geerntet, in kaltem PBS + 2 mM PMSF resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Zellpellets im Wasserbad wieder aufgetaut. Durch mehrfache Wiederholung dieses Frier-Tau-Zyklus erfolgte der Zellaufschluss und durch anschließende Zentrifugation (16000 g, 10 min, 4 °C) wurde das Lysat von Zelltrümmern geklärt. Die geklärten Lysate wurden für Western Blot-Analysen (2.4.2.) oder zur Proteinaufreinigung (2.4.3.) genutzt.

2.4.2. Western Blot

Für den Western Blot wurden entweder Zelllysate, deren Gesamtproteinmenge mit dem Bicinchoninsäure (BCA) -Assay (BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific) bestimmt wurde, oder ganze Zellen, wie teilweise bei *E. coli*, verwendet. Sowohl Lysate als auch Zellpellets wurden mit SDS-Ladepuffer (Carl Roth) versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben mittels Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) bei 100 V in einem 4-20%igem Gradientengel (Precise Tris-HEPES-SDS Precast Polyacrylamide Mini Gel, Thermo Fisher Scientific) aufgetrennt bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte (Größenmarker: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific). Die aufgetrennten Proteine wurden für 1 h bei 100 V auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-FL IPFL00010, Millipore) im Tank-Blot-Verfahren (Bio-Rad) übertragen. Zum Blockieren der Membran und zur Verdünnung der Antikörper wurde 3% Milchpulver in TBS (20 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl pH 7,6) verwendet. Nach 20-minütigem Blocken bei RT wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (Tabelle 12) inkubiert. Anschließend wurde 3x 10 min mit TBS gewaschen. Zur Detektion gebundener primärer Antikörper wurden Fluorophor-markierte sekundäre Antikörper (Tabelle 13) verwendet und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Membran erneut 3x 10 min mit TBS gewaschen wurde, wurden die Signale am FluorChem Q Imager (Alpha innotec) detektiert.

Tabelle 12: Verwendete primäre Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Bezugsquelle	Verdünnung	Anwendung
Anti- 6xHis (GTX115045)	Kaninchen	GeneTex	1:1000 1:50	Western Blot Immunpräzipitation
Anti-6x His (MA1-81891), FITC-markiert	Maus	Thermo Fisher Scientific	1:250	Western Blot
Anti-beta-Actin (ab8224)	Maus	Abcam	1:1000	Western Blot
Anti-ScCst6	Kaninchen	Individuell hergestellt, Thermo Fisher Scientific	1:1000 1:12,5	Western Blot Immunpräzipitation
Anti-ScNce103	Kaninchen	Individuell hergestellt, Thermo Fisher Scientific	1:1000	Western Blot

Tabelle 13: Verwendete sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Bezugsquelle	Verdünnung	Anwendung
Anti-Kaninchen DyLight 649	Ziege	Jackson ImmunoResearch	1:2000	Western Blot
Anti-Kaninchen DyLight 649	Esel	Jackson ImmunoResearch	1:2000	Western Blot
Anti-Maus DyLight 549	Esel	Jackson ImmunoResearch	1:2000	Western Blot

2.4.3. Aufreinigung rekombinanter Proteine mit immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die im *E. coli*-Lysat enthaltenen, rekombinanten, 6x His-markierten Proteine wurden mithilfe der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt. Als stationäre Phase wurden 5 ml Ni-NTA Sepharose (Biozol) genutzt, welche zunächst ausgiebig mit Aufreinigungspuffer (25 mM Natriumphosphat pH 7,4, 250 mM NaCl, 10 mM Imidazol) gewaschen wurde. Das Lysat wurde 1:10 mit Aufreinigungspuffer verdünnt und schrittweise auf eine Säule (50 ml Säulenvolumen) überführt. Der Durchlauf wurde aufgefangen. Die stationäre Phase wurde mit 2-fachem Säulenvolumen Aufreinigungspuffer gewaschen. Diese Waschfraktion wurde ebenfalls separat gesammelt. Zwei weitere Waschschrte mit 5 ml Aufreinigungspuffer + 20 mM Imidazol bzw. 40 mM Imidazol, der jeweils für 10 min auf der Säule inkubiert wurde, dienten zum Abwaschen weiterer unspezifisch gebundener Proteine. Auch diese Fraktionen wurden gesammelt. Anschließend wurde erneut mit 1-fachem Säulenvolumen Aufreinigungspuffer gewaschen. Die 6x His-markierten Proteine, welche noch immer an der stationären Phase gebunden waren, wurden mit 3x 3 ml Elutionspuffer (25 mM Natriumphosphat pH 7,4, 250 mM NaCl, 250 mM Imidazol) eluiert. Jede Eluatfraktion wurde zunächst 15 min bei 4 °C auf der Säule inkubiert und dann einzeln aufgefangen. Nach der Elution schloss sich die Säulenreinigung an. Hierfür wurde zunächst mit Aufreinigungspuffer, dann mit 5 ml 1,5% Essigsäure, erneut mit Aufreinigungspuffer, danach mit 5 ml 0,5 M NaOH und abschließend wieder mit Aufreinigungspuffer gewaschen. Die Lagerung der stationären Phase erfolgte in 20% Ethanol bei 4 °C. Im Western Blot (2.4.2.) wurden alle gesammelten Fraktionen auf 6x His-markierte

Proteine untersucht. Die Sauberkeit der einzelnen Fraktionen wurde mittels Silberfärbung (SilverQuest Silver Staining Kit, Invitrogen) bestimmt.

2.4.4. Aufreinigung rekombinanter Proteine durch Größenausschlusschromatographie

Für die weitere Aufreinigung von ScCst6-His wurde eine Größenausschlusschromatographie an einer ÄKTA mit Sephadex 200 GL Säule (beides GE Healthcare) durchgeführt. Hierfür mussten die jeweiligen Eluate mithilfe eines Zentrifugalfilters (Spin-X UF 6ml Concentrators, Corning, MWCO 10-50) auf < 1 ml aufkonzentriert werden. Als mobile Phase wurde Aufreinigungspuffer genutzt, der mit 0,5 ml/min über die Säule gepumpt wurde. Mithilfe einer Spritze und eines Probenschlauches wurde die mittels IMAC vorgereinigte Proteinlösung durch einen Ventiltausch auf die Säule geladen. Mit 0,2 ml/min wurde anschließend weiter Aufreinigungspuffer über die Säule gepumpt bis alle Proteine, nach der Größe aufgetrennt, die Säule verlassen hatten. Dies wurde mithilfe der UV-Absorption bei 280 nm überprüft. Jeder UV-Scheitelpunkt wurde nach Möglichkeit getrennt aufgefangen und im Western Blot auf 6x His-markierte Proteine überprüft. Zudem wurde eine Silberfärbung genutzt, um die Sauberkeit der einzelnen Fraktionen zu untersuchen. Ausreichend saubere Fraktionen wurden vereinigt, erneut durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert und die Proteinmenge mit dem Bradford Assay (Roti-Quant, Carl Roth) gemessen.

2.4.5. Produktion und Testung spezifischer Antikörper gegen ScNce103 und ScCst6

Mindestens 1 mg aufgereinigtes ScNce103-His bzw. ScCst6-His wurden zur Herstellung spezifischer Antikörper im Kaninchen genutzt (durchgeführt von Thermo Fisher Scientific). Hierfür wurden zunächst aus 10 Kaninchen jeweils 2 Tiere pro Antigen ausgewählt, deren Serum vor Immunisierung im Western Blot die geringste Aktivität gegen *S. cerevisiae* WT Lysat aufwies. Die Tiere wurden über 90 Tage hinweg 4x mit dem entsprechenden Antigen immunisiert. An den Tagen 28, 56 und 70/72 wurde jeweils Serum gesammelt (Thermo Fisher Scientific). Alle Seren wurden mittels ELISA (Enzyme

linked immunosorbent assay) hinsichtlich des Antikörper-Titers überprüft (durchgeführt von Thermo Fisher Scientific). Zudem wurde im Western Blot getestet, ob das zur Immunisierung genutzte rekombinante Protein sowie das endogene Protein im *S. cerevisiae* WT Lysat erkannt wird. Das jeweils beste Serum wurde zur Protein-A-Aufreinigung ausgewählt, die ebenfalls von Thermo Fisher Scientific durchgeführt wurde. Da sich zeigte, dass die hergestellten polyklonalen Antikörper unspezifisch auch andere 6x His-markierten Proteine banden, wurde jeder Antikörperlösung für den Western Blot 1 µg/ml 6x His Peptid (GENTAUR) zur Absättigung zugegeben.

2.4.6. Immunpräzipitation

Eine exponentielle *S. cerevisiae* WT Kultur wurde unter Luft-Bedingungen geschüttelt. Die Zellen wurden geerntet und pro 50 ml Kultur in 500 µl kaltem IP-Puffer (20 mM Natriumphosphat pH 7, PhosStop, Protease-Inhibitor EDTA-frei, 2 mM PMSF) resuspendiert und aufgeschlossen. Vom klaren Lysat wurde eine Probe als Kontrolle für den Western Blot abgenommen. Anschließend wurde das Lysat mit Antikörpern bei 4 °C über Nacht auf einem Rollschüttler inkubiert. Bei Nutzung der anti-ScCst6-Antikörper zur Immunpräzipitation wurden dem Ansatz zusätzlich 5 µg 6x His-Peptid zugesetzt. Als Negativkontrolle wurde Lysat ohne Zugabe von Antikörpern inkubiert. Je Ansatz wurden 50 µl Protein-G-Sepharose-Beads (GE Healthcare) 2x mit IP-Puffer gewaschen. Hierfür wurden die Beads abzentrifugiert (2500 g, 2,5 min) und der Überstand mit einer Spritze und aufgesetzter 25G-Nadel abgesaugt. Die Beads wurden 1 h bei 4 °C mit dem Lysat-Antikörper-Gemisch unter leichtem Rollen inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Beads wurde der Überstand mit einer Spritze abgenommen und die Beads 5x mit IP-Waschpuffer (IP-Puffer + 500 mM NaCl) gewaschen. Nach Zugabe des Waschpuffers wurden die Proben jeweils 1 min bei 1000 rpm geschüttelt, um unspezifisch gebundene Proteine zu lösen. Der Überstand nach Zentrifugation wurde mit einer Spritze abgesaugt. Bei der Co-Immunpräzipitation wurde anschließend 25 µg aufgereinigtes ScSch9-His, exprimiert in *E. coli* (2.3.2.), in IP-Puffer zu den Beads gegeben und 3 h bei 4 °C gerollt. Als Negativkontrolle wurde IP-Puffer ohne ScSch9-His genutzt. Anschließend wurde erneut 5x mit IP-

Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads mit SDS-Ladepuffer für 10 min aufgeköcht und abzentrifugiert. Überstand und Beads, welche erneut mit SDS-Ladepuffer versetzt und aufgeköcht wurden, wurden einzeln durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert.

2.4.7. Radioaktiver Phosphorylierungs-Assay

Zum Nachweis der Phosphorylierungsreaktion wurde ScSch9-His in *S. cerevisiae* in 5% CO₂ überexprimiert und für 6 h mit 2% Galaktose induziert (2.3.3.). Nach dem Ernten der Zellen wurden diese aufgeschlossen, allerdings nur für 3x 1 min, um die Aktivität von ScSch9 nicht zu beeinflussen. Anschließend wurde ScSch9 durch Immunpräzipitation mit Kaninchen anti-6x His-Antikörper (GTX115045, GeneTex, Tabelle 12) aufgereinigt. Als Negativkontrolle dienten Protein-G-Sepharose-Beads ohne gebundenes ScSch9. Nachdem die Beads 3x mit IP-Waschpuffer gewaschen wurden, wurden sie in Kinasepuffer (PBS pH 7,4, 4 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 20% Glycerol, 1 mM PMSF) aufgenommen. Im Radioisotopenlabor erfolgte im Anschluss das Ansetzen der Kinasereaktion in Kinasepuffer mit jeweils 50 µl Gesamtvolumen. Hierfür wurde pro Ansatz 1 µg bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes ScCst6-His (2.3.2., 2.4.3. und 2.4.4.) zu den abzentrifugierten Beads gegeben. Nach Zugabe von 100 µM ATP und 25 µCi [γ -³²P]-ATP (PerkinElmer, BLU002250UC, spezifische Aktivität: 10 Ci/mmol) wurden die Reaktionen gemischt und bei 30 °C für 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe von SDS-Ladepuffer und Erhitzen auf 95 °C für 5 min gestoppt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Lauffront des Gels wurde aufgrund hoher Radioaktivität abgeschnitten und das Gel, abgedeckt mit Folie, auf Filterpapier im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurde es in eine Röntgenfilmkassette gelegt und festgeklebt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm für mindestens 24 h aufgelegt, dann wurde der Film mithilfe von Fixier- und Entwicklerlösung (Carestream Fixierer GBXF/ Entwickler GBXE, Hartenstein) entwickelt und eingescannt. Alle Arbeiten

im Radioisotopenlabor erfolgten in Kooperation mit Dr. Frank Hänel (Zell- und Molekularbiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - HKI Jena).

2.4.8. Massenspektrometrische Analyse der ScCst6-Phosphorylierung

Probengewinnung und -aufarbeitung

Um die Phosphorylierung von ScCst6 unter Hoch- und Niedrig-CO₂-Bedingungen genauer zu untersuchen, wurde *CST6* in *S. cerevisiae* WT oder $\Delta sch9$ überexprimiert (2.3.3., Tabelle 2). Die Überexpression wurde für 5 h in je 400 ml YEP + 2% Galaktose unter 5% CO₂ bei 30°C durchgeführt. Anschließend wurden die Kulturen entweder für 1 h unter Luft bei 30 °C geschüttelt, oder aber sie verblieben für eine weitere Stunde bei 5% CO₂. Die Zellen wurden geerntet, in Lysepuffer resuspendiert, aufgeschlossen und über IMAC wurde His-markiertes, überexprimiertes ScCst6 aufgereinigt. Dies erfolgte im Wesentlichen wie für *E. coli*-Lysate beschrieben (2.4.3), jedoch in kleinerem Maßstab (10 ml Säulenvolumen). Zudem wurde das Lysat nicht mit Aufreinigungspuffer verdünnt, sondern direkt auf das Säulenmaterial gegeben und 1 h bei 4 °C auf einem Rollschüttler inkubiert. Anschließend wurde die stationäre Phase mit Aufreinigungspuffer sowie Aufreinigungspuffer + 40 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte schrittweise mit 3x 2 ml Elutionspuffer, dazwischen wurde 15 min auf Eis inkubiert. Die Eluate wurden vereinigt und mithilfe eines Zentrifugalfilters (Spin-X UF 6ml Concentrators, Corning, MWCO 30 kDa) bei 4000 g und 4 °C aufkonzentriert, bis das Gesamtvolumen < 100 µl betrug. Für eine massenspektrometrische Analyse wurden die Proben über SDS-PAGE aufgetrennt. Von je einer Probe wurde ein Western Blot, gefärbt gegen 6x His-markierte Proteine, als Kontrolle für die Proteinaufreinigung angefertigt. Eine zweite Probe pro Stamm und Bedingung wurde mit Coomassie Blue (Roti-Blue quick, Carl Roth) angefärbt. Anhand des Western Blots wurde die Bandengröße von ScCst6-His abgeschätzt und im Coomassie-gefärbten Gel wurden diese möglichst eng ausgeschnitten und in kleine Stücke geschnitten. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden in Kooperation mit Dr. Thomas Krüger und Dr. Olaf Kniemeyer (Molekulare und Angewandte Mikrobiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und

Infektionsbiologie - HKI Jena) durchgeführt. Der in-Gel-Verdau wurde adaptiert von (Shevchenko et al, 1996). Zunächst wurden die Gelstücke mit 100 µl MS-Waschpuffer (25 mM NH_4HCO_3 in 50/50 (v/v) Acetonitril (ACN)/ H_2O + PhosStop) für 15 min gewaschen, anschließend wurde der Überstand abgenommen. Durch Zugabe von 100 µl ACN schrumpften die Gelstücke. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Gelstücke 5 min mit 50 µl 50 mM NH_4HCO_3 rehydriert. 50 µl ACN wurden zugegeben, gemischt und 15 min inkubiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt um eine vollständige Entfärbung zu erreichen. Der Überstand wurde erneut abgenommen, die Gelstücke für 5 min mit 100 µl ACN bedeckt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Durch Zugabe von 100 µl 10 mM DTT in 50 mM NH_4HCO_3 wurden die Disulfidbrücken der Proteine 30 min bei 56 °C reduziert. Diese Reduktionslösung wurde durch 100 µl Alkylierungslösung (55 mM Iodacetamid, 50 mM NH_4HCO_3) ersetzt und im Dunkeln 30 min inkubiert, wodurch es zu einer Carbamidomethylierung reduzierter Cysteinreste kam. Anschließend wurden die Gelstücke 2x 15 min mit MS-Waschpuffer gewaschen, durch Bedecken mit 100 µl ACN 5 min dehydriert und durch Vakuumzentrifugation getrocknet. 50 µl Trypsin-Lösung (25 mM NH_4HCO_3 + 1,25 µg Trypsin/LysC Mix, Mass Spec Grade, Promega, Tabelle 14) wurden zu je einer Probe pro Bedingung gegeben und 45 min bei 4 °C inkubiert. Überschüssige Trypsin-Lösung wurde danach abgenommen, 5-10 µl 25 mM NH_4HCO_3 zugegeben und die Ansätze 18 h bei 37 °C leicht geschüttelt. Für den Verdau mit AspN wurden die Gelstücke nach Vakuumzentrifugation in 50 µl AspN-Lösung (H_2O + 1 µg AspN, Promega, Tabelle 14) aufgenommen und ebenfalls 18 h bei 37 °C inkubiert. Zudem erfolgte zum Abdecken möglichst großer Sequenzbereiche ein in-Gel-Verdau mit GluC (50 mM NH_4HCO_3 + 2,5 µg Protease + 0,5 mM Glu-Glu-Peptid, Promega) und LysargiNase (25 mM NH_4HCO_3 + 1,25 µg Protease, (Huesgen et al, 2015)) bei 37 °C über Nacht (Tabelle 14). Die Extraktion der Peptide erfolgte mittels ansteigender Konzentrationen ACN (Trifluoressigsäure (TFA)/ H_2O /ACN: 1/49/50, 1/29/70, 1/9/90), wobei zwischendurch jeweils 15 min sonifiziert wurde und die Überstände gesammelt, vereinigt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet wurden. Neben dem in-Gel-Verdau wurde ein in-Lösungs-Verdau mit Trypsin-LysC und GluC durchgeführt, um auch Peptide großer Länge detektieren zu können. Hierfür

wurden die IMAC-Eluate mit 200 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin reduziert und mit 375 mM Iodacetamid in 100 mM NH₄HCO₃ alkyliert. Anschließend erfolgte der Verdau wie bereits beschrieben. Nach der Trocknung in der Vakuumzentrifuge erfolgte die Anreicherung der Phosphopeptide nach der TiO₂-Methode (TiO₂ Spin Tip Sample Prep Kit, protea). Die gesammelten Durchläufe wurden in einem zweiten Schritt über C18-Säulen aufgereinigt (C18 Spin Tip Sample Prep Kit, protea). Sowohl die Phosphopeptid-angereicherte Fraktion als auch der Durchlauf wurden erneut getrocknet, in 20 µl MS-Messpuffer (0,05% TFA, 2% ACN in H₂O) aufgenommen und 15 min sonifiziert. Mithilfe eines Zentrifugalkonzentrators (MWCO 10 kDa) wurden Salze entfernt, anschließend erfolgte die Messung über Flüssigchromatographie-gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

Tabelle 14: Verwendete Proteasen für Massenspektrometrie

Bezeichnung	Spaltung	Bezugsquelle
Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade	C-terminal von R und K	Promega
AspN, Sequencing Grade	N-terminal von D und C	Promega
GluC, Sequencing Grade	C-terminal von D und E	Promega
LysargiNase	N-terminal von R und K	Proteolysis Lab, IBMB-CSIC Barcelona Science Park (Huesgen et al, 2015)

Analyse mittels LC-MS/MS

Die LC-MS/MS-Analyse, ausgeführt von Dr. Thomas Krüger (Molekulare und Angewandte Mikrobiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - HKI Jena), wurde mit einem Ultimate 3000 nano RSLC (Rapid Separation Liquid Chromatography) System durchgeführt, das mit einem QExactive Plus Massenspektrometer gekoppelt ist (beide Thermo Fisher Scientific). Die Peptide wurden Online mit Hilfe einer Trapping-Säule (Acclaim Pep Map 100, 2 cm x 75 µm, 3 µm) bei einer Flussrate von 5 µl/min angereichert. Nach 4 min wurde das Umschaltventil aktiviert, um die aufkonzentrierten Peptide auf die analytische Trennsäule zu eluieren. Für die Trennung der Peptide wurde eine Acclaim PepMap RSLC-Säule (15 cm x 75 µm, 2 µm) als stationäre Phase eingesetzt (Thermo Fisher Scientific). Alle verwendeten Lösungsmittel hatten einen für die

Massenspektrometrie bestimmten Reinheitsgrad (MS-grade). Eine binäre mobile Phase bestehend aus Eluent A (0.1% Ameisensäure in H₂O) und Eluent B (0.1% Ameisensäure in 90/10 ACN/H₂O v/v) wurde für eine 135-minütige nichtlineare Gradientenelution verwendet: 0-5 min bei 4% B, 10 min bei 4,5% B, 15 min bei 5,5% B, 20 min bei 6% B, 25 min bei 6,6% B, 30 min bei 7,2% B, 35 min bei 7,9% B, 40 min bei 8,6% B, 45 min bei 9,3% B, 50 min bei 10,2% B, 55 min bei 11,4% B, 60 min bei 12,9% B, 65 min bei 15% B, 70 min bei 17,1% B, 75 min bei 20,4% B, 80 min bei 24% B, 88 min bei 30% B, 94 min bei 38% B, 100 min bei 50% B, 103 min bei 66% B, 106-114 min bei 96% B, 115-135 min bei 4% B. Die LC-Leistungsfähigkeit wurde routinemäßig mit Hilfe eines tryptischen Verdauens von Cytochrom C sowie mit Blindinjektionen vor und nach der Analyse überprüft. Darüber hinaus wurde die UV-Absorption der Peptide bei $\lambda = 214$ nm während der Analyse zur Qualitätskontrolle herangezogen. Die Nanospray-Flex-Ionenquelle (Thermo Fisher Scientific), ausgestattet mit einem Emitter aus rostfreiem Stahl, wurde verwendet, um positiv geladene Ionen bei einer Ionisierungsspannung von 2,2 kV zu generieren. Die Ionentransferkapillare war auf 220 °C temperiert und die S-lens wurde auf eine Widerstandsspannung von 50 V eingestellt. Das Massenspektrometer wurde unmittelbar vor der Analyse extern mit Hilfe einer positiven CalMix-Lösung kalibriert. Außerdem wurde während jeder Messung eine interne Massenkalisierung auf Basis des ubiquitären Polydimethylsiloxankontaminanten [C₂H₆SiO]₆ bei m/z 445,12003 amu durchgeführt. Der Quadrupol-Orbitrap-Hybrid-Massenanalysator wurde im Vollscan-MS / ddMS2 (TopN)-Modus verwendet. Die Vorläufer-Ionen wurden zunächst im Vollscan-Modus in einem Massenbereich von m/z 300-1600 amu bei einer Auflösung von 70k FWHM, einer maximalen Injektionszeit von 120 ms und einem AGC (automatic gain control) -Zielwert von 1e6 gemessen. Für die datenabhängige Massenanalyse, wurden bis zu 6 Vorläufer-Ionen (Top6-Methode) mit der höchsten Abundanz je Scanzzyklus bei einer Ladung von $z = 2-6$ zunächst im Quadrupol für die anschließende Fragmentierung mit einer Isolationsweite von m/z 3,0 amu ausgewählt. Die resultierenden Fragment-Ionen wurden in der HCD-Zelle mit einer schrittweisen Kollisionsenergie von 24, 30, und 36 V generiert, wobei Stickstoff als Kollisionsgas verwendet wurde. Der dynamische Ausschluss von Vorläufer-Ionen wurde auf 35 s

begrenzt. Die Fragment-Ionen wurden bei einer Massenauflösung von 17,5k (FWHM), einer maximalen Injektionszeit von 120 ms und einem AGC-Zielwert von $2e5$ gemessen. Der MS/MS-Scanbereich hatte einen festen Ausgangswert von m/z 120 amu. Das LC-MS/MS-Gerät wurde mit Hilfe der Software Thermo/Dionex Chromeleon Xpress v6.80 SR13 (build 3818) und Thermo QExactive Plus Tune / Xcalibur v3.0.63 2.3 (build 1765) angesteuert.

Proteindatenbanksuche

Die Proteindatenbanksuche wurde ebenfalls von Dr. Thomas Krüger (Molekulare und Angewandte Mikrobiologie, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - HKI Jena) ausgeführt. Thermo raw-Dateien wurden mit Hilfe der Software Proteome Discoverer (PD) v1.4.0.288 (Thermo) prozessiert. Tandemmassenspektren wurden unter Anwendung der Algorithmen von Mascot v2.4.1 (Matrix Science, UK), Sequest HT und MS Amanda mit einer wöchentlich aktualisierten NCBI Proteindatenbank von *S. cerevisiae* verglichen. Bis zu zwei theoretische Fehlspaltstellen waren erlaubt für den Verdau mit Trypsin-LysC, AspN, GluC oder LysargiNase. Die Massentoleranzen für Vorläufer- und Fragment-Ionen wurden gerätespezifisch auf 10 ppm bzw. 0,02 Da festgelegt. Als dynamische Modifikation wurde die Oxidation von M sowie Phosphorylierungen von Serin (S), Threonin (T) und Tyrosin berücksichtigt. Statische Modifikationen beruhen auf der Carbamidomethylierung von Cystein durch Iodoacetamid. Das Percolator-Software-Addon und eine reverse falsch-positive Datenbank für die (q-Wert) Validierung von Peptidespektrumübereinstimmungen (PSMs) wurden unter Anwendung eines maximalen Delta CN-Wertes von 0,05 und einer false discovery rate (FDR) < 1% genutzt. Mindestens 2 Peptide je Protein wurden für positive Proteinübereinstimmungen benötigt. Zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit der Phosphorylierungsstellen wurde das Software-Addon phosphoRS 3.1 PD eingesetzt (Taus et al, 2011).

2.5. Messung der ScNCE103 Promotoraktivierung mittels GFP

S. cerevisiae WT, Δ cst6 und Δ sch9 wurden mit einem Plasmid transformiert, welches GFP (Grünfluoreszierendes Protein) unter der Kontrolle des ScNCE103 Promoters enthält (Plasmid siehe Tabelle 5, Stämme siehe Tabelle 2). Die Kulturen wurden über Nacht in Minimalmedium + H, M, L bei 37°C und 5% CO₂ geschüttelt, zudem wurden je 2 Kolben Minimalmedium + H, M, L pro Stamm und Zeitpunkt bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Inokulation dieser Duplikate wurde je eine Kultur nach 30 min unter Luft weiter geschüttelt, während die zweite bei 5% CO₂ verblieb. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Probe t=0 entnommen. Nach 1 h und 2 h Inkubation bei Luft bzw. 5% CO₂ wurden jeweils weitere Proben entnommen. Hierfür wurden jeweils 1 ml der Kulturen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Wasser aufgenommen und direkt mikroskopiert (LSM 780, Zeiss, Jena). Zum Vergleich der GFP-Fluoreszenzintensitäten wurde der WT zum Zeitpunkt t=0 als Referenz genutzt und die Mikroskopeinstellungen so gewählt, dass gerade noch eine Fluoreszenz detektiert werden konnte. Diese Einstellungen wurden für alle folgenden Zeitpunkte und Stämme beibehalten. Die Fluoreszenzintensität von jeweils 50 zufällig aufgenommenen Zellen pro Zeitpunkt wurde mithilfe der ZEN Software (Zeiss, Jena) vermessen und die durchschnittliche Hintergrundintensität abgezogen. Anschließend wurde der Mittelwert aller Zellen pro Zeitpunkt bestimmt.

2.6. Statistische Auswertung

Die Genexpressionsdaten wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 6.0 analysiert. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des Students t-Test (zweiseitig, ungepaart) bestimmt. Die Daten sind dargestellt als arithmetische Mittelwerte, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Ein Ergebnis wurde als signifikant eingestuft, wenn das Signifikanzlevel von p kleiner als 5% war ($p \leq 0,05$). In den Graphen ist dies durch Sterne dargestellt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung möglicher Cst6-spezifischer Enzyme mit Einfluss auf die *NCE103* Expression

3.1.1. Die *ScNCE103* Expression wird CO₂-abhängig reguliert

Die Expression der Carboanhydrase *ScNCE103* wird in niedrigen CO₂-Konzentrationen wie Luft hochreguliert, um die vorhandenen, geringe Mengen an CO₂ durch Hydrolyse in HCO₃⁻ umzuwandeln und damit zu fixieren. Unter hohen CO₂-Bedingungen (5% CO₂) dagegen ist die Expression der Carboanhydrase niedrig, da ein CO₂-Überangebot herrscht und eine zusätzliche enzymatische Fixierung damit nicht notwendig ist (Amoroso et al, 2005). Reguliert wird diese Expressionsänderung durch den transkriptionellen Aktivator *ScCst6* (Cottier et al, 2012). Zur Planung der folgenden Experimente wurden zunächst der genaue Zeitverlauf und das Ausmaß der *ScNCE103* Hochregulation im WT analysiert. Zudem wurde zeitgleich die *ScCST6* Expression gemessen, um eine CO₂-abhängige Expression des Transkriptionsfaktors auszuschließen.

S. cerevisiae WT Kulturen wurden unter 5% CO₂ und 37°C vorkultiviert und anschließend auf je 2 Kolben überimpft, wovon einer bei 5% CO₂ verblieb und der andere unter Luft weiter kultiviert wurde. Zum Zeitpunkt des Wechsels (t=0) sowie nach 10, 30, 60, 90, 120 und 180 min wurde jeweils die Expression von *ScNCE103* und *ScCST6* bestimmt und auf t=0 normalisiert. Bereits nach 10 min Inkubation in Luft stieg die *ScNCE103* Expression im Vergleich zur Inkubation in 5% CO₂ signifikant an (Abb. 6A). Nach 60 min in Luft war die maximale *ScNCE103* Expression (23.3 ± 4.9 relativ zum WT in Luft) erreicht. Anschließend sank die *ScNCE103* Expression wieder ab und blieb schließlich stabil beim 15-fachen der WT Expression. Im Gegensatz zur Inkubation in Luft zeigte sich bei Inkubation in 5% CO₂ keine Änderung der *ScNCE103* Expression. Als Kontrolle wurde gleichzeitig die Expression von *ScCST6* bestimmt, wobei sich keine CO₂-Abhängigkeit zeigte (Abb. 6B). Dies lässt darauf schließen, dass die Induktion der *ScNCE103* Expression in Luft nicht die Folge einer Expressionsänderung des Transkriptionsfaktors *ScCST6* ist, sondern tatsächlich auf dessen posttranslationale Modifikation zurückzuführen ist. Anhand dieser Ergebnisse wurde für die folgenden Experimente zur *ScNCE103*

Expression eine Akklimatisierungszeit in Luft von 60 min genutzt, um eine größtmögliche Expressionsdifferenz zwischen Luft und 5% CO₂ zu gewährleisten.

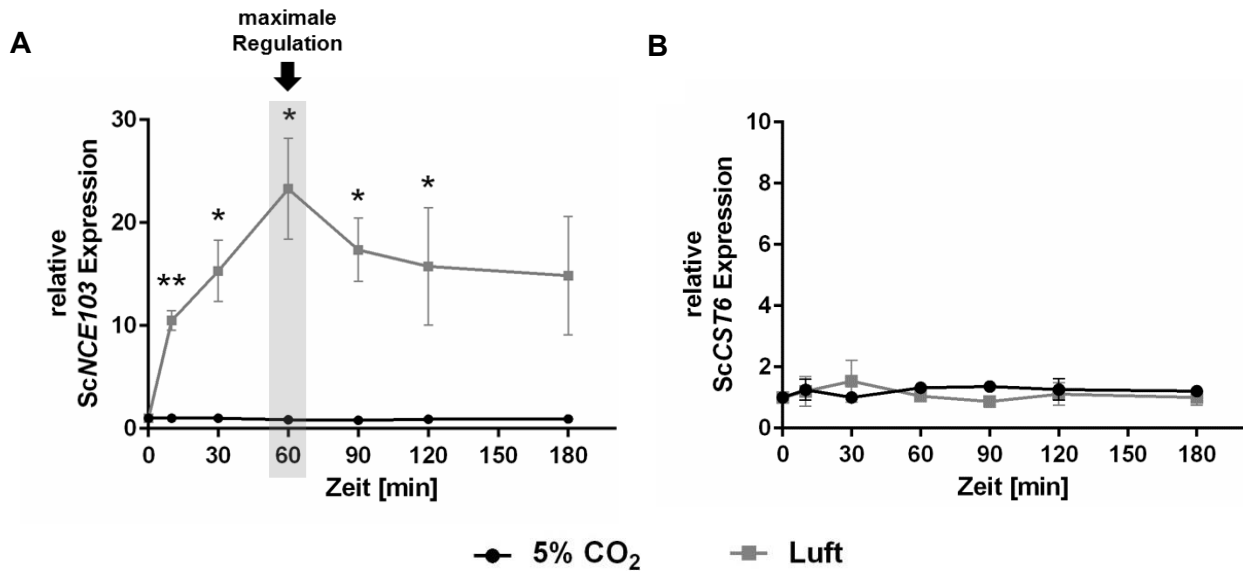


Abb. 6 Bestimmung der CO₂-abhängigen Expression von ScNCE103 und ScCST6 über die Zeit

(A) Die Expression von ScNCE103 stieg direkt nach Umsetzen in Luft signifikant an. Am höchsten war die Expression nach 60 min in Luft. Anschließend sank die ScNCE103 Expression wieder ab und blieb schließlich nahezu konstant. Im Gegensatz dazu änderte sich die Expression in Zellen, die in 5% CO₂ verblieben, nicht über die Zeit.

(B) Die ScCST6 Expression blieb ebenfalls konstant und ist damit unabhängig von den CO₂-Bedingungen in der Umwelt.

Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardabweichung, normiert auf t=0, von 3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz bezüglich der Expression in 5% CO₂ zum jeweiligen Zeitpunkt wurde mittels Students t-Test (zweiseitig, ungepaart) bestimmt und definiert als * p≤0,05 und ** p≤0,01.

3.1.2. Die Kinasemutanten *Atpd3*, *Abud32*, *Aptk2*, *Aptp1* und *Asch9* zeigen eine erhöhte Expression von ScNCE103 in 5% CO₂

Die Expression von ScNCE103 wird CO₂-abhängig durch posttranslationale Modifikation des Transkriptionsfaktor ScCst6 reguliert. Zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen mit unmittelbarem Einfluss auf die Regulation des Metabolismus zählt die Phosphorylierung (Humphrey et al, 2015). Cottier *et al.* vermuteten bereits, dass eine Phosphorylierung von *C. albicans* Rca1 an S124 die Expression von NCE103 negativ reguliert. Dies basierte auf der Beobachtung, dass eine phosphoablative Mutation von S124 (S124A) nicht nur in Luft, sondern auch in 5% CO₂ zu erhöhten Nce103 Leveln im Vergleich zum WT führte (Cottier et al, 2012). Welche Enzyme für die

Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors und damit die Regulation der Carboanhydrase verantwortlich sind, ist unbekannt. Zur Identifizierung möglicher Kinasen und Phosphatasen wurde der Modellorganismus *S. cerevisiae* genutzt. Dabei lag die Hypothese zugrunde, dass der Transkriptionsfaktor bei Deletion der Kinase in 5% CO₂ nicht mehr phosphoryliert wird, was zu erhöhter Expression der Carboanhydrase führt. Kommt es dagegen zu einer Deletion der Phosphatase, so liegt der Transkriptionsfaktor selbst unter Luft phosphoryliert vor, wodurch die Expression der Carboanhydrase in Luft stark vermindert ist.

Eine *S. cerevisiae* Kinase/Phosphatase-Mutantenbibliothek wurde hinsichtlich der *ScNCE103* Expression unter 5% CO₂ (*ScNCE103*^{CO₂}) und Luft (*ScNCE103*^{Luft}) untersucht (siehe Anhang, Tabelle X1). Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der WT bei jeder Messung mitgeführt und diente zur Normalisierung der Werte. Für den WT zeigte sich in diesem experimentellen Setting eine mittlere *ScNCE103*^{Luft} Expression von $5,64 \pm 2,63$, und damit ein deutlich geringerer Anstieg als noch bei der Zeitreihenmessung (Tabelle 15, Abb. 7). Ursache hierfür war die gleichzeitige Messung von zusätzlich 5 Mutanten, wodurch sich die Zeitspanne während der RNA-Isolation entsprechend verlängerte. Dies führte dazu, dass die CO₂-Proben länger Luftbedingungen ausgesetzt waren und es zu ersten Expressionsanpassungen kam. Daher wurde ein gleichzeitiges Bearbeiten von 6 Stämmen, inklusive WT, als geeigneter Kompromiss zwischen Anstieg der *ScNCE103* Expression und Zeitersparnis gewählt. Als Negativkontrolle diente Δ *cst6*, dessen Anstieg der *ScNCE103*^{Luft} Expression nur $2,7 \pm 1,65$ betrug und damit signifikant geringer war als beim WT (Tabelle 15, Abb. 7).

Zur Identifizierung möglicher ScCst6-spezifischer Kinasen wurde nach solchen Mutanten gesucht, deren *ScNCE103* Expression nicht nur in Luft, sondern auch in 5% CO₂ aufgrund einer nicht mehr stattfindenden Phosphorylierung und damit Inaktivierung des Transkriptionsfaktors ScCst6 erhöht ist. Alle Mutanten mit einer *ScNCE103*^{CO₂} Expression >2, verglichen mit dem WT, wurden zunächst als mögliche Kinasekandidaten identifiziert (Tabelle 15, Abb. 7). Dieses Kriterium wurde von 5 Mutanten erfüllt: Δ *tpd3* (Expressionslevel in 5% CO₂ im Vergleich zum WT: $2,16 \pm 0,65$), Δ *bud32* ($3,38 \pm 0,79$), Δ *ptk2* ($2,44 \pm 2,09$), Δ *ptp1* ($2,07 \pm 0,72$) und Δ *sch9* ($3,55 \pm 1,55$).

Tabelle 15: ScNCE103 Expression identifizierter Kinase-Mutanten

Aufgelistet sind die Mittelwerte der ScNCE103 Expression in 5% CO₂ und Luft mit jeweils dazugehörigen Standardabweichungen (SD). Zudem ist die Vervielfachung der Expression als Quotient aus Expression in Luft und 5% CO₂ dargestellt sowie dessen Standardabweichung. Alle Mutanten wurden mindestens 3x gemessen.

	ScNCE103 ^{CO₂}	SD	ScNCE103 ^{Luft}	SD	Luft/CO ₂	SD
S. c. WT	1,00		5,64	2,63	5,64	2,63
Δcst6	0,97	0,20	2,70	1,65	2,75	1,45
Δtpd3	2,16	0,65	9,60	2,58	4,80	1,85
Δbud32	3,38	0,79	36,54	8,97	10,85	1,55
Δptk2	2,44	2,09	8,65	9,08	2,98	0,97
Δptp1	2,07	0,72	3,99	2,64	2,13	1,51
Δsch9	3,55	1,55	6,12	2,98	1,91	0,70

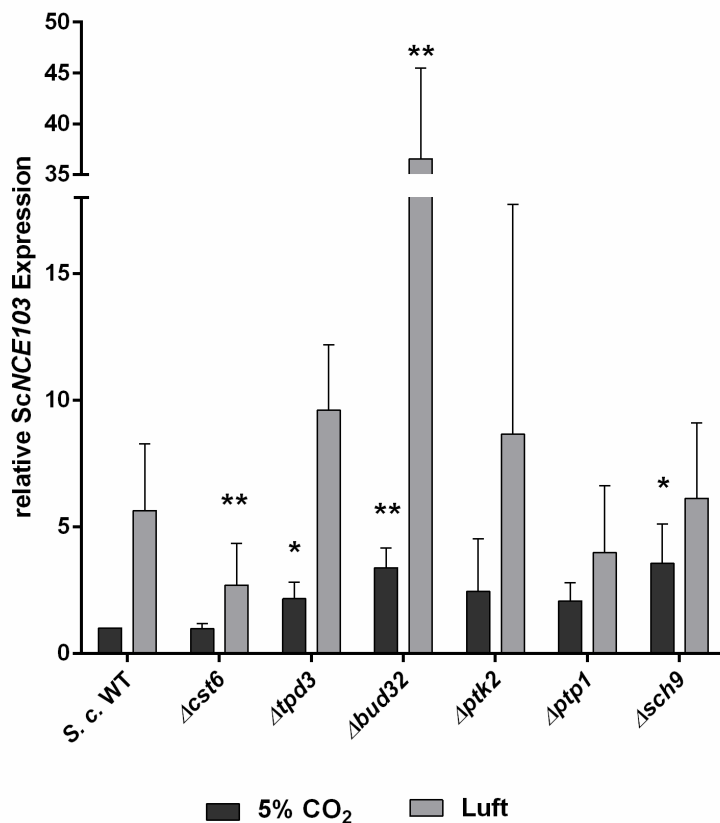


Abb. 7 CO₂-abhängige ScNCE103 Expression möglicher Kinasekandidaten

Während der *S. cerevisiae* WT bei Umsetzen von CO₂ zu Luft einen Anstieg der ScNCE103 Expression von 5,64 ± 2,63 zeigte, war dieser signifikant geringer in Δcst6. Alle dargestellten Kinasemutanten wiesen in 5% CO₂ eine im Mittel mindestens doppelt so hohe Expression auf wie der WT, wodurch sie als mögliche Kinasekandidaten eingeordnet wurden. Von diesen Kandidaten war Δsch9 am vielversprechendsten, da diese Mutante in 5% CO₂ die höchste ScNCE103 Expression aller Mutanten aufwies. Gleichzeitig war die Expression in Luft unverändert bezüglich des WT. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz (Students t-Test, zweiseitig, ungepaart) von Mutante gegen WT unter der jeweiligen Bedingung wurde definiert als * p≤0,05 und ** p≤0,01.

3.1.3. ScSch9 ist der wahrscheinlichste ScCst6- Kinasekandidat

Die 5 identifizierten Kinasekandidaten wurden im Folgenden anhand vorhandener Fachliteratur genauer untersucht und auf bisher bekannte Funktionen überprüft.

ScTpd3 ist eine Untereinheit des Protein-Phosphatase 2A Komplexes und bildet das Grundgerüst dieses heterotrimeren Komplexes, welcher für Zell-Morphogenese und Transkription notwendig ist (van Zyl et al, 1992; van Zyl et al, 1989). Knock-out Mutanten sind gekennzeichnet durch ein verzögertes Wachstum und Beeinträchtigung der Transkription bei 37 °C (van Zyl et al, 1992). Dies zeigte sich während der Analyse der RNA-Expression in stark abweichenden Expressionslevel des Haushaltsgens *ScACT1* im Vergleich zu allen anderen Stämmen. Der Anstieg der *ScNCE103*^{CO₂} Expression ($2,16 \pm 0,65$) war zwar signifikant gegenüber dem WT, allerdings wurde bisher keine Kinase-Aktivität für ScTpd3 beschrieben.

ScBUD32 codiert für eine Kinase des EKC/KEOPS Komplexes, welcher für tRNA-Modifikation und Aufrechterhaltung der Telomere zuständig ist (Downey et al, 2006; Srinivasan et al, 2011). Die Mutante $\Delta bud32$ weist starke Wachstumsdefekte auf, besonders bei Temperaturen >30 °C und in Minimalmedium (Stocchetto et al, 1997). Dies hatte Beeinträchtigungen der Experimente zur Folge, da diese generell in 37 °C durchgeführt wurden. Im Mutantenscreening zeigte $\Delta bud32$ eine signifikant erhöhte *ScNCE103*^{CO₂} Expression ($3,38 \pm 0,79$). Zudem war auch die Expression unter Luft extrem stark erhöht ($36,54 \pm 8,97$). Dadurch ergab sich trotz Hochregulation in 5% CO₂ eine mehr als 10-fache Erhöhung der *ScNCE103* Expression in Luft im Vergleich zu 5% CO₂. Dies entspricht einer Verdopplung des Luft/CO₂-Unterschieds des WT. Folglich scheint $\Delta bud32$ vielmehr zu einer generellen Hochregulation von *ScNCE103* zu führen, anstatt, wie für eine Cst6-Kinase angenommen, selektiv CO₂-abhängig zu regulieren.

ScPtk2 ist eine Kinase, die in den Transport von Eisen und die Aufnahme von Spermin involviert ist (Erez & Kahana, 2002; Kaouass et al, 1997). Eine Verbindung zu Funktionen im

Kohlenstoffmetabolismus ist nicht bekannt. Trotz im Mittel zweifach erhöhter *ScNCE103*^{CO₂} Expression bezüglich des WT ($2,44 \pm 2,09$) war diese Erhöhung statistisch nicht signifikant.

ScPtp1 ist ein Enzym mit Phosphatasefunktion. Als Zielprotein wurde bisher nur der Expressionsregulator ScFpr3 identifiziert (Wilson et al, 1995). Zudem wird eine mögliche Rolle von ScPtp1 in der Regulation der Filamentierung angenommen (Fasolo et al, 2011). Eine Kinase-Aktivität wurde bisher nicht beschrieben. Zudem ist der Anstieg der *ScNCE103*^{CO₂} Expression in Δ *ptp1* nicht signifikant ($2,07 \pm 0,72$).

ScSCH9 codiert für eine Kinase, von der bereits bekannt ist, dass sie in die Stressantwort involviert ist, wobei die Aktivität abhängig vom Nährstoffangebot ist (Morano & Thiele, 1999; Pascual-Ahuir & Proft, 2007; Qie et al, 2015; Weinberger et al, 2010). Zudem ist ScSch9 als CO₂-abhängiger Induktor und Repressor der Genexpression in *C. albicans* beschrieben worden (Stichternoeth et al, 2011). In unserem Mutantenscreening zeigte Δ *sch9* von allen getesteten Stämmen die stärkste Hochregulation der *ScNCE103*^{CO₂} Expression ($3,55 \pm 1,55$). Zudem war die Expression in Luft ähnlich der des WT, was zu einem sehr geringen Expressionsquotienten (Luft/5% CO₂) von $1,91 \pm 0,7$ führte. Zusammengefasst stellt ScSch9 anhand der mRNA-Daten und der Literatur den besten Kandidaten für eine Cst6-spezifische Kinase dar und wurde daher im Folgenden genauer untersucht.

3.1.4. Identifizierung möglicher Phosphatasekandidaten

Aufgrund der geringeren Substratspezifität von Phosphatasen (Cheng et al, 2011) stand die Identifizierung der Cst6-Phosphatase nicht im Vordergrund der Arbeit. Jedoch beinhaltete die Mutantenbibliothek eine Reihe von Phosphatasemutanten und die Ergebnisse der qRT-PCR – Analyse ließen Vermutungen über mögliche Phosphatasekandidaten zu.

Beim initialen Screening zeigte sich, dass anhand des Einflusses auf *ScNCE103* deutlich mehr Deletionsmutanten als mögliche Phosphatasen in Betracht kommen würden als dies für Kinasen der Fall war. Eine Phosphatasedeletion würde nach unserer Hypothese zu einer Verminderung der

Induktion von *ScNCE103*^{Luft} führen und damit vergleichbar mit dem Regulationsmuster von *Δcst6* sein. Würde man nun, analog zur Identifizierung der Kinase, alle Mutanten auswählen, deren *ScNCE103*^{Luft} Expression maximal halb so groß ist wie die des WT ($\leq 2,82$), so blieben 29 Mutanten übrig. Im Vergleich dazu wurden für die Kinase-Identifikation nach diesem Schritt nur 5 Kandidaten identifiziert. Daher wurde als weiteres Kriterium ein möglichst geringer Expressionsunterschied zwischen Luft und CO₂ (Luft/CO₂) mit einbezogen. In 16 Mutanten der 29 ist der *ScNCE103* Expressionsunterschied nur halb so groß wie der des WT oder kleiner. Unter diesen 16 Kandidaten befinden sich nur 4 Enzyme mit Phosphataseaktivität (*PTC2*, *PTC7*, *SDP1*, *HAL5*) sowie ein unbekannter ORF (*YPL150W*) (Tabelle 16, Abb. 8). Alle anderen Mutanten codieren für Kinasen. Von diesen 5 Kandidaten scheinen *Ptc2* und *Sdp1* vielversprechend zu sein, da sie zumindest in Zusammenhang mit Stress und der Antwort auf Umweltbedingungen eine Rolle spielen. *Ptc2* ist eine Proteinphosphatase Typ 2C mit Funktionen in DNA-Reparatur, osmotischem Stress und der Antwort auf ungefaltete Proteine (Leroy et al, 2003; Welihinda et al, 1998; Young et al, 2002). *Sdp1* ist eine dual-spezifische MAP Kinase/Phosphatase, das heißt, diese kann sowohl Serin- und Threonin- als auch Tyrosinreste phosphorylieren und dephosphorylieren. *Sdp1* zeigte Funktionen in Hitze- und oxidativem Stress (Fox et al, 2007; Hahn & Thiele, 2002).

Tabelle 16: *ScNCE103* Expression identifizierter Phosphatase-Mutanten

Aufgelistet sind die auf den WT in 5% CO₂ normalisierten Mittelwerte der *ScNCE103* Expression in 5% CO₂ und Luft mit jeweils dazugehörigen Standardabweichungen. Zudem ist die Vervielfachung der Expression als Quotient aus Expression in Luft und 5% CO₂ dargestellt sowie dessen Standardabweichung. Alle aufgelisteten Mutanten wurden mindestens 3x gemessen.

	<i>ScNCE103</i> ^{CO₂}	SD	<i>ScNCE103</i> ^{Luft}	SD	Luft/CO ₂	SD
<i>Δptc2</i>	0,96	0,25	1,74	0,88	1,80	0,78
<i>Δptc7</i>	1,30	0,62	2,77	0,72	2,33	0,92
<i>Δsdp1</i>	1,26	0,25	2,45	0,30	1,95	0,14
<i>Δhal5</i>	1,21	0,37	2,27	1,13	1,97	1,08
<i>ΔYPL150W</i>	0,97	0,32	2,62	0,76	2,71	0,11

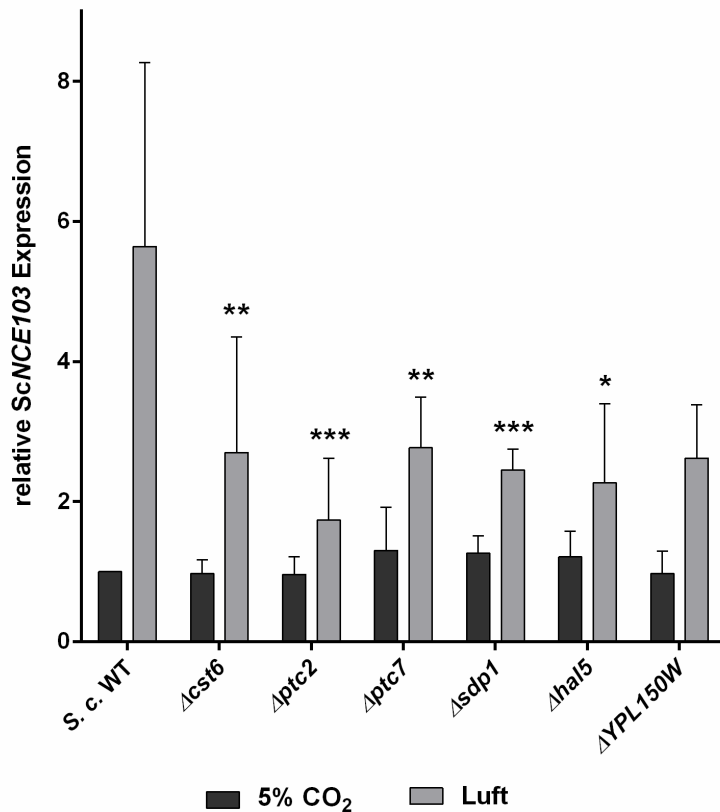


Abb. 8 CO₂-abhängige ScNCE103 Expression möglicher Phosphatasekandidaten

Anhand des qRT-PCR Screenings wurden Phosphatasemutanten, welche die Expression von ScNCE103 in Luft verminderten, identifiziert. Als Kontrollen sind *S. cerevisiae* WT sowie Δcst6 dargestellt. Kriterien für mögliche Phosphatasekandidaten waren eine maximal halb so hohe ScNCE103^{Luft} Expression im Vergleich zum WT und ein möglichst geringer Unterschied der ScNCE103 Expression in Luft und CO₂ (≤2,8). Zudem wurden Kandidaten mit reiner Kinaseaktivität ausgeschlossen. Dadurch konnten 5 mögliche Phosphatasekandidaten identifiziert werden. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz (Students t-Test, zweiseitig, ungepaart) von Mutante gegen WT unter der jeweiligen Bedingung wurde definiert als * p≤0,05, ** p≤0,01 und *** p≤0,001.

3.2. Herstellung rekombinanter Proteine und spezifischer Antikörper für die Untersuchung auf Proteinebene

Um die Funktion von ScCst6 und ScSch9 in der Regulation von ScNce103 auf Proteinebene genauer zu untersuchen, war eine Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine von ScNce103, ScCst6 und ScSch9 notwendig. Zudem wurden spezifische Antikörper gegen ScNce103 und ScCst6 benötigt, um Proteinlevel im Western Blot detektieren zu können und Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Da diese kommerziell nicht erhältlich waren, bestand die Notwendigkeit der

individuellen Herstellung, welche relativ große Proteinmengen (>1 mg) mit möglichst hoher Reinheit erforderlich machten.

3.2.1. Überexpression von ScNCE103, ScCST6 und ScSCH9

Die Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine setzte die Überexpression von ScNCE103, ScCST6 und ScSCH9, markiert mit 6xHis als Signalmolekül, in *E. coli* voraus. Die entsprechenden Sequenzen für alle drei Gene (GeneArt Gene Synthesis, Thermo Fisher Scientific) wurden in den Expressionsvektor p41 kloniert. ScNCE103-His und ScSCH9-His wurden im Stamm BL21DE3 überexprimiert, für ScCST6-His wurde Rosetta genutzt. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Die Kulturen wurden geerntet und direkt zur Überprüfung der Überexpression auf Proteinebene im Western Blot genutzt. Für alle 3 Proteine wurde eine klare Bande mit erwarteter Größe detektiert (Abb. 9).

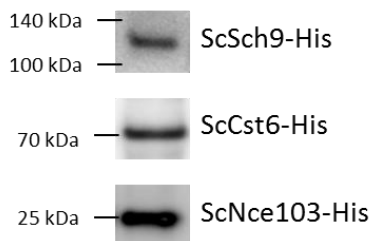


Abb. 9 Nachweis der Überexpression von ScNCE103-His, ScCST6-His und ScSCH9-His mittels Western Blot
ScNCE103-His, ScCST6-His und ScSCH9-His wurden in *E. coli* überexprimiert. Die Überexpression wurde auf Proteinebene durch Detektion von Banden mit entsprechender Größe nachgewiesen. Als Primärantikörper wurde anti-6x His (1:1000, GTX115045, GeneTex), als Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen DyLight 649 (1:2000, Jackson ImmunoResearch) verwendet.

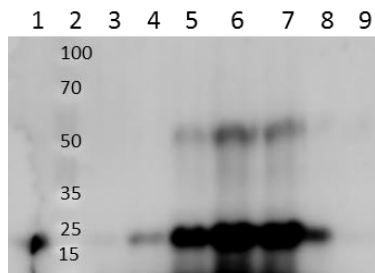
3.2.2. Aufreinigung von ScNce103-His, ScCst6-His und ScSch9-His

Um die exprimierten, rekombinanten Proteine zur Herstellung von Antikörpern und für Experimente zu Protein-Protein-Interaktionen zu nutzen, erfolgte eine Aufreinigung der Proteine mittels IMAC. Hierfür wurden die mit IPTG induzierten Kulturen geerntet und aufgeschlossen. Das Gesamtlisat wurde mit Aufreinigungspuffer verdünnt und auf die Säule mit der stationären Phase geladen. Durch

die 6x His-Signalpeptide blieben die rekombinanten Proteine an der stationären Phase haften. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit Imidazol.

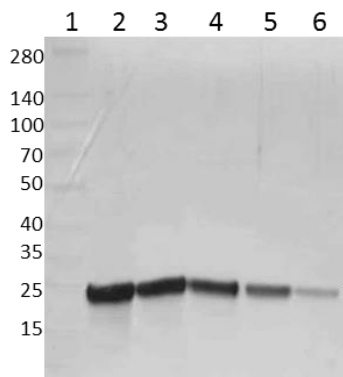
In Abb. 10A ist die IMAC-Aufreinigung von ScNce103-His im Western Blot abgebildet. Als Kontrolle wurde der lösliche Überstand des Zellaufschlusses vor dem Säulenauftrag genutzt (Spur 1), welcher ein Signal für 6x His-markiertes ScNce103 bei ~25 kDa zeigte. Im Säulendurchlauf (3) war nahezu kein ScNce103-His detektierbar, was auf eine sehr gute Bindung des Proteins an die feste Phase schließen ließ. Im darauffolgenden ersten Waschschrift (4) wurde bereits ScNce103-His von der Säule gewaschen, der überwiegende Teil des rekombinanten Proteins befand sich jedoch stark aufkonzentriert in den Eluatfraktionen (5-7). Hier zeigte sich neben der Bande bei 25 kDa auch eine deutlich schwächere bei ~ 50 kDa, welche vermutlich auf eine Dimerbildung der Carboanhydrase zurückzuführen ist. Auch im anschließenden Waschen (8) wurde ein Signal für ScNce103-His detektiert, in der Säulenreinigung (9) jedoch nicht mehr. Die Eluatfraktionen wurden vereinigt und die Reinheit im Silbergel mittels Verdünnungsreihe überprüft (Abb. 10B). ScNce103-His zeigte bereits nach diesem ersten Aufreinigungsschritt eine sehr gute Reinheit und wurde für die Herstellung spezifischer Antikörper eingesetzt.

A



- 1 Zelllysat ScNce103-His, unverdünnt
- 2 Marker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder)
- 3 Durchlauf
- 4 Waschen mit Aufreinigungspuffer
- 5 Eluat 1
- 6 Eluat 2
- 7 Eluat 3
- 8 Waschen mit Aufreinigungspuffer
- 9 Säulenreinigung

B



- 1 Marker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder)
- 2 Eluat ScNce103-His; 10 µg
- 3 Eluat ScNce103-His; 5 µg
- 4 Eluat ScNce103-His; 2,5 µg
- 5 Eluat ScNce103-His; 1 µg
- 6 Eluat ScNce103-His; 0,5 µg

Abb. 10 Aufreinigung von rekombinantem ScNce103-His mittels IMAC

(A) ScNce103-His wurde in *E. coli* überexprimiert und mit IMAC aufgereinigt. Im Eluat befand sich, deutlich aufkonzentriert, rekombinantes ScNce103-His, markiert mit einem Pfeil. Als Primärantikörper wurde anti-6x His (1:1000, GTX115045, GeneTex), als Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen DyLight 649 (1:2000, Jackson ImmunoResearch) verwendet.

(B) Das aufkonzentrierte Eluat wurde im Silbergel durch Anfärben aller Proteine auf Reinheit überprüft.

Für die Aufreinigung von ScCst6-His wurde zunächst genauso verfahren wie für ScNce103-His. Nach der Aufreinigung mittels IMAC und Überprüfung im Western Blot zeigte sich im Eluat eine deutliche Bande für ScCst6-His (Abb. 11A, Spur 4 und 5). Allerdings fanden sich auch viele Banden geringerer Größe, welche durch Degradation des Zielproteins entstanden. Zudem zeigte sich in der Silberfärbung der gleichen Proben (Abb. 11B), dass ScCst6 im Eluat (Spur 4, 5) nicht nur schnell degradiert, sondern zudem auch keine ausreichende Reinheit aufwies, da sich das Bandenmuster von dem im Western Blot unterschied.

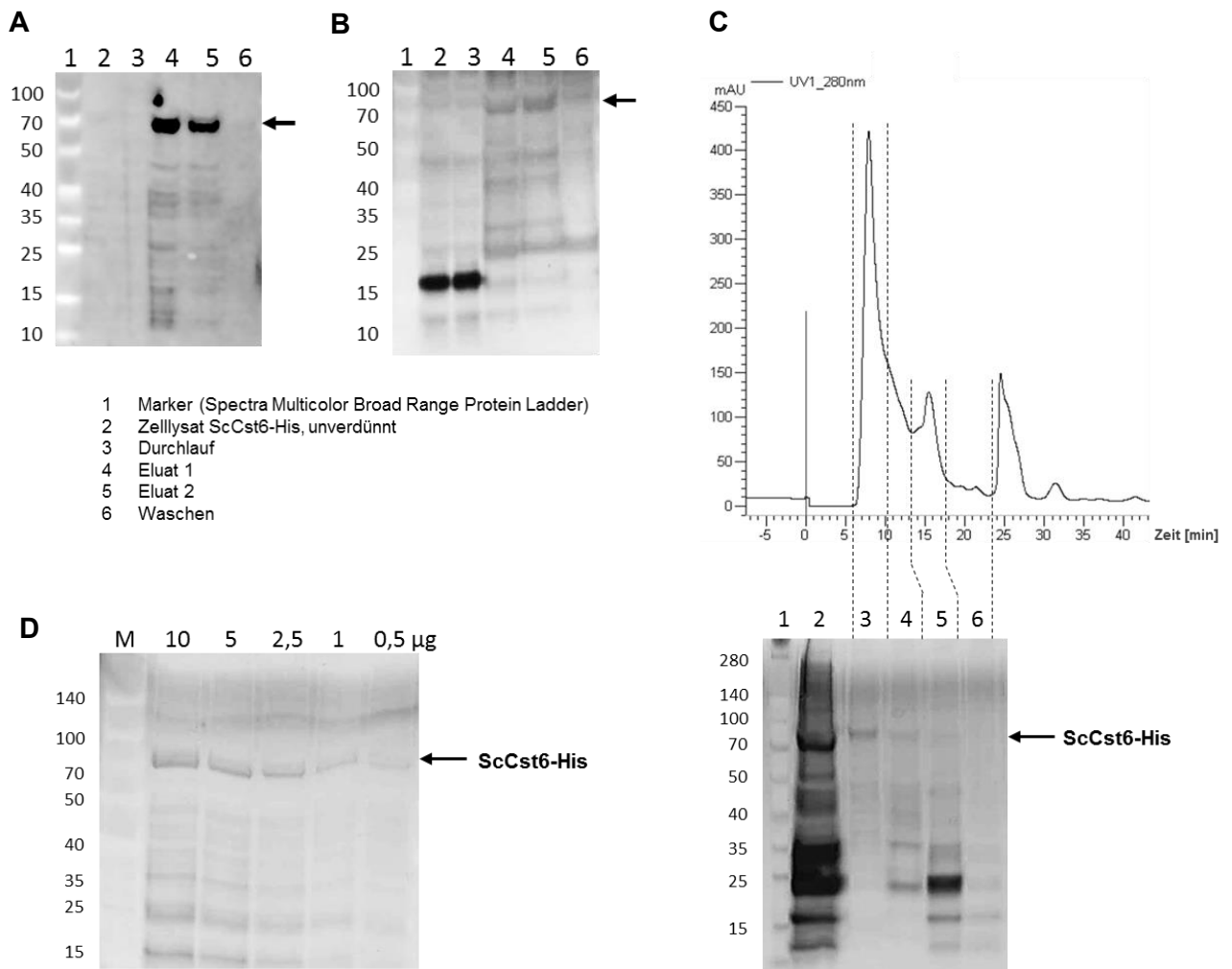


Abb. 11 Aufreinigung von rekombinantem ScCst6-His mittels IMAC und Größenausschlusschromatographie

ScCst6-His wurde in *E. coli* überexprimiert, mit IMAC aufgereinigt und durch Western Blot (A) und Silberfärbung (B) analysiert. Im Eluat (Spur 4+5) wurde rekombinantes ScCst6-His in voller Länge (~70 kDa, Pfeil) mittels Western Blot detektiert. Jedoch zeigte sich ein beginnender Abbau des rekombinanten Proteins durch leiterartige Banden geringerer Größe. In der Silberfärbung der identischen Proben waren diverse Banden neben der gewünschten Größe zu sehen, welche eine nicht ausreichende Reinheit des Proteins anzeigten, da sie nicht mit den Banden im Western Blot übereinstimmten. Als Primärantikörper wurde anti-6x His (1:1000, GTX115045, GeneTex), als Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen DyLight 649 (1:2000, Jackson ImmunoResearch) verwendet.

(C) ScCst6-His wurde anschließend durch Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Dargestellt ist das Chromatogramm für die Aufreinigung von ScCst6-His sowie die Zuordnung der Höchstwerte zu den einzelnen gesammelten Fraktionen, welche im Anschluss im Silbergel analysiert wurden. 1 - Marker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder), 2 - ScCst6-His, vorgereinigt und aufkonzentriert, 3-6 - gesammelte Fraktionen. Die erste aufgefangene Fraktion (Spur 3) enthielt ScCst6 in voller Länge.

(D) Die durch Größenausschluss aufgereinigte Fraktion in Spur 3 (C) wurde aufkonzentriert und in verschiedenen Konzentrationen mittels Silberfärbung analysiert. M - Marker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder).

Daher wurden die beiden Eluate vereint, aufkonzentriert und ein zweiter Aufreinigungsschritt, die Größenausschlusschromatographie mittels ÄKTA, angeschlossen. Das vorgereinigte ScCst6-His -

Konzentrat wurde auf die Säule entladen (Markierung bei t=0) und die UV-Absorption bei 280 nm überwacht (Abb. 11C). Sobald die UV-Absorption anstieg, wurden die einzelnen Höchstwerte als Fraktionen gesammelt, welche dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Durch eine Silberfärbung wurde die Reinheit überprüft (Abb. 11C, unten). Dabei zeigte sich, dass der erste Scheitelpunkt, entsprechend Spur 3 im Silbergel, ScCst6-His zuzuordnen ist. Wiederum war neben ScCst6-His in voller Länge eine leiterartige Bandenverteilung bei der Reinheitsanalyse im Silbergel zu sehen (Abb. 11D). Dies weist auf rasche Degradation und damit geringe Stabilität des Zielproteins hin. Für die Herstellung spezifischer Antikörper stellte das jedoch kein Problem dar. ScSch9-His wurde ebenfalls über IMAC angereichert und im Western Blot mithilfe eines anti-6x His Antikörpers überprüft (Abb. 12). Für ScSch9-His wurde eine deutliche Bande bei >100 kDa sowie schwächere Banden detektiert, die wahrscheinlich den beginnenden Abbau des Proteins zeigten. Eine weitere Aufreinigung war für folgende Experimente nicht notwendig. Zudem erfolgte keine Herstellung spezifischer Antikörper.

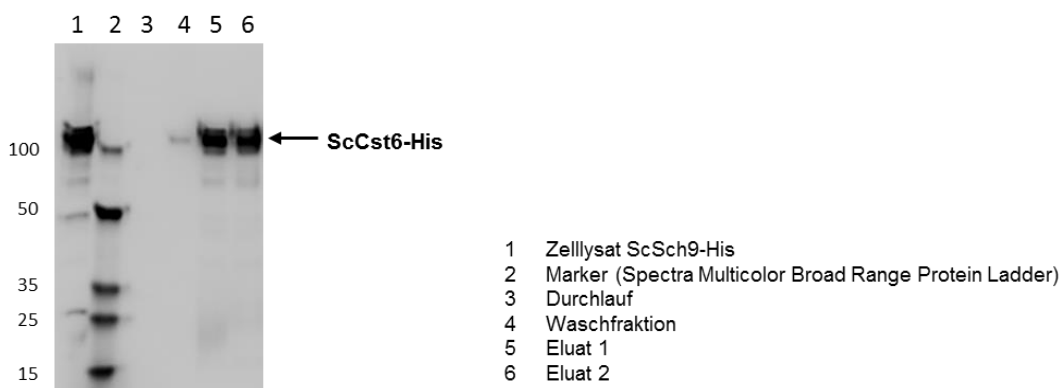


Abb. 12 Anreicherung von ScSCH9 mittels IMAC

ScSch9-His wurde in *E. coli* überexprimiert und mittels IMAC angereichert. Sowohl im unaufgereinigten Zellysat als auch in den Eluatfraktionen wurde ein deutliches Signal für ScSch9-His bei >100 kDa im Western Blot detektiert. Als Primärantikörper wurde anti-6x His (1:1000, GTX115045, GeneTex), als Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen DyLight 649 (1:2000, Jackson ImmunoResearch) verwendet.

3.2.3. Herstellung spezifischer Antikörper gegen ScNce103 und ScCst6

Aufgereinigtes ScNce103-His und ScCst6-His wurden genutzt, um spezifische Antikörper im Kaninchen herzustellen, welche zum Nachweis endogener Proteine sowie Protein-Protein-Interaktionen benötigt wurden. Je 2 Kaninchen pro Antigen wurden ausgewählt und Testblut zu je 3

Zeitpunkten (28, 56 und 70/72 Tage nach Erstimmunisierung) entnommen. Das Vorhandensein spezifischer Antikörper wurde zunächst von Thermo Fisher Scientific mit einem ELISA-Assay überprüft. Die Antikörpertiter aller Seren sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Zudem wurden alle Antiseren mit einem Titer ≥ 12500 im Western Blot hinsichtlich ihrer Reaktivität getestet. Für anti-ScNce103 zeigte das Tier PA 7798 nach 56 Tagen das beste Verhältnis zwischen Reaktivität und unspezifischer Bindung, für anti-ScCst6 das Tier PA 7800 nach 70/72 Tagen (fett markiert in Tabelle 17). Diese Antiseren wurden daher für eine Protein-A-Aufreinigung ausgewählt. Anschließend wurden beide Antikörper erneut im Western Blot getestet (Abb. 13A). Dabei zeigte sich, dass beide, anti-ScNce103 und anti-ScCst6, sowohl das rekombinante Protein als auch das endogene Protein im *S. cerevisiae* Lysat erkannten. Beide Antikörper besaßen allerdings auch eine Reaktivität gegenüber dem 6x His-Signalmolekül, was zu unspezifischer Bindung anderer 6x His-markierter Proteine führte (Abb. 13A). Daher wurden jeder Färbelösung 6x His-Peptid zur Absättigung aller unspezifischen anti-6x His-Antikörper zugegeben.

Tabelle 17: Bestimmung der Antikörpertiter mittels ELISA

Antiseren, die für weitere Experimente genutzt und aufgereinigt wurden, sind fett markiert.

Antigen	Tier	28d	56d	70/72d
ScNce103	PA 7793	200000	200000	200000
	PA 7798	200000	200000	200000
ScCst6	PA 7796	3125	12500	12500
	PA 7800	12500	50000	12500

Da *C. glabrata* und *C. albicans* orthologe Proteine für ScCst6 und ScNce103 aufweisen, bestand die Möglichkeit, dass die hergestellten Antikörper auch hier Signale zeigen könnten. Da *S. cerevisiae* näher mit *C. glabrata* als *C. albicans* verwandt ist und auch die Proteinsequenzen höhere Übereinstimmungen zeigten, wurde die Reaktivität der Antikörper zunächst in *C. glabrata* untersucht. Während die Antikörper in *S. cerevisiae* sehr gut funktionierten, waren beide nicht reaktiv gegenüber der homologen Proteine in *C. glabrata* (Abb. 13B). Dies schloss einen Einsatz zur

Untersuchung in *C. glabrata* aus. Eine Reaktivität gegenüber *C. albicans* erscheint aufgrund der geringeren Konservierung in der Proteinsequenz unwahrscheinlich und wurde nicht getestet.

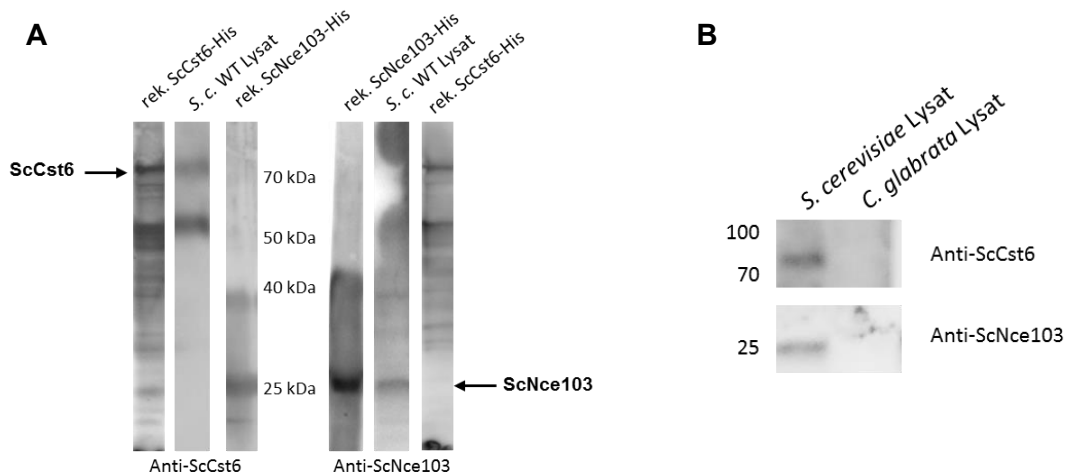


Abb. 13 Testung der anti-ScNce103 und anti-Cst6 Antikörperspezifität

(A) Die aufgereinigten Antikörper anti-ScCst6 und anti-ScNce103 wurden mittels Western Blot auf ihre Spezifität getestet. Beide Antikörper erkannten das jeweils zur Immunisierung genutzte rekombinante Protein. Im *S. cerevisiae* WT Lysat wurde endogenes ScCst6 und ScNce103 detektiert. Jedoch zeigten beide Antikörper eine Kreuzreaktivität gegenüber anderen 6x His-markierten Proteinen, zurückzuführen auf das Vorhandensein von unspezifischen anti-6x His-Antikörpern.

(B) Die Antikörper wurden zudem auf ihre Reaktivität gegenüber der homologen Proteine in *C. glabrata* getestet. Hier zeigten sich jedoch keine Banden mit entsprechender Größe.

Als sekundärer Antikörper wurde jeweils Ziege anti-Kaninchen DyLight 649 (1:2000, Jackson ImmunoResearch) verwendet.

3.3. ScSch9-Mangel erhöht ScNce103 Proteinlevel und ScNCE103 Promoteraktivierung unter 5% CO₂

Im qRT-PCR-Screening wurde gezeigt, dass eine Deletion von *ScSCH9* zu erhöhter *ScNCE103* Expression in 5% CO₂ führt, eine Deletion von *ScCST6* dagegen zu verminderter *ScNCE103* Hochregulation in Luft im Vergleich zum WT (Abb. 7). Um zu überprüfen, ob dies auch auf Proteinebene zutrifft, wurden *S. cerevisiae* WT, Δ *cst6* und Δ *sch9* in 5% CO₂ oder Luft inkubiert und die Proteinkonzentration von ScNce103 im Western Blot analysiert und quantitativ ausgewertet (Abb. 14). Im WT war unter 5% CO₂ nahezu kein ScNce103 detektierbar, in Luft dagegen zeigte sich eine starke Bande. Auch Δ *cst6* wies in 5% CO₂ kein ScNce103-Signal auf und in Luft nur ein sehr schwaches. Dies geht einher mit den Ergebnissen der mRNA-Expression. Für die Mutante Δ *sch9*

zeigte sich, dass ScNce103 im Vergleich zum WT in 5% CO₂ tatsächlich auch auf Proteinebene erhöht ist. Die Proteinmengen in Luft unterscheiden sich dagegen nur gering vom WT. Jedoch wurde auch deutlich, dass ScNce103 in $\Delta sch9$ unter 5% CO₂ und Luft keineswegs gleich stark exprimiert wird, was auf einen weiteren Regulationsmechanismus neben ScSch9 schließen lässt.

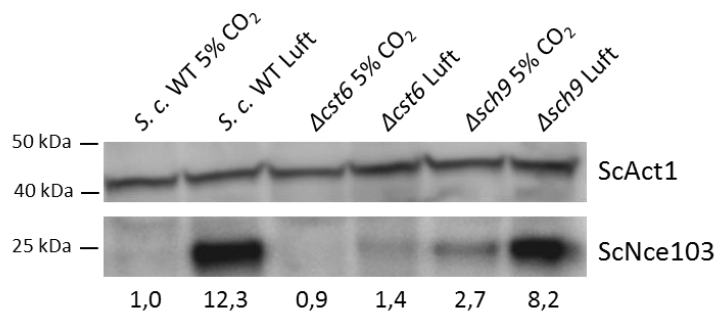


Abb. 14 CO₂-abhängige ScNce103 Proteinlevel in *S. cerevisiae* WT, $\Delta cst6$ und $\Delta sch9$

Endogene ScNce103 Proteinlevel von WT und Mutanten wurden in Abhängigkeit der CO₂-Bedingungen mittels Western Blot Analyse bestimmt. $\Delta sch9$ zeigte auch auf Proteinebene in 5% CO₂ deutlich erhöhte ScNce103-Level verglichen mit dem WT. Es wurde je Probe 1 mg Gesamtprotein aufgetragen. Als Primärantikörper wurden Kaninchen anti-ScNce103 (1:1000) und Maus anti-beta-Actin (1:1000, ab8224, abcam), als Sekundärantikörper Esel anti-Kaninchen DyLight 649 sowie Esel anti-Maus DyLight 549 (je 1:2000, Jackson ImmunoResearch) verwendet. Die quantitative Auswertung der endogenen Proteinlevel von ScNce103 bezogen auf die Ladekontrolle ScAct1 und normalisiert auf den WT in 5% CO₂ erfolgte mittels AlphaView Software (ProteinSimple).

Um nachzuweisen, dass die Erhöhung von ScNce103 in $\Delta sch9$ unter 5% CO₂ auch tatsächlich Cst6-abhängig und damit abhängig von der ScNCE103 Promoteraktivierung ist, wurde ein Plasmid hergestellt, welches GFP unter der Kontrolle des ScNCE103 Promoters trägt. Dadurch waren anhand der GFP-Signalstärke Rückschlüsse auf die Aktivierung des NCE103 Promoters möglich. *S. cerevisiae* WT, $\Delta cst6$ und $\Delta sch9$ wurden mit dem Plasmid pRS316-pScNCE103+GFP transformiert, unter 5% CO₂ kultiviert und dann zu Luft umgesetzt. Zum Zeitpunkt t=0 des Bedingungswechsels sowie nach 60 und 120 min Inkubation wurde die Fluoreszenz mit einem Konfokalmikroskop detektiert und ausgemessen. Die mittlere Fluoreszenz von 50 zufällig ausgewählten Zellen wurde berechnet (Abb. 15). *S. cerevisiae* WT zeigte einen starken Anstieg der Fluoreszenz und damit der ScNCE103 Promoteraktivierung, wenn die Zellen unter Luftbedingungen kultiviert wurden. Nach 60 min hatte sich die Fluoreszenz versechsfacht, nach 120 min sogar verneunfacht. Diese stabile, langfristig hohe

Fluoreszenz ist möglicherweise eher Folge der hohen GFP-Stabilität und weniger einer nach 120 min in Luft noch immer ansteigenden Promoteraktivierung. In der $\Delta cst6$ Mutante blieb dieser Anstieg der GFP-Fluoreszenz aus. Im Mittel stieg die Fluoreszenzintensität zwar über die Zeit tatsächlich signifikant von $1,33 \pm 0,89$ (t=0) auf $2,57 \pm 1,61$ (120 min Luft) an ($p \leq 0,001$), allerdings war dieser Anstieg sehr gering im Vergleich zum WT. $\Delta sch9$ wies unter 5% CO_2 eine signifikant erhöhte Fluoreszenz verglichen mit dem WT auf (4,5-fach erhöht). Die Fluoreszenz unter Luftbedingungen unterschied sich nicht vom WT. Diese Ergebnisse deckten sich mit den vorangegangenen Experimenten und lassen darauf schließen, dass ScSch9 die Aktivierung des ScNCE103 Promoters in 5% CO_2 , jedoch nicht in Luft vermindert.

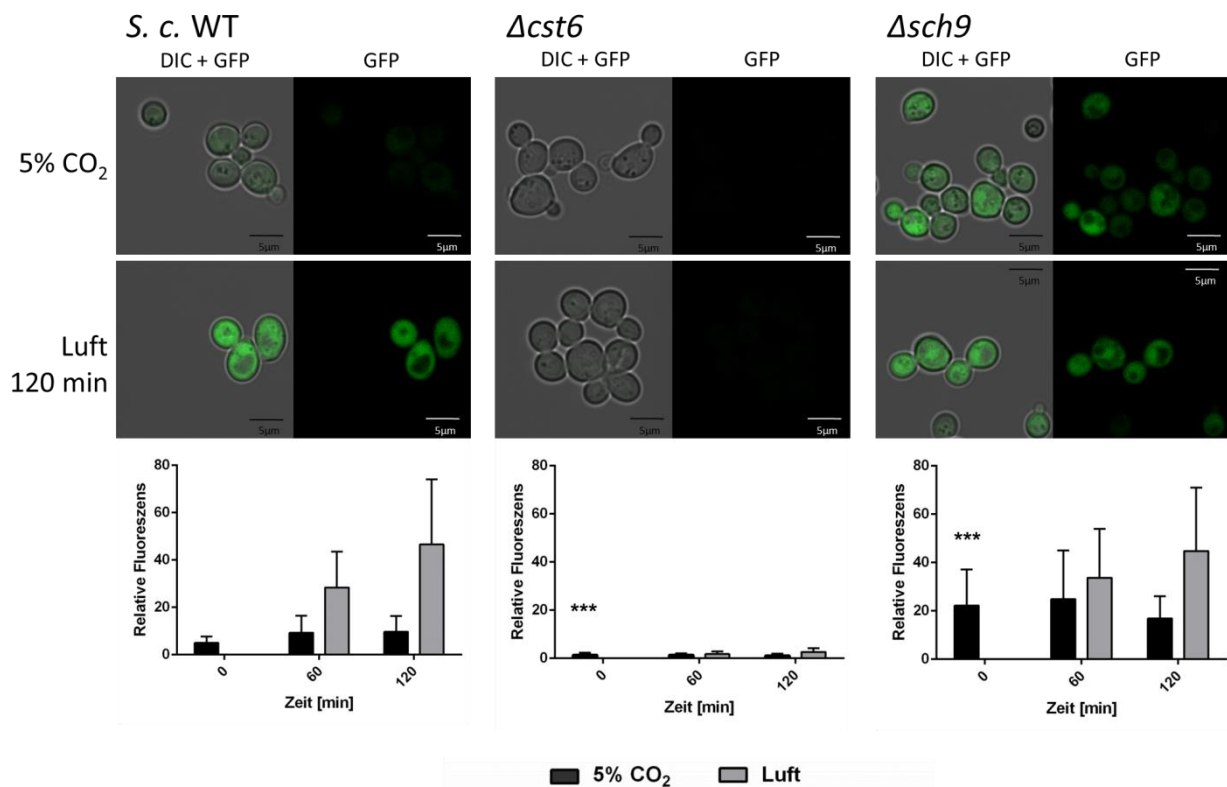


Abb. 15 Untersuchung der ScNCE103 Promoteraktivierung

S. cerevisiae WT und Mutanten wurden mit GFP unter Kontrolle des ScNCE103 Promoters transformiert und unter 5% CO_2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zu Luft transferiert und für weitere 120 min inkubiert. Zum Zeitpunkt des Bedingungswechsels sowie nach 60 und 120 min wurde die Fluoreszenz mittels Konfokalmikroskopie detektiert (DIC: Differentialinterferenzkontrast). Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität pro Zeitpunkt erfolgte durch Ausmessen von mindestens 50 zufällig gewählten Zellen. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Signifikanz (ermittelt mit Students t-Test, zweiseitig, ungepaart) von Mutante gegen WT zum Zeitpunkt t=0 wurde definiert als *** $p \leq 0,001$.

3.4. Protein-Protein-Interaktionen zwischen ScCst6 und ScSch9

3.4.1. ScSch9 bindet ScCst6

ScSch9 reguliert die *ScNCE103* Expression in Abhängigkeit von CO₂ und eine Deletion von *SCH9* führt zu erhöhter *ScNCE103* Promoteraktivierung. Dies könnte in einer Phosphorylierung des aktivierenden Transkriptionsfaktors ScCst6 durch ScSch9 in 5% CO₂ begründet sein. Um eine mögliche Interaktion zwischen ScCst6 und ScSch9 zu untersuchen, wurde eine Immunpräzipitation von ScCst6 durchgeführt. *S. cerevisiae* WT wurde in Luft kultiviert, um sicherzustellen, dass ScCst6 nicht bereits vorher durch endogenes ScSch9 phosphoryliert wurde. Dadurch könnte eine Bindung beider Proteine durch Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors behindert werden. Mithilfe spezifischer anti-ScCst6 Antikörper, abgesättigt mit 6x His-Peptid, wurde endogenes ScCst6 präzipitiert. Anschließend wurde das Immunkonjugat mit aufgereinigtem ScSch9-His inkubiert. Mithilfe von SDS-PAGE und Western Blot wurden die gebundenen Proteine detektiert (Abb. 16). In der Negativkontrolle ohne anti-ScCst6 und ScSch9-His zeigte sich, dass weder ScCst6 noch ScSch9 detektiert werden konnten, wenn keine Antikörper zur Immunpräzipitation hinzugegeben wurden. Auch die Zugabe von ScSch9-His ohne vorherige Bindung von ScCst6 zeigte keine Signale. Dadurch ist eine unspezifische Bindung beider Proteine an die stationäre Phase ausgeschlossen. Eine Bindung von ScSch9 wurde nur detektiert, wenn ScCst6 vorher mithilfe spezifischer Antikörper gebunden wurde. Dies erhärtet die Hypothese, dass ScSch9 ScCst6 als zu phosphorylierendes Substrat bindet.

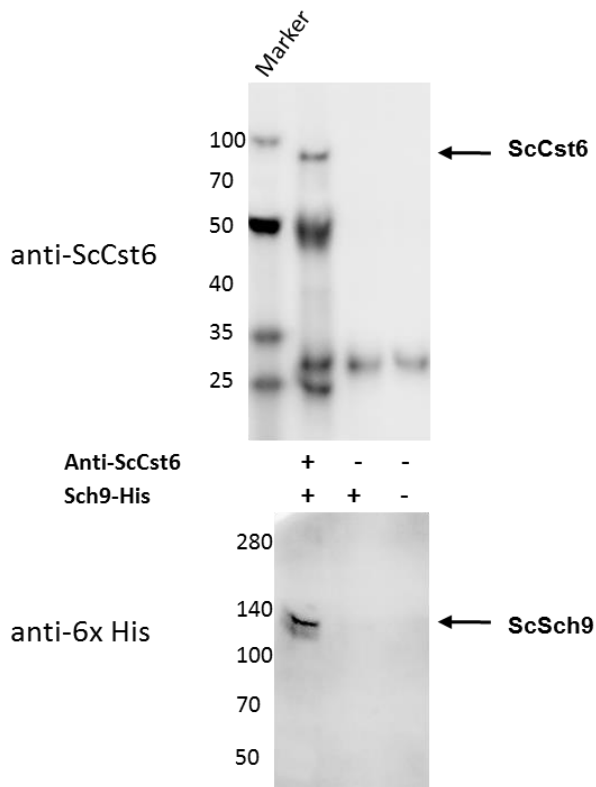


Abb. 16 Nachweis der ScCst6 – ScSch9 – Interaktion durch Immunpräzipitation

Endogenes ScCst6 wurde durch Immunpräzipitation mittels anti-ScCst6 Antikörpern aus *S. cerevisiae* WT Lysat aufgereinigt. Anschließend wurden die Immunkomplexe mit aufgereinigtem ScSch9-His inkubiert. ScSch9 wurde nur dann im Western Blot detektiert, wenn ScCst6 bereits gebunden war. Zur Detektion von endogenem, präzipitiertem ScCst6 wurde Kaninchen anti-ScCst6 (1:1000), abgesättigt mit 6x His-Peptid genutzt. Als Sekundärantikörper wurde Ziege anti-Kaninchen DyLight 649 (1:2000, Jackson ImmunoResearch) verwendet. Für den Nachweis von gebundenem ScSch9 wurde FITC-markierter Maus anti-6x His (1:250, MA1-81891, Thermo Fisher Scientific) eingesetzt.

3.4.2. ScSch9 phosphoryliert ScCst6

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ScSch9 an ScCst6 bindet, sollte im Folgenden untersucht werden, ob ScCst6 ein Substrat der Kinase ScSch9 ist. Zu diesem Zweck wurde ScSCH9 in *S. cerevisiae* überexprimiert. Eine Überexpression im Zielorganismus *S. cerevisiae* war notwendig, da ScSch9 für Phosphorylierungsstudien als aktive Kinase, das heißt mit den entsprechenden aktivierenden Phosphorylierungen, vorliegen musste. *S. cerevisiae* WT wurde mit dem Plasmid pRS316-promScGAL1-ScSch9-His, welches ScSCH9 unter Kontrolle des GAL1 Promoters enthielt, transformiert. Um eine ausreichende Induktionszeit zu bestimmen, wurden die Kulturen bis zu 24 h in YPD + 2% Galaktose inkubiert, anschließend aufgeschlossen und mittels Western Blot auf

Überexpression von ScSch9 untersucht (Abb. 17). Bereits nach 2-stündiger Induktion wurde überexprimiertes ScSch9-His nachgewiesen. Mit längerer Inkubationszeit stieg die Expression weiter an. Für alle weiteren Experimente wurde eine Induktionszeit von 6 h genutzt, da sie eine ausreichende Überexpression garantierte.

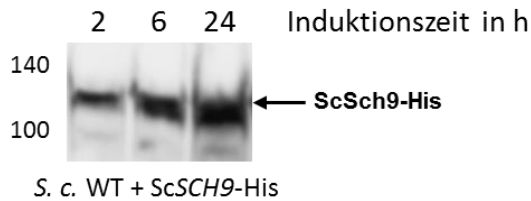


Abb. 17 ScSCH9 Überexpression in *S. cerevisiae* WT

Die Überexpression von ScSch9-His in 5% CO₂ wurde auf Protein-Ebene mittels Western Blot analysiert. Als Induktionszeiten wurden 2, 6 und 24 h gewählt. Je länger induziert wurde, desto stärker war die Bande für ScSch9-His. Als Primärantikörper wurde anti-6x His (1:1000, GTX115045, GeneTex), als Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen DyLight 649 (1:2000, Jackson ImmunoResearch) verwendet.

In der Annahme, dass die Aktivierung von ScSch9 unter 5% CO₂ maximal ist, erfolgte die Kultivierung von ScSCH9-überexprimierenden Kulturen unter dieser Bedingung. Die Aufreinigung erfolgte mittels Immunpräzipitation mit anti-6x His Antikörpern. Als Substrat für die Phosphorylierungsreaktion wurde aufgereinigtes ScCst6-His genutzt. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von radioaktiv markiertem ATP ([γ -³²P]-ATP) gestartet. Nach 30 min wurde die Reaktion gestoppt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Autoradiographie wurde inkorporiertes [γ -³²P]-ATP detektiert (Abb. 18). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe der Kinase ScSch9, in dem keine eindeutige Bande detektiert werden konnte. Es zeigte sich lediglich ein starker Hintergrund aufgrund nicht inkorporierter Radioaktivität. Wurde ScSch9 dem Ansatz zugegeben, war eine klare Bande für ScCst6 zu sehen, was eine Phosphorylierung von ScCst6 durch ScSch9 *in vitro* beweist. Zudem wurde eine Bande von ~120 kDa detektiert, die ScSch9 selbst zugeordnet werden konnte und eine Autophosphorylierung der Kinase zeigt.

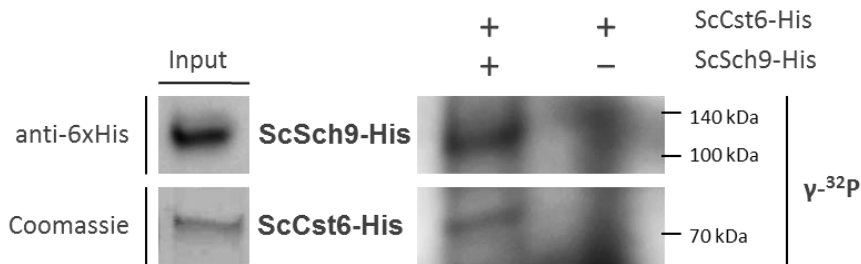


Abb. 18 ScSch9 phosphoryliert ScCst6 *in vitro*

Für *in vitro* Phosphorylierungsassays wurde überexprimiertes ScSch9-His mittels Immunpräzipitation aus *S. cerevisiae* unter 5% CO₂ aufgereinigt. Anschließend wurde mit rekombinantem ScCst6-His und [γ -³²P]-ATP inkubiert. Der Einbau von γ -³²P wurde durch Autoradiographie detektiert. Eine deutliche Bande für radioaktiv markiertes ScCst6-His wies auf eine Phosphorylierung von ScCst6 durch ScSch9 hin.

3.5. Identifizierung möglicher Phosphorylierungsstellen von ScCst6 mittels LC-MS/MS

3.5.1. *S. cerevisiae* WT Cst6 ist stark phosphoryliert

Die Regulation der Carboanhydrase-Expression in Hefen scheint konserviert zu sein, denn *S. cerevisiae* Cst6 ist ortholog zu Rca1 in *C. albicans* und *C. glabrata* (Cottier et al, 2013; Cottier et al, 2012). Zudem weisen alle 3 Proteine ausgeprägte konservierte Bereiche auf, innerhalb derer 3 potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden. In *S. cerevisiae* entsprechen diese S266, S268 und S440. Vorarbeiten von Cottier *et al.* für *C. albicans* Rca1 lieferten bereits Hinweise darauf, dass S124 (entspricht S266 in *S. cerevisiae* Cst6) eine potentielle Phosphorylierungsstelle darstellen könnte. Ein Austausch des Serins mit Glycin, was einer kompletten Dephosphorylierung entspricht, hob die Hochregulation der Carboanhydrase-Expression in *C. albicans* unter Luftbedingungen auf (Cottier et al, 2012). Um diese Stelle, aber auch weitere potentielle Regulationsstellen in ScCst6 auf Phosphorylierung zu überprüfen, wurde ScCST6 in *S. cerevisiae* WT unter Kontrolle des *GAL1* Promoters überexprimiert. Dies wurde zunächst auf Proteinebene überprüft (Abb. 19). Auch hier wurde eine Induktionszeit von 6 h gewählt.

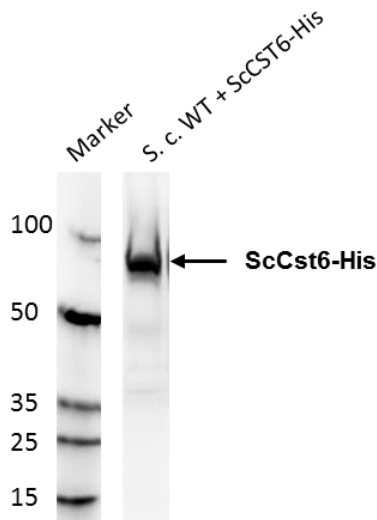


Abb. 19 Nachweis der Überexpression von ScCST6 in *S. cerevisiae* WT mithilfe des *GAL1* Promoters

Die Überexpression von ScCST6 in *S. cerevisiae* WT unter Kontrolle des *GAL1* Promoters wurde durch Zugabe von 2% Galaktose induziert. Nach 6 h Induktion wurde eine Probe genommen, um die Überexpression auf Proteinebene mithilfe eines Western Blots zu überprüfen. Als Primärantikörper wurde anti-6x His (1:1000, GTX115045, GeneTex), als Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen DyLight 649 (1:2000, Jackson ImmunoResearch) verwendet. Marker: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder

Die ScCST6-überexprimierenden Kulturen wurden entweder 6 h in 5% CO₂ oder 5 h in 5% CO₂ und anschließend 1 h in Luft kultiviert, um CO₂-abhängige Phosphorylierungsunterschiede mittels LC-MS/MS zu detektieren. Dies erfolgte in enger Kooperation mit Dr. Thomas Krüger und Dr. Olaf Kniemeyer der Abteilung Molekulare und Angewandte Mikrobiologie des Leibniz-Instituts für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie - HKI Jena. ScCST6-His wurde mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Gel mit Trypsin-LysC, AspN, GluC oder LysargiNase verdaut, um einen größtmöglichen Sequenzbereich abzudecken. Zudem wurde ein in-Lösungs-Verdau mit GluC und Trypsin-LysC durchgeführt, um auch Peptide umfangreicherer Länge zu detektieren. Die massenspektrometrische Messung und Auswertung wurde von Dr. Thomas Krüger durchgeführt. Voraussetzung für das Einbeziehen von Phosphorylierungsstellen war eine mit der Software phosphoRS 3.1 PD kalkulierte Phosphorylierungswahrscheinlichkeit von >99% sowie die Detektion in mindestens 2 unabhängigen Experimenten.

Insgesamt wurden im WT 19 unterschiedliche Phosphorylierungsstellen detektiert (Abb. 20). Von diesen wurden 11 bereits in Hochdurchsatz-Experimenten identifiziert (Albuquerque et al, 2008; Swaney et al, 2013) und 8 waren bisher unbekannt als potentielle Phosphorylierungsstellen (Abb. 20, fett markiert). Von den 3 konservierten Serinresten (Abb. 20, unterstrichen) wurde einzig S266 phosphoryliert detektiert (Abb. 20, schwarz umrandet), S268 und S440 dagegen nicht. Interessanterweise entspricht S266 als einzige Stelle innerhalb der ScCst6-Sequenz dem Sch9-Erkennungsmotiv R-(R/K)-X-S (Kennelly & Krebs, 1991). Beim Vergleich des ScCst6-Phosphorylierungsmusters in 5% CO₂ und Luft zeigte sich kein eindeutiger Unterschied. Dies könnte auf die Überexpression von ScCst6 im experimentellen Ansatz zurückzuführen sein, wodurch das endogene Phosphorylierungsmuster überlagert werden könnte. Allerdings ist eine Überexpression unerlässlich für die Detektion und besonders die Analyse möglichst großer Sequenzbereiche.

| Ergebnisse

1 MFTGQEYHSV DSNSNKQKDN NKRGIIDTSK ILNNKIPHSV **S**DTSA AATT
P

51 STMNNSALSRLDPTDINYS TNMAGVVDQI HDYTTSNRNS **S** LTPQYSIAAG
P P

101 NVNSHDRVVK PSANSNYQQA AYLRQQQQQD QQQ**S**PSMKT EEESQLYGDI
P

151 LMNSGVVQDM HQNLATHTNL SQLSSTRK**S**A PNDSTTAPT N ASNIANTA**S**V
P P

201 NKQMYFMNMN MNNNPHALND PSILETLSPF FQPFQVDVAH LPMTNPPIFQ

251 SSLPGCDEPI RRRRIS**S**ISNG QISQLGEDIE TLENLHNTQP PPMPNFHYN
P

301 GLSQTRNV**S**N KPVFNQAVPV SSIPQYNAKK VINPTKDSAL GDQ**S**VIYSKS
P P

351 QQRNFVNAPS KNTPAESI**S**D LEGMTTFAPT TGGENRGKSA LRE**S**HSNP**S**F
P P P

401 **T**PKSQGS**H**LN LAANTQGN**P**I PGTTAWKRAR LLERNRIAAS KCRQRKKVAQ
P P

451 LQLQKEFNEI KDENRILLKK LNYYEKLIK FKKFSKIHLR EHEKLNKDS

501 NNVNGTNSSN KNESMTVDSL KIIEELLMID SDVTEVDKDT GKIIAIKHEP

551 Y**S**QRFG**S**DT**D** DDDIDLKPVE GGKDPDNQ**S**L PN**S**SEKIK
P P P P P

Abb. 20 Vergleich der ScCst6 Phosphorylierungsstellen in *S. cerevisiae* WT und $\Delta sch9$

Mittels LC-MS/MS Analyse wurden phosphorylierte Reste in *S. cerevisiae* WT und $\Delta sch9$ detektiert. Zwischen der Kultivierung in 5% CO₂ und Luft zeigten sich keine Unterschiede. Im WT waren 19 Serin- und Threoninreste phosphoryliert (P), davon waren 11 bereits bekannt, 8 wurden neu identifiziert (fett markiert). Von den 3 konservierten Serinresten (unterstrichen), wurde nur S266 phosphoryliert detektiert (schwarzer Rahmen). Der Vergleich mit $\Delta sch9$ zeigte, dass die Mehrzahl der Phosphorylierungen auch in der Kinase-Mutante zu finden waren, ebenfalls unabhängig von den CO₂-Bedingungen. Lediglich S199 und S344 wurden nicht phosphoryliert detektiert (gepunkteter Rahmen), allerdings befinden sich diese nicht in hochkonservierten Regionen des Proteins (gepunktet unterstrichen).

3.5.2. Vergleich der Cst6-Phosphorylierungsmuster von *S. cerevisiae* $\Delta sch9$ und WT zeigt keine eindeutigen Unterschiede

Um Unterschiede im ScCst6-Phosphorylierungsmuster der Kinase-Mutante zu überprüfen, wurde das Phosphorylierungsmuster von Cst6 in *S. cerevisiae* $\Delta sch9$ mit dem im WT verglichen. Zu diesem Zweck wurde ScCST6 auch in $\Delta sch9$ überexprimiert (Abb. 21).

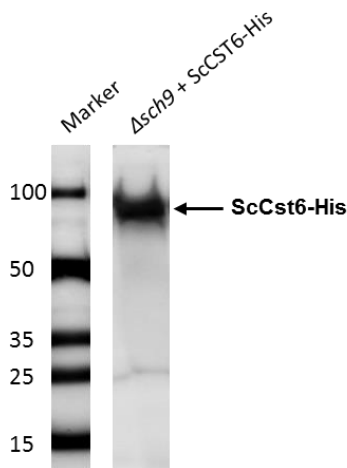


Abb. 21 Nachweis der Überexpression von ScCST6 in *S. cerevisiae* $\Delta sch9$

ScCST6 wurde in *S. cerevisiae* $\Delta sch9$ unter Kontrolle des *GAL1* Promoters überexprimiert. Dies wurde auf Proteinebene mithilfe eines Western Blots mit anti-6x His (1:1000, GTX115045, GeneTex) überprüft. Als Sekundärantikörper wurde Ziege anti-Kaninchen DyLight 649 (1:2000, Jackson ImmunoResearch) verwendet.

Die Kulturen wurden ebenso wie der WT kontinuierlich in 5% CO₂ kultiviert oder für 1 h zu Luft umgesetzt. Der Verdau erfolgte anhand vorheriger Ergebnisse im WT mit Trypsin-LysC oder AspN im Gel. Allerdings zeigten sich auch hier keine Unterschiede in der Phosphorylierung einzelner Aminosäuren bei Kultivierung in 5% CO₂ und Luft. Zudem wurden, bis auf S199 und S344, alle Phosphorylierungen, die im WT gefunden wurden, auch in $\Delta sch9$ detektiert, darunter auch Serin an Position 266 (Abb. 20, schwarzer Rahmen). Die Serinreste S199 und S344 (Abb. 20, gepunkteter Rahmen) liegen jedoch nicht in hochkonservierten Bereichen des Proteins (Abb. 20, gepunktet unterstrichen). Zudem zeigen beide keine Erkennungssequenz für ScSch9. Die hohe Anzahl detektierter Phosphorylierungsstellen legt eine Beteiligung weiterer Kinasen nahe, wenngleich mit der hier angewendeten Methode keine Rückschlüsse auf die Quantität oder biologische Relevanz einzelner Phosphorylierungen gezogen werden können.

3.5.3. Cst6-Phosphorylierung an S266 ist entscheidend für die ScNCE103^{CO2} Regulation

S266 schien anhand vorheriger Ergebnisse als mögliche Regulationsstelle in Cst6 in Betracht zu kommen. Jedoch konnte diese anhand der LC-MS/MS Daten nicht als Sch9-Phosphorylierungsstelle identifiziert werden, da phosphoryliertes S266 auch bei Deletion von *SCH9* detektiert wurde. Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurde untersucht, wie eine Phosphorylierung von Cst6 an der Position S266 die ScNCE103 Regulation beeinflusst. Hierfür wurde S266 einerseits zu Alanin (A) mutiert, um, unabhängig von den vorliegenden CO₂-Bedingungen, einen unphosphorylierten Status von Cst6 zu simulieren. Andererseits wurde S266 mit Asparaginsäure (D) ausgetauscht, um ein dauerhaft phosphoryliertes Stadium nachzuahmen. Die mutierten *CST6*-Sequenzen wurden von GeneTex bezogen und unter Kontrolle des *CST6*-Promoters in den Hefvektor pRS316 kloniert. Die Mutante $\Delta cst6$ wurde mit diesen Konstrukten sowie WT *CST6* transformiert. Anschließend wurde der Einfluss auf die ScNCE103 Expression untersucht.

Die Integration von WT *CST6* in $\Delta cst6$ stellte das ScNCE103 Regulationsmuster des WT wieder her und unterschied sich klar von dem der $\Delta cst6$ Mutante (Abb. 22, Vergleich mit Abb. 7). Eine phosphoablative Mutation von Cst6 ($\Delta cst6 + CST6^{S266A}$) führte im Vergleich zu einer signifikanten Hochregulation von ScNCE103^{CO2} ($2,73 \pm 0,43$), während ScNCE103^{Luft} konstant blieb. Dies ist vergleichbar mit dem Regulationsmuster von $\Delta sch9$ (Abb. 7). Genau wie die Deletion von *SCH9* führt auch eine nicht mehr phosphorylierbare Regulationsstelle in Cst6 zu einer Aufhebung der ScNCE103 Hemmung in 5% CO₂. Folglich scheint eine Sch9-abhängige Phosphorylierung von ScCst6 an S266 tatsächlich entscheidend für die Hemmung der ScNCE103 Expression in 5% CO₂ zu sein.

Anhand der aufgestellten Hypothese sollte dauerhaft phosphoryliertes Cst6 die Hochregulation von ScNCE103 in Luft hemmen. Die Cst6-Mutation S266D, welche eine Phosphorylierung nachahmt, zeigte zwar leicht verminderte ScNCE103^{Luft} Expression im Vergleich zu $\Delta cst6 + CST6$, jedoch war diese Veränderung nicht signifikant (Abb. 22).

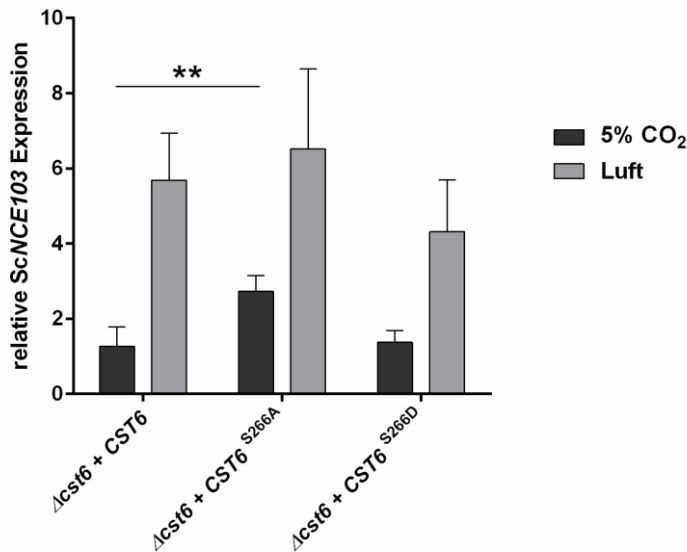


Abb. 22 Phosphoablative Mutation von Cst6 an Position S266 beeinflusst ScNCE103^{CO₂} Regulation

WT *CST6* sowie *CST6* mit Mutation von S266 zu Alanin (*CST6*^{S266A}) oder Asparaginsäure (*CST6*^{S266D}) wurde in *S. cerevisiae* Δ *cst6* unter Kontrolle des *CST6* Promoters exprimiert. Anschließend wurde die *ScNCE103* Expression bestimmt und auf *S. cerevisiae* WT normalisiert. Die Revertante (Δ *cst6* + *CST6*) zeigte ein unauffälliges Regulationsmuster, das dem des WT gleich. Durch Mutation von S266 zu A kam es zu einer signifikanten Hochregulation von *ScNCE103*^{CO₂}. Dieses Regulationsmuster glich dem von Δ *sch9*. Die Mutation S266D zeigte keine Änderungen zum WT. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz (bestimmt mit Students t-Test, zweiseitig, ungepaart) gegenüber Δ *cst6* + *CST6* wurde definiert als ** $p < 0,01$.

3.6. Die Funktion von Sch9 in der Carboanhydrase-Regulation ist konserviert in *C. albicans* und *C. glabrata*

Die bisherigen Ergebnisse in *S. cerevisiae* sowie Vorarbeiten anderer Gruppen legen eine Konservierung der CO₂-Regulation durch Cst6/Rca1 in Hefen nahe (Cottier et al, 2013; Cottier et al, 2012). Daher wurde der Einfluss von Sch9 auf die Carboanhydrase-Expression in *C. glabrata* als nächstem Verwandten von *S. cerevisiae* sowie in *C. albicans*, dem häufigsten Erreger systemischer Pilzkrankungen, untersucht und mit den gewonnenen Ergebnissen in *S. cerevisiae* verglichen.

3.6.1. Deletion von *SCH9* erhöht die *NCE103* Expression in *C. glabrata*

Um einen Einfluss von Sch9 auf die Carboanhydrase-Regulation in *C. glabrata* zu überprüfen, wurde *SCH9* in *C. glabrata* deletiert und die *CgNCE103* Expression bestimmt. Die Herstellung der Δ *sch9*

Mutante erfolgte im Stammhintergrund AFG1, da dieser eine erhöhte Transformationseffizienz aufwies (Cen et al, 2015). Folglich wurde auch dieser Stamm als Referenzstamm für die qRT-PCR genutzt. Die *CgNCE103* Expression des Referenzstamms AFG1 sowie von $\Delta rca1$ und $\Delta sch9$ wurde in 5% CO₂ und nach 1 h in Luft bestimmt.

AFG1 wies eine 2-fache Erhöhung der *CgNCE103*^{Luft} Expression verglichen mit *CgNCE103*^{CO₂} auf (Abb. 23A). Diese CO₂-abhängige Hochregulation war in $\Delta rca1$ nicht vorhanden. $\Delta sch9$ zeigte, wie vermutet, eine signifikant höhere *CgNCE103*^{CO₂} Expression ($2,02 \pm 0,43$) als der Referenzstamm AFG1. Im Gegensatz zum Regulationsmuster in *S. cerevisiae* war in *C. glabrata* $\Delta sch9$ auch die *CgNCE103*^{Luft} Expression signifikant erhöht (Abb. 23A). Trotz dieses Unterschieds beweist das Regulationsmuster von $\Delta sch9$ den Einfluss der Kinase auf die Carboanhydrase-Expression in *C. glabrata*.

3.6.2. Deletion von *SCH9* erhöht die *NCE103* Expression in *C. albicans*

Eine *C. albicans* $\Delta sch9$ Mutante zur Analyse des Einflusses auf die Carboanhydrase-Expression wurde von Joachim Ernst zur Verfügung gestellt (Stichernoth et al, 2011). Die Bestimmung der *CaNCE103* Expression in *C. albicans* erfolgte analog zu *S. cerevisiae* und *C. glabrata*. *C. albicans* WT wies einen 4,6-fachen Anstieg der *NCE103* Expression auf, wenn die Zellen in Luft kultiviert wurden (Abb. 23B). Eine Deletion von *CaRCA1* dagegen führte zu einer signifikant geringeren *CaNCE103*^{Luft} Expression. $\Delta sch9$ zeigte signifikant erhöhte *CaNCE103*^{CO₂} Level im Vergleich zum WT ($2,61 \pm 0,16$), was mit dem Regulationsmuster von *S. cerevisiae* und *C. glabrata* $\Delta sch9$ übereinstimmt (Abb. 23B). Auffällig war die signifikante Erhöhung der *CaNCE103*^{Luft} Expression in $\Delta sch9$, ein Effekt der auch in *C. glabrata* beobachtet wurde, jedoch nicht in *S. cerevisiae*. Trotz dieses Unterschieds und der Abweichungen in der Höhe der *NCE103* Expression zeigen diese Ergebnisse, dass die Funktion von *SCH9* als Regulator der *NCE103* Expression sowohl in *C. glabrata* als auch in *C. albicans* konserviert ist.

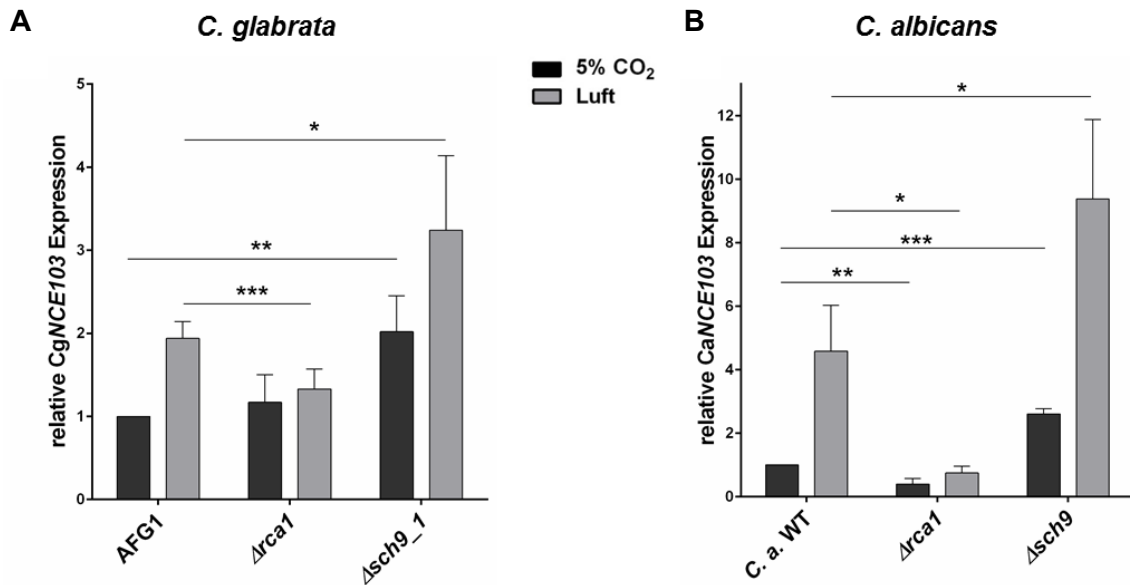


Abb. 23 Die Funktion von Sch9 ist konserviert in pathogenen Hefen

C. glabrata (A) und *C. albicans* (B) Stämme wurden unter verschiedenen CO₂-Bedingungen kultiviert und die *NCE103* Expression mittels qRT-PCR gemessen. Die Expression von *CgNCE103* wurde normalisiert auf die des Kontrollstamms (AFG1), die Expression von *CaNCE103* auf *C. albicans* WT unter 5% CO₂. Beide Spezies zeigten vergleichbare Regulationsmuster: Eine Deletion von *RCA1* führte zu signifikant verminderter *NCE103*^{Luft} Expression. *SCH9* Deletionsmutanten hingegen zeigten eine signifikant erhöhte *NCE103*^{CO₂} Expression, übereinstimmend mit den Ergebnissen in *S. cerevisiae*. Daher wird eine Konservierung der Funktion von Sch9 in Hefen angenommen.

Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von ≥ 4 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz (bestimmt mit Students t-Test, zweiseitig, ungepaart) gegenüber der Kontrolleexpression (AFG1 bzw. *C. a.* WT) unter der jeweiligen Bedingung wurde definiert als * p≤0,05 ** p≤0,01 und ***p≤0,001.

3.7. Sch9-Aktivierung durch Pkh1/2 ist entscheidend für die ScNCE103 Regulation

ScSch9 ist Bestandteil einer Kinasekaskade und wird seinerseits durch Phosphorylierung aktiviert. Die wichtigsten ScSch9-übergeordneten Regulatoren sind TORC1 (Target of rapamycin complex 1), welches durch das vorhandene Nährstoffangebot reguliert wird (Urban et al, 2007; Wullschleger et al, 2006), und Pkh1/2, einem Homolog zur säugetierspezifischen 3-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase (PK1), das von Phytosphingosin aktiviert wird (Liu et al, 2005). Zudem ist eine Phosphorylierung durch Snf1, einer konservierten Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK), beschrieben (Lu et al, 2011). Diese Art der Aktivierung von Sch9 ist wiederum abhängig von der replikativen Alterung (Lu et al, 2011). Welcher der drei Aktivatoren jedoch für die Sch9-

vermittelte *NCE103* Regulation von Bedeutung ist, ist unklar und sollte im Folgenden untersucht werden.

Die Analyse der LC-MS/MS Daten erlaubte Rückschlüsse auf die Phosphorylierungsstellen von endogenem ScSch9 *in vivo* und damit auf mögliche Aktivatoren von Sch9 (Abb. 24A). ScPkh1/2 aktiviert ScSch9 durch Phosphorylierung der PDK1-Stelle T570 innerhalb der Aktivierungsschleife (Voordeckers et al, 2011). Diese Aminosäure wurde mittels LC-MS/MS phosphoryliert unter 5% CO₂ detektiert, was einen Einfluss von Pkh1/2 in der CO₂-Anpassung nahelegt. TORC1 phosphoryliert ScSch9 an mindestens 6 verschiedenen C-terminalen Resten (S711, T723, S726, T737, S758, S765) innerhalb eines hydrophoben Motivs (Urban et al, 2007). 3 dieser Phosphorylierungsstellen wurden unter 5% CO₂ phosphoryliert detektiert, was auch einen Einfluss von TORC1 auf die CO₂-Adaptation vermuten lässt. Snf1-abhängige Phosphorylierungsstellen in ScSch9 sind nicht identifiziert. Daher waren keine Aussagen bezüglich einer Beteiligung von Snf1 möglich.

Sollten die Sch9-Regulatoren Pkh1/2, TORC1 oder Snf1 tatsächlich die CO₂-Rezeption beeinflussen, so müsste deren Inhibierung ähnliche Effekte auf die Sc*NCE103* Expression zeigen wie die Deletion von *SCH9*. Da anhand bisheriger Ergebnisse eine Aktivierung von Sch9 insbesondere in 5% CO₂, nicht aber in Luft Auswirkungen auf Sc*NCE103* hat, stand im folgenden Experiment die Sc*NCE103*^{CO₂} Expression im Vordergrund. Eine Deletionsmutante von *TOR1* wurde bereits im initialen qRT-PCR Screening untersucht, wobei sich zwar eine leichte, jedoch nicht signifikante Hochregulation der Carboanhydrase-Expression in 5% CO₂ zeigte (Abb. 24B). Als katalytische Untereinheit von TORC1 kann einerseits Tor1 fungieren, aber auch Tor2, welches in *S. cerevisiae* allerdings essentiell ist. Eine Hemmung von TORC1 ist durch Zugabe von Rapamycin möglich (Loewith et al, 2002), wodurch sich die Möglichkeit ergab, dessen Einfluss auf Sc*NCE103* zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die Hemmung von TORC1 durch Rapamycin den Effekt von $\Delta tor1$ auf die Expression der Carboanhydrase verstärkte und zu einer signifikanten Hochregulation von Sc*NCE103*^{CO₂} ($1,85 \pm 0,46$) führte (Abb. 24B). Allerdings war diese Hochregulation trotzdem deutlich geringer ausgeprägt als bei einer Deletion von *SCH9* ($3,55 \pm 1,55$). Die Mutante $\Delta snf1$ war hinsichtlich des Einflusses auf Sc*NCE103*^{CO₂}

unauffällig, da sie sich nicht vom WT unterschied. Auch Einzelmutanten von *PKH1/2* zeigten keinen Einfluss auf die Expression von *ScNCE103*^{CO₂} (Abb. 24B). Möglicherweise ist das auf eine Redundanz der Funktion von Pkh1 und Pkh2 zurückzuführen (Casamayor et al, 1999). Da eine $\Delta pkh1/2$ Doppelmutante nicht lebensfähig ist (Inagaki et al, 1999), wurde eine temperatursensitive Mutante (*pkh1^{ts} Δpkh2* (Inagaki et al, 1999)) genutzt, um den Einfluss von *PKH1/2* auf die Carboanhydrase-Regulation zu untersuchen. Interessanterweise führte eine gleichzeitige Deletion von *PKH1/2* zur signifikanten Erhöhung der *ScNCE103*^{CO₂} Expression ($1,93 \pm 0,32$), jedoch lag diese ebenfalls unter der von $\Delta sch9$. Folglich könnten sowohl TORC1 als auch Pkh1/2 oder aber ein Zusammenspiel beider für die CO₂-abhängige Aktivierung von Sch9 verantwortlich sein.

Da die Sch9-Phosphorylierungsstellen sowohl für TORC1 als auch für Pkh1/2 bekannt sind, ergab sich die Möglichkeit, genau diese Stellen durch Mutation von Serin/Threonin zu Alanin so zu verändern, dass eine Aktivierung von Sch9 durch den jeweiligen Regulator nicht mehr möglich ist. Dieser Ansatz hatte den Vorteil, dass unspezifische Effekte durch die Deletion oder Hemmung zentraler Regulatoren wie TORC1 ausgeschlossen werden können. Stattdessen sind einzig die durch fehlende Sch9-Aktivierung bedingten Auswirkungen auf die *ScNCE103* Expression messbar. Plasmide mit WT *SCH9*, *SCH9* mit mutierter Pkh1/2-Phosphorylierungsstelle (*SCH9*^{T570A}) und *SCH9* mit mutierten Pkh1/2- und TORC1-Phosphorylierungsstellen (*SCH9*^{T570A, 6A}) wurden von Prof. Robbie Loewith zur Verfügung gestellt (Urban et al, 2007). Ausgehend von der Sequenz *SCH9*^{T570A, 6A} wurde durch spezifische Mutagenese die Mutation T570A aufgehoben, wodurch *SCH9* mit Mutation aller 6 TORC1-Phosphorylierungsstellen (*SCH9*^{6A}) generiert wurde. Diese Plasmide wurden zur Transformation von $\Delta sch9$ genutzt, anschließend wurde die *ScNCE103* Expression analysiert und auf die des WT in 5% CO₂ normalisiert (Abb. 24C). Die Integration von *SCH9* in $\Delta sch9$ zeigte ein vergleichbares Regulationsmuster wie der WT. Eine phosphoablative Mutation aller 6 durch TORC1 phosphorylierten Stellen in *SCH9* ($\Delta sch9 + SCH9^{6A}) beeinflusste die Regulation von *NCE103* unter beiden Bedingungen nicht. Dagegen zeigte die Mutation der Pkh1/2-Stelle T570 eine signifikante Hochregulation der *ScNCE103*^{CO₂} Expression ($2,7 \pm 0,59$). Diese Hochregulation fiel nicht stärker aus,$

wenn zusätzlich alle 6 TORC1-Stellen mutiert waren. Folglich scheint die Aktivierung von Sch9 in 5% CO₂ und damit die CO₂-Adaptation vorrangig von Pkh1/2 abhängig zu sein. Zudem zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Sc*NCE103*^{Luft} Expression bei Mutation aller Sch9-Phosphorylierungsstellen. Auch bei alleiniger T570A Mutation von Sch9 war eine Hochregulation in Luft sichtbar, jedoch war diese nicht signifikant. Da *SCH9*^{6A} keinerlei Einfluss auf die Expression von *NCE103* zeigte, ist die signifikante Hochregulation in Luft wahrscheinlich nicht auf einen zusätzlichen Effekt durch die Mutation der 6 TORC1-Stellen zurückzuführen. Eine Phosphorylierung von Sch9 durch TORC1 wurde zwar mittels LC-MS/MS in 5% CO₂ detektiert, scheint aber für die generelle Aktivität von Sch9 eine untergeordnete Rolle zu spielen.

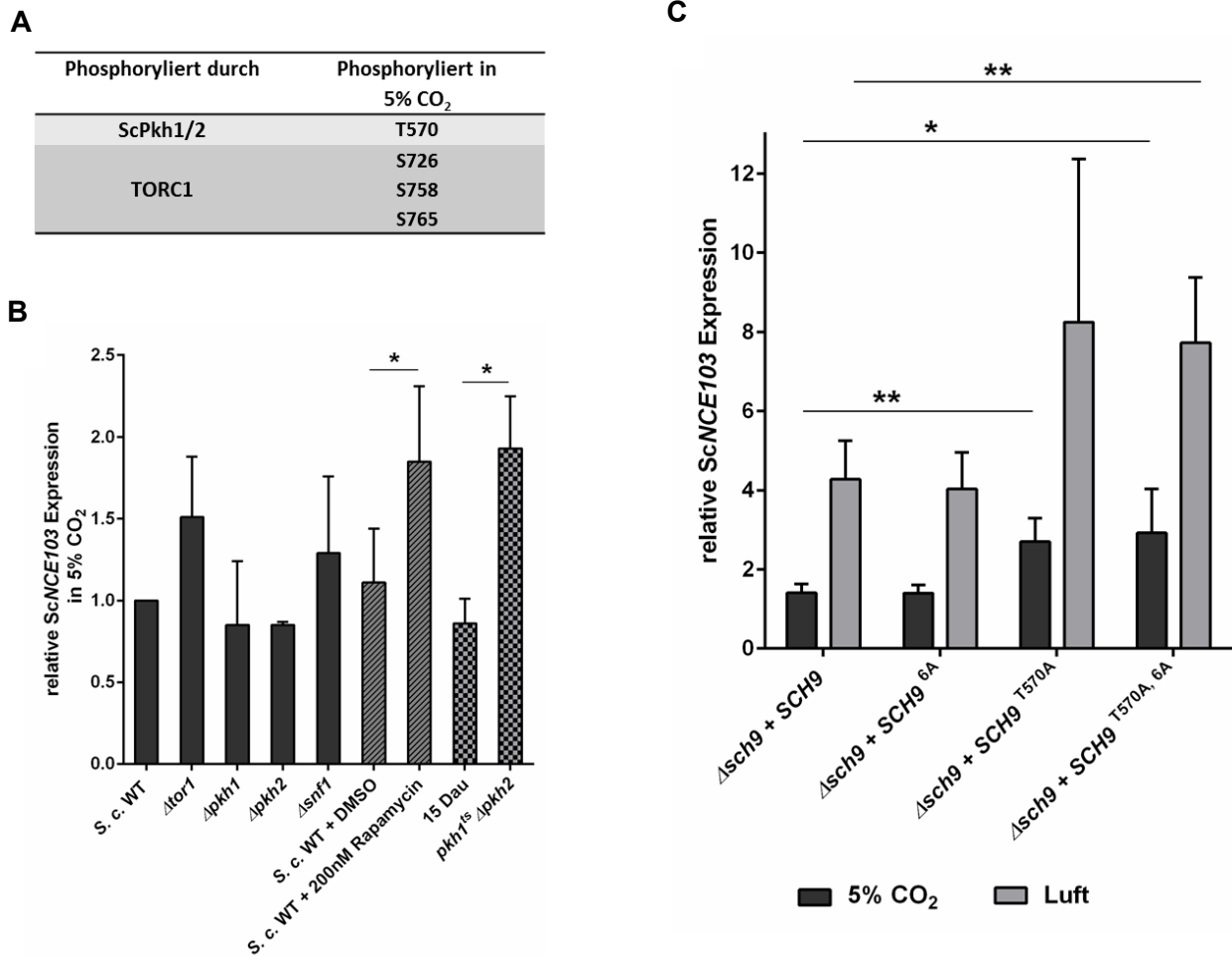


Abb. 24 Pkh1/2 vermittelt die CO₂-abhängige Aktivierung des ScSch9 – ScCst6 - Signalwegs

(A) Die Phosphorylierung von endogenem ScSch9 in 5% CO₂ wurde mittels LC-MS/MS detektiert. Dabei wurden Phosphorylierungen von mehreren Aminosäuren, die als Angriffsstellen für TORC1 und Pkh1/2 bekannt waren, registriert. Dies zeigt eine Aktivierung von ScSch9 in 5% CO₂ durch beide Aktivatoren, TORC1 und Pkh1/2.

(B) *S. cerevisiae* WT, behandelt mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder 200 nm Rapamycin, sowie Mutanten bekannter Sch9-Aktivatoren wurden auf ihren Einfluss auf die ScNCE103^{CO₂} Expression untersucht. Die ScNCE103 Expression wurde auf den WT in 5% CO₂ normalisiert. Einzelmutanten von TOR1, PKH1/2 und SNF1 hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von ScNCE103^{CO₂}. Die Inaktivierung von TORC1 durch Rapamycin dagegen führte zu einer Hochregulation von ScNCE103^{CO₂}. Ebenso zeigte sich bei gleichzeitiger Hemmung von PKH1 und Deletion von PKH2 (*pkh1^Δ Δpkh2*) eine statistisch signifikante Erhöhung von ScNCE103^{CO₂}. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von ≥ 3 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz (bestimmt mit Students t-Test, zweiseitig, ungepaart) bezüglich der jeweiligen Kontrolle (dargestellt in identischem Muster) wurde definiert als * p≤0,05.

(C) Die ScNCE103 Expression von Δ*sch9* + SCH9 sowie von SCH9 mit S/T zu A-Mutationen bekannter Aktivierungsstellen wurde in unterschiedlichen CO₂-Bedingungen bestimmt und auf den WT in 5% CO₂ normalisiert. Die Revertante (Δ*sch9* + SCH9) war hinsichtlich des ScNCE103 Regulationsmusters vergleichbar zum WT. Eine Mutation aller 6 TORC1-Stellen in SCH9 (Δ*sch9* + SCH9^{6A}) zeigte keinen Einfluss auf NCE103 unter beiden Bedingungen. Eine T570A Mutation der Pkh1/2-Phosphorylierungsstelle in SCH9 hingegen führte zu signifikanter Hochregulation von ScNCE103^{CO₂}. Die Kombination der Mutationen (Δ*sch9* + SCH9^{T570A, 6A}) hatte keinen zusätzlichen Effekt auf ScNCE103^{CO₂}. Die Balken zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von ≥ 5 unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz (bestimmt mit Students t-Test, zweiseitig, ungepaart) bezüglich Δ*sch9* + SCH9 wurde definiert als * p≤0,05 und ** p≤0.01.

4. Diskussion

Eine rasche Anpassung an sich ändernde CO₂-Bedingungen ist für alle Lebewesen von zentraler Bedeutung. Insbesondere Pilze, die sowohl die Umwelt als auch den menschlichen Körper besiedeln, müssen ihren Metabolismus an unterschiedliche CO₂-Konzentrationen anpassen, um in den unterschiedlichen ökologischen Nischen lebensfähig und kompetitiv zu sein. Zu hohe CO₂-Level in den Zellen können toxisch wirken und das Wachstum der Pilze hemmen (Jain & Agrawal, 1994). Zu niedrige CO₂-Level wiederum können durch Substratmangel zum Erliegen wichtiger Zellreaktionen, beispielsweise Carboxylierungen, führen (Aguilera et al, 2005b). Darüber hinaus beeinflusst CO₂ während der spontanen Umwandlung in HCO₃⁻ durch Bildung von Wasserstoffionen den intrazellulären pH-Wert und die Osmolarität, wodurch eine Vielzahl von Signalwegen, z. B. Ras/cAMP/PKA oder HOG (High-Osmolarity-Glycerol), beeinflusst werden (Giannattasio et al, 2013). Für die CO₂-Anpassung sind Carboanhydrasen, welche die reversible Umwandlung von CO₂ in HCO₃⁻ katalysieren, essentiell. Das wird darin deutlich, dass eine Deletion der Carboanhydrase bei vielen Bakterien- und Pilzarten (z. B. *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans*) in Luft letal ist (Bahn et al, 2005; Burghout et al, 2010; Cottier et al, 2012; Gotz et al, 1999; Langereis et al, 2013; Merlin et al, 2003). Einzig *Sordaria macrospora* ist in Luft trotz deletierter Carboanhydrase lebensfähig, allerdings mit drastisch reduziertem Wachstum (Lehneck et al, 2014).

4.1. Identifizierung von Sch9 als Cst6-spezifische Kinase mit Einfluss auf die NCE103 Regulation

Die Expression der Carboanhydrase *NCE103* wird durch den transkriptionellen Aktivator Cst6/Rca1 reguliert. Daten in *C. albicans* legen nahe, dass Cst6/Rca1 höchstwahrscheinlich durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung in seiner Aktivität moduliert wird (Cottier et al, 2012). Um die Enzyme zu identifizieren, die verantwortlich für diese posttranskriptionellen Modifikationen sind und dadurch die CO₂-Anpassung ermöglichen, wurde eine *S. cerevisiae* Bibliothek aus 111 Kinase-

und 44 Phosphatasemutanten untersucht (Tabelle 2). Damit beschränkte sich die Untersuchung zunächst auf nicht-essentielle Gene. Dies beinhaltet das Risiko, dass mögliche Kandidatengene aufgrund der beschränkten Mutantenverfügbarkeit übersehen werden könnten. Die Cst6/Rca1-spezifische Kinase ist jedoch zumindest in dieser Funktion voraussichtlich nicht notwendig für Wachstum und Überleben des Pilzes, da sie einen hemmenden Einfluss auf die Expression der Carboanhydrase hat. Allerdings könnte eine Essentialität der Kinase in anderen, für die Zelle lebenswichtigen Funktionen begründet sein. Trotz dieser Einschränkung wurde die Serin/Threonin-Proteinkinase Sch9 aufgrund des veränderten *NCE103* Regulationsmusters von $\Delta sch9$ als vielversprechender Kandidat für eine Phosphorylierung von Cst6 identifiziert.

4.1.1. Funktion von Sch9

Sch9 ist in den Hefespezies *S. cerevisiae*, *C. glabrata* und *C. albicans* in Funktion und Struktur weitgehend konserviert. In *S. cerevisiae* reguliert Sch9 Zellzahl und Zellgröße und die Deletionsmutante $\Delta sch9$ bildet kleinere Kolonien aus im Vergleich zum WT (Jorgensen et al, 2002; Jorgensen et al, 2004). Zudem beeinflusst Sch9 über Rim15 die Lebensdauer der Zellen als Reaktion auf Kalorienrestriktion und Nährstoffangebot (Fabrizio et al, 2001; Kaeberlein et al, 2005; Wei et al, 2008). Sch9 hat zudem einen weitreichenden Einfluss auf die Stressresistenz: Eine Deletion von *SCH9* beeinflusst die Resistenz gegenüber Hitze, osmotischem und oxidativem Stress, wenngleich Studien teilweise zu entgegengesetzten Ergebnissen hinsichtlich der Sensitivität kommen (Fabrizio et al, 2001; Morano & Thiele, 1999; Pascual-Ahuir & Proft, 2007; Qie et al, 2015; Weinberger et al, 2010). Weiterhin kontrolliert Sch9 die Translation durch Regulation der Ribosom-Biogenese (Huber et al, 2009; Huber et al, 2011; Jorgensen et al, 2004; Wei & Zheng, 2009). In *C. albicans* beeinflusst Sch9, analog zu *S. cerevisiae*, Wachstum und Stressresistenz (Liu et al, 2010). Zudem reguliert Sch9 in Abhängigkeit von O₂- und CO₂-Konzentrationen die Hyphenbildung von *C. albicans* (Stichternoth et al, 2011) sowie die Virulenz (Liu et al, 2010). Außerdem wurde eine Rolle von CaSch9 in der

Chromosomensegregation aufgrund einer Bindung in den Zentromerregionen angenommen, in *S. cerevisiae* ist dies jedoch nicht der Fall (Varshney et al, 2015).

Orthologe Gene zu *SCH9* finden sich auch in weit entfernt verwandten Pilzen wie *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* und *Trichoderma reesei* (Chen et al, 2014; Lv et al, 2015). Hier führt eine Deletion von Sch9 zu reduzierter Konidienbildung, vermindertem Wachstum und erhöhter Sensitivität gegenüber Stress. Dies beweist die starke Konservierung von Sch9 und weist auf eine Rolle als genereller Regulator in der Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen hin.

4.1.2. Regulation von Sch9

Sch9 zählt zur hochkonservierten Familie der AGC Kinasen, welche Teil einer Signalkaskade sind und wiederum selbst durch Phosphorylierung aktiviert werden. Der katalytische Kern wird von einem kleineren N-terminalen Teil, einer Ca^{2+} -Lipid-bindenden Domäne, und einem C-terminalen Teil, notwendig für Substratbindung und Katalyse, gebildet (Jacinto & Lorberg, 2008). Die Aktivierung von Sch9 erfolgt durch Phosphorylierung der Erkennungssequenz T*-F-C-G-T-X-E-Y (*Phosphorylierung) im T-Loop (Pearce et al, 2010), wodurch N- und C-terminaler Teil miteinander verbunden werden. Dies erfolgt durch die PDK1-Orthologen Pkh1 und Pkh2 an T570 (Voordeckers et al, 2011). Außerdem besitzt Sch9 ein C-terminales hydrophobes Motiv, welches, zusätzlich zu anderen C-terminalen Resten, durch TORC1 phosphoryliert wird und dadurch die Sch9-Aktivität moduliert (Urban et al, 2007).

Die Carboanhydrase, Sch9 und übergeordnete Aktivatoren sind über die Pilzgrenze hinweg konserviert. Sch9 wurde in Säugetieren aufgrund ähnlicher Funktionen zunächst mit PKB/Akt, unter anderem aktiviert durch PDK1, später mit S6K1, aktiviert durch mTOR, gleichgesetzt (Sobko, 2006; Urban et al, 2007). Im Gegensatz dazu sind jedoch keine orthologen Gene von Cst6/Rca1 in Säugetieren bekannt. Die humane, membranständige Carboanhydrase IX, welche Tumor-assoziiert

exprimiert ist, wird unter Hypoxie durch den Transkriptionsfaktor Hif-1 α hochreguliert (Wykoff et al, 2000). Hif-1 α wiederum wird durch mTORC1 und S6K1 reguliert (Dodd et al, 2015). Daher lag die Vermutung nahe, dass Sch9 in *S. cerevisiae* ebenfalls durch TORC1 aktiviert wird und so die Regulation der Carboanhydrase *NCE103* steuert. Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass eine Aktivierung von Sch9 durch TORC1 nicht notwendig für die Regulation von *NCE103* in 5% CO₂ ist. Zwar führte eine Hemmung von TORC1 durch Rapamycin zur Hochregulation von *NCE103*^{CO₂} (1,85 \pm 0,46), allerdings ist dieser Effekt nicht Sch9-abhängig, bewiesen durch spezifische Mutagenese der TORC1-Phosphorylierungsstellen. Stattdessen scheint Rapamycin anderweitig Einfluss auf die Genexpression zu nehmen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Rapamycin nicht in jedem Fall identische Effekte hervorruft wie die Hemmung von TORC1 (Thoreen & Sabatini, 2009). Die LC-MS/MS Ergebnisse zeigten, dass TORC1 Sch9 in 5% CO₂ phosphoryliert. Allerdings hat diese Phosphorylierung keinen unmittelbaren Einfluss auf die Sch9-vermittelte *NCE103* Regulation. Stattdessen wäre ein modulatorischer Effekt auf Sch9 durch TORC1 möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Sch9 durch Pkh1/2 für die CO₂-abhängige Regulation der Sch9-Cst6/Rca1 Signalkaskade unverzichtbar ist (Abb. 24). Eine temperatursensitive Δ *pkh1/2* Doppelmutante zeigte tatsächlich eine signifikante Erhöhung der *NCE103*^{CO₂} Expression (1,93 \pm 0,32) und damit eine verminderte Sch9-vermittelte Repression. Diese Erhöhung von *NCE103*^{CO₂} war deutlich geringer als bei Deletion von *SCH9* (3,55 \pm 1,55). Dies ist womöglich auf die Tatsache zurückzuführen, dass *PKH1* in der verwendeten Mutante nicht deletiert ist, sondern dessen Transkription bei Kultivierung in 37 °C gehemmt wird. So ist es möglich, dass trotz Inkubation in 37 °C noch immer geringe Mengen Pkh1 in der Zelle vorliegen und zu partieller Aktivierung von Sch9 führen. Bei kompletter Hemmung von Pkh1 und gleichzeitiger Deletion von Pkh2 kommt es jedoch zum Absterben der Zellen. Folglich setzte die Nutzung dieser temperatursensitiven Doppelmutante einen Kompromiss zwischen möglichst vollständigem Abbau von bereits synthetisiertem Pkh1 und ausreichendem Zellüberleben zur RNA-Isolation voraus. Durch

spezifische Mutagenese von Sch9 an T570 (T570A) wurde eindeutig bewiesen, dass eine Phosphorylierung an dieser Stelle essentiell ist für die Regulation der *NCE103* Expression in 5% CO₂. Ein zusätzlicher Einfluss von Snf1 auf die *NCE103* Expression kann nicht ausgeschlossen werden. Da unbekannt ist, an welcher Stelle Snf1 Sch9 phosphoryliert, ist eine spezifische Mutagenese wie bei TORC1 und Pkh1/2 ausgeschlossen. Die Testung von Dreifachmutanten könnte genaueren Aufschluss geben, allerdings ist fraglich ob die Zellen lebensfähig wären. Zudem sind alle bekannten Sch9-Aktivatoren an einer Vielzahl von Regulationsvorgängen beteiligt und greifen übergeordnet in Signalwege ein, wodurch direkte Effekte auf die CO₂-Anpassung kaum von unspezifischen Effekten der Mutanten abzugrenzen wären.

Sch9 könnte auch direkt durch CO₂ beeinflusst werden, ohne dass übergeordnete Regulatoren beteiligt sind. Bisher sind allerdings keine derartigen Funktionen von Sch9 bekannt. Auch O₂-Konzentrationen könnten die Aktivierung von Sch9 regulieren, denn Stichternoth *et al.* zeigten, dass Sch9 die Hyphenbildung in *C. albicans* nur unter hohen CO₂-Bedingungen (>1%) und Hypoxie (<10%) hemmt, nicht aber unter einer der beiden Bedingungen allein (Stichternoth et al, 2011). Folglich scheinen auch O₂-Konzentrationen kritisch für die Sch9-Aktivität zu sein. In dieser Arbeit wurde die O₂-Konzentration jedoch außen vor gelassen. So fanden alle Experimente unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen statt. Es wäre daher möglich, dass sich der CO₂-abhängige Einfluss von Sch9 auf die *NCE103* Regulation ändert, sobald zusätzlich hypoxische Bedingungen eintreten.

4.2. Bedeutung von weiteren auffälligen Kinasen mit Einfluss auf die Expression von *NCE103*

Neben Sch9 waren auch Deletionsmutanten anderer Kinasen auffällig in ihrem *NCE103* Regulationsmuster (Abb. 7). So zeigte $\Delta bud32$ eine starke Hochregulation der *NCE103* Expression, jedoch unabhängig von CO₂. Interessanterweise wurde *S. cerevisiae* Bud32 unabhängig von seiner Rolle im EKC/KEOPS Komplex bereits mit Sch9 in Verbindung gebracht. Bud32 wird an S258 durch Sch9 phosphoryliert und diese Phosphorylierung ermöglicht wiederum die Phosphorylierung des

Glutaredoxin-Proteins Grx4 durch Bud32 (Peggion et al, 2008). Inwiefern Bud32 und Sch9 auch hinsichtlich der CO₂-Anpassung interagieren, bleibt fraglich. Möglich wäre, dass Bud32 zwischen Sch9 und Cst6 geschaltet ist. Jedoch spricht dagegen, dass Sch9 zum einen in der Lage ist Cst6 direkt zu phosphorylieren und zum anderen die Erkennungssequenz für Sch9-vermittelte Phosphorylierung mit der Stelle übereinstimmt, welche bereits als wahrscheinlichste Regulationsstelle in Cst6 identifiziert wurde. Die Untersuchung der Beteiligung von Bud32 an der Regulation von *NCE103* wurde erschwert durch enorme Wachstumsdefekte von *Δbud32*, wodurch viele Experimente nicht durchführbar waren.

Neben *Δbud32* zeigte auch *Δtpd3* ein stark verändertes Regulationsmuster mit Hochregulation von *NCE103*^{CO₂}. Tpd3 ist, gemeinsam mit Cdc55, die strukturgebende Untereinheit des Protein-Phosphatase-2A-Komplexes, welcher durch *PPH21/22* codiert wird. Aufgrund einer Interaktion mit phosphoryliertem Tap42 wurde der Protein-Phosphatase-2A-Komplex mit der nährstoffabhängigen Signaltransduktion über TOR in Verbindung gebracht (Zabrocki et al, 2002). Darüber hinaus wird eine Dephosphorylierung von Sch9 durch Tpd3 diskutiert, da die Überexpression von *TPD3* und die Deletion von *SCH9* einen vergleichbaren Phänotyp aufweisen (Sugajska et al, 2001). Tpd3 könnte also durchaus eine Rolle in der Regulation von *NCE103* spielen, wenn auch nicht als Cst6-Kinase, dann doch zumindest als mögliche Phosphatase von Sch9.

4.3. Identifizierung von Cst6 S266 als entscheidende Phosphorylierungsstelle für die *NCE103* Regulation

Um wichtige Phosphorylierungsstellen mit Einfluss auf die Regulation von *NCE103* in Cst6 zu identifizieren, wurde der Unterschied des Cst6-Phosphorylierungsmusters zwischen 5% CO₂ und Luft zunächst mithilfe von Massenspektrometrie untersucht. Dafür wurde *CST6* in *S. cerevisiae* WT überexprimiert, um ausreichend Protein zur Detektion einzelner phosphorylierter Peptide zu garantieren. Beim Vergleich der detektierten Cst6-Phosphorylierungen in 5% CO₂ und Luft zeigten sich jedoch keine eindeutigen Unterschiede, obwohl eine Vielzahl von Phosphorylierungen detektiert

wurden (Abb. 20). Dies könnte einerseits auf die Experiment-bedingte Überexpression von *CST6* zurückzuführen sein, wodurch das endogene Phosphorylierungsmuster beeinträchtigt werden könnte. Im Fall einer *CST6*-Überexpression könnte trotz Luft-Bedingungen teilweise eine hemmend wirkende Phosphorylierung an spezifischen Regulationsstellen auftreten. Dies würde eine übermäßige *NCE103* Expression, hervorgerufen durch die *CST6* Überexpression, vermeiden. Andererseits könnten nicht detektierte Phosphorylierungsunterschiede auch im Messverfahren begründet sein, denn es können keine Aussagen zur Quantität von Phosphorylierungen getroffen werden. Einzig das Vorhandensein oder Fehlen eines Phosphatrestes wird detektiert, nicht aber die Häufigkeit der Phosphorylierung. Möglich wäre also auch, dass eine Carboanhydrase-Regulation über einen geringeren Anteil an spezifisch phosphoryliertem Cst6 erfolgt.

Als wahrscheinlichste Regulationsstelle in *S. cerevisiae* Cst6 galt initial S266: Gemeinsam mit 2 anderen potentiellen Phosphorylierungsstellen, S268 und S440, ist S266 in *C. albicans* und *C. glabrata* konserviert. S266 wurde mittels Massenspektrometrie als phosphoryliert detektiert, S268 und S440 dagegen nicht (Abb. 20). Zudem liegt S266 innerhalb der einzigen, in Cst6 vorhandenen Erkennungssequenz für Sch9-vermittelte Phosphorylierungen und wurde in *C. albicans* als notwendig für die CO₂-abhängige Herunterregulation der Carboanhydrase identifiziert (Cottier et al, 2012). So zeigte eine *C. albicans* S124A Mutante (*C. albicans* S124 entspricht S266 in *S. cerevisiae*) eine von CO₂ unabhängig erhöhte *NCE103* Expression. Dies war nicht der Fall bei phosphoablativer Mutation der beiden anderen konservierten Serinreste (Cottier et al, 2012). Durch Vergleich des Cst6-Phosphorylierungsmusters in *S. cerevisiae* WT und $\Delta sch9$ sollte S266 als regulatorische Phosphorylierungsstelle bestätigt werden. Jedoch zeigte sich auch in $\Delta sch9$ eine Phosphorylierung von S266. Stattdessen wurden S199 und S344 als phosphoryliert im WT, aber nicht phosphoryliert in $\Delta sch9$ detektiert. Beide Stellen waren im WT allerdings nur in 2 von 10 Messungen phosphoryliert detektierbar. Folglich scheinen beide keine hochfrequenten Phosphorylierungsstellen zu sein und es besteht die Möglichkeit, dass sie aufgrund ihrer Seltenheit im Auftreten in $\Delta sch9$ zufällig nicht detektiert wurden. Weder S199 noch S344 liegen innerhalb der genauen Erkennungssequenz R-(R/K)-

X-S für Sch9-vermittelte Phosphorylierungen. Selbst grundlegende Merkmale der Sch9-Erkennungssequenz, eine hydrophobe Aminosäure an Position +1 relativ zum phosphorylierten Rest und mehrere basische Aminosäuren an den Position -7 bis -2, werden nicht erfüllt. Zwar sind sowohl S199 als auch S344 von Valin, einer hydrophoben Aminosäure gefolgt, jedoch weisen beide keine basischen Aminosäuren auf den vorangehenden Positionen auf. Beide Stellen sind zudem in variablen Proteinregionen lokalisiert, was nicht zur Hypothese der konservierten Regulationsstelle in *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *C. glabrata* passt. Zusammengefasst scheinen S199 und S344 nicht als realistische Sch9-abhängige Regulationsstellen in Betracht zu kommen.

Um S266 in *S. cerevisiae* Cst6 zweifelsfrei als Sch9-Phosphorylierungsstelle mit Einfluss auf die *NCE103* Expression zu charakterisieren, wurden phosphoablative (S266A) und phosphomimetische (S266D) Mutationen hinsichtlich der Regulation von *NCE103* getestet. Tatsächlich zeigte sich für S266A eine Hochregulation von *NCE103*^{CO₂} (Abb. 22). Durch Verlust dieser Phosphorylierungsstelle kommt es nicht mehr zur vollständigen Repression der *NCE103* Expression in 5% CO₂, womit ein entscheidender Einfluss von S266 für die *NCE103* Regulation bewiesen wurde. S266 wurde entgegen den Erwartungen bei Deletion von *SCH9* phosphoryliert detektiert (Abb. 20). Das könnte in der gemeinsamen Erkennungssequenz R-(R/K)-X-S von Kinasen der AGC-Familie begründet sein. Bei Deletion von Sch9 könnte eine andere verwandte Kinase, möglicherweise PKA, Cst6 an S266 phosphorylieren, um eine überschießende *NCE103* Expression zu vermeiden. Vor allem im Hintergrund der *CST6*-Überexpression, welche die Hochregulation der *NCE103* Expression zusätzlich verstärken würde, wäre dieser Regulationsweg denkbar. Die hohe Anzahl detektierter Phosphatreste in Cst6 legt, neben Sch9, die Beteiligung weiterer Kinasen an der Cst6-Regulation nahe, obwohl anhand detektierter Phosphorylierungen keine Rückschlüsse auf deren biologische Bedeutung gezogen werden können.

4.4. Alternative Regulationsmechanismen von *NCE103*

Obwohl Sch9 als Cst6-spezifische Kinase identifiziert wurde, welche die Expression von *NCE103* CO₂-abhängig reguliert, bleiben Fragen hinsichtlich der Carboanhydrase-Regulation offen. Inwiefern die Sch9-vermittelte Phosphorylierung von Cst6/Rca1 die Induktion von *NCE103* im Detail hemmt, ist spekulativ. Aufgrund des Phosphatrestes könnte die Bindung von Cst6/Rca1 an den Promoter von *NCE103* sterisch behindert werden, wodurch die Initiation der RNA-Polymerase und damit die Transkription inhibiert werden. Zudem könnte eine Phosphorylierung von Cst6 die Bindung von Cofaktoren oder anderen Proteinkomplexen, die zur Induktion von *NCE103* nötig sind, stören und auf diesem Weg die Carboanhydrase-Expression vermindern. Jedoch sind bisher keinerlei Cofaktoren bekannt. Tatsächlich könnte aber auch schon der Cst6-Transport in den Zellkern durch die Phosphorylierung gehemmt werden. Cst6 scheint anhand von Vorhersagen basierend auf der Aminosäuresequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit im Zellkern lokalisiert zu sein (87%). Deutlich unwahrscheinlicher (13%) ist eine Lokalisation im Zytosol (<http://psort.hgc.jp/> (Horton et al, 2007)). Auch immunhistochemisch ist in der *Yeast GFP Fusion Localization Database* nur eine nukleare Lokalisation nachgewiesen (<http://yeastgfp.yeastgenome.org/> (Huh et al, 2003)). Dies würde einem durch Phosphorylierung verhinderten Transport von Cst6 in den Zellkern widersprechen, da dann auch zytosolisches Cst6 detektierbar sein müsste. Jedoch wurde auch gezeigt, dass Cst6 unter Einfluss von Hypoxie sehr rasch aus dem Zellkern in das Zytosol relokalisiert, bei Sauerstoff-Überfluss dagegen entsprechend schnell wieder zurück in den Nukleus gelangt (Dastidar et al, 2012). Dies könnte auch für die Anpassung an sich ändernde CO₂-Level der Fall sein. Zudem impliziert es, dass Cst6 auch Sauerstoff-abhängig reguliert wird und dadurch die Transkription von Zielgenen beeinflusst.

4.4.1. *Aca1* als weiterer Aktivator der *NCE103* Expression

Eine Deletion von *NCE103* wurde als letal unter Luftbedingungen beschrieben (Gotz et al, 1999), eine Deletion von *CST6* dagegen zeigt lediglich eine Wachstumsverzögerung in Luft. Obwohl anhand des

beschriebenen Modells (Abb. 3) ohne Cst6 keine Induktion von *NCE103* in Luft stattfinden dürfte, wurde für $\Delta cst6$ eine leicht erhöhte Expression von *NCE103*^{Luft} im initialen Screening detektiert, wenn auch deutlich geringer als im WT (Abb. 7). Dieser Unterschied der Expression von *NCE103*^{CO₂} ($0,97 \pm 0,2$) und *NCE103*^{Luft} ($2,7 \pm 1,65$) in $\Delta cst6$ war signifikant ($p=0,05$) und auch im Western Blot (Abb. 14) wurden erhöhte Proteinlevel in Luft detektiert. Folglich scheint es auch ohne Cst6 zu einer Induktion von *NCE103* zu kommen, wenngleich diese auch gering ausfällt. Dies erklärt, weshalb $\Delta cst6$ in Luft lebensfähig ist, $\Delta nce103$ jedoch nicht. Vermutlich gibt es neben Cst6 einen weiteren Aktivator von *NCE103*. In *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Cst6 entweder als Homodimer oder als Heterodimer gemeinsam mit dessen Paralog Aca1 am ATF/CREB-Motiv binden kann (Garcia-Gimeno & Struhl, 2000). Möglich wäre folglich, dass Aca1 im Falle einer Deletion von *CST6* allein am *NCE103* Promoter bindet und zumindest eine leichte Induktion zur Folge hat. Allerdings ist *ACA1* weder in *C. glabrata* noch in *C. albicans* zu finden, sondern spezifisch für *S. cerevisiae*.

4.4.2. HOG-Signalweg

Neben Cst6 und Aca1 gibt es in *S. cerevisiae* noch einen weiteren Transkriptionsfaktor der ATF/CREB-Familie, der Repressor Sko1. Sko1 wird bei osmotischem Stress durch die MAP Kinase Hog1 phosphoryliert, wodurch Sko1 vom Repressorkomplex dissoziiert und die Expression von Stressgenen nicht mehr unterdrückt (Proft et al, 2001; Rep et al, 2001). Sko1 und Cst6 teilen sich tatsächlich viele Zielgene, unter anderem *NCE103*, *ROX1* und *HSP12* (Liu et al, 2016). Für das gemeinsame Zielgen *GRE2* wurde beschrieben, dass es nur dann durch Cst6 und Aca1 reguliert wird, wenn Sko1 deletiert ist (Rep et al, 2001). Möglich wäre daher, dass Sko1 am *NCE103* Promoter bindet, wenn Cst6 nicht bereits vorher gebunden ist. Zudem wurde gezeigt, dass Sko1 und Cst6 identische Bindestellen ihrer Zielgene ansteuern (Liu et al, 2016), was die Hypothese des Konkurrierens um Bindestellen bekräftigt. Interessanterweise sind einige Kinasen und Phosphatasen, die zum HOG-Signalweg gehören, im initialen RT-PCR Screening mit einer vom WT abweichenden *NCE103* Regulation aufgefallen. Dazu gehören Pbs2, Ptc2 und Ssk22, deren Deletionsmutanten eine verringerte

Induktion der *NCE103*^{Luft} Expression zeigten, sowie *Ste20*, das bei Deletion die Expression von *NCE103*^{CO₂} erhöhte (Tabelle 15, Abb. 25A). Daher ist ein Einfluss des HOG-Signalweges auf die Carboanhydrase-Regulation denkbar. CO₂-Konzentration und Osmolarität stehen in engem Zusammenhang (Abb. 25B und C). Hohe extrazelluläre CO₂-Konzentrationen haben durch Diffusion auch hohe intrazelluläre CO₂-Konzentrationen zur Folge. CO₂ wird spontan in HCO₃⁻ und H⁺ umgewandelt. Letzteres kann über H⁺-Austauscher gegen Natrium oder Kalium aus der Zelle transportiert werden (Banuelos et al, 1998) (Abb. 25B). Dadurch steigt die intrazelluläre Konzentration von Natrium/Kalium, wodurch wiederum die Osmolarität der Zellen gegenüber dem Extrazellularraum ansteigt. Dies führt zu einer Inaktivierung des HOG-Signalwegs (Abb. 25B). In Luft dagegen fallen trotz Aktivität der Carboanhydrase entsprechend geringere Mengen an H⁺ an, wodurch der Transport von Natrium/Kalium in die Zellen vermindert ist. Wenn die Osmolarität in der Zelle zu stark absinkt, löst dies hyperosmotischen Stress aus. Dadurch wird der HOG-Signalweg aktiviert (Abb. 25C).

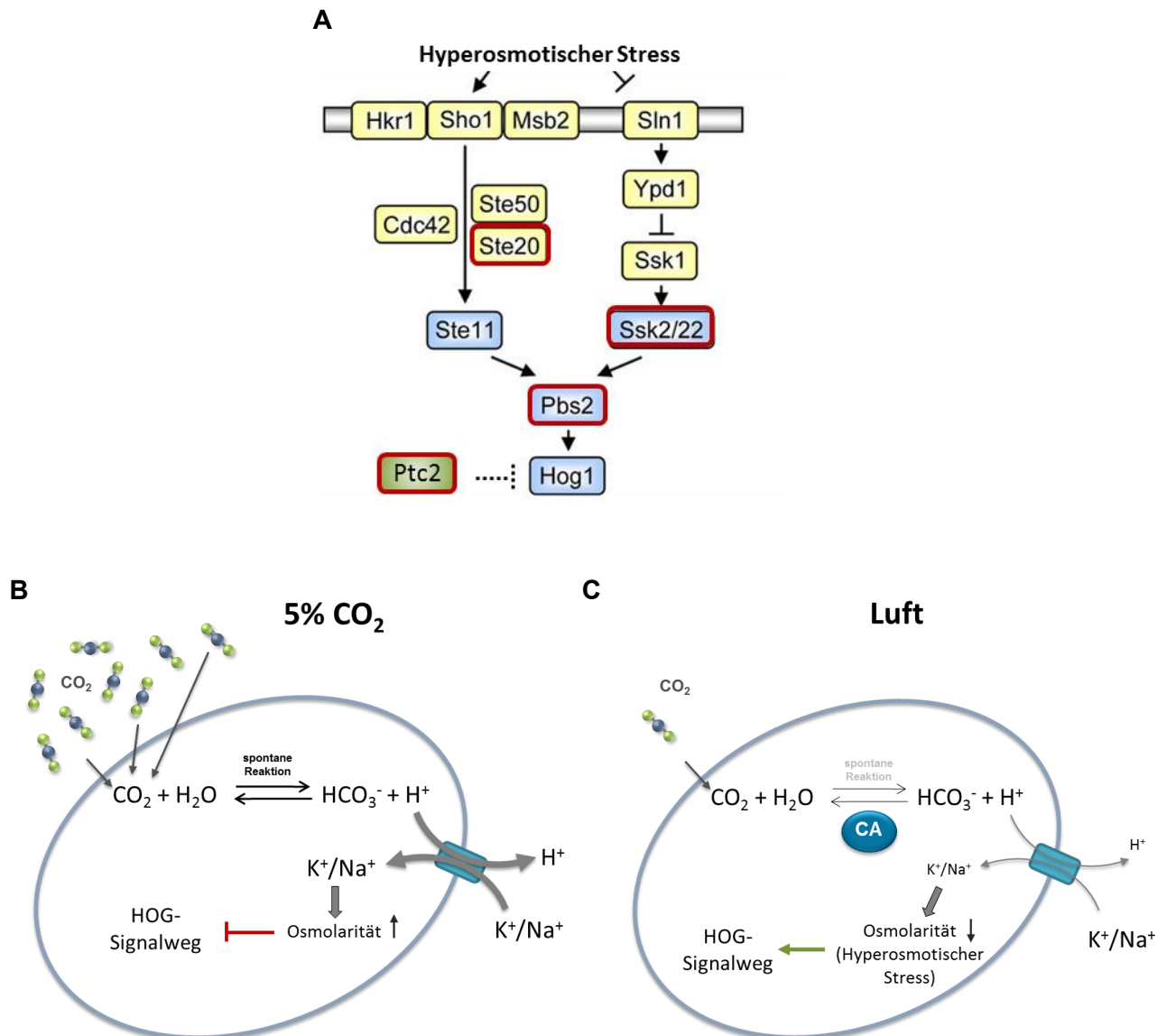


Abb. 25 Möglicher Zusammenhang zwischen CO₂-Adaptation und HOG-Signalweg

(A) Bei hyperosmotischem Stress wird der HOG-Signalweg über zwei osmosensorische Wege (Sho1, Sln1; gelb dargestellt) aktiviert, welche jeweils eine MAP Kinase-Kaskade (blau dargestellt) aktiviert. Beide führen zur Phosphorylierung (= Aktivierung) von Hog1. Darüber hinaus kann Hog1 durch Ptc2 (grün dargestellt) dephosphoryliert und damit inaktiviert werden. Alle Komponenten des HOG-Signalweges, deren Mutanten im initialen Screening die *NCE103* Regulation beeinflussten, sind rot umrandet. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Babazadeh et al, 2014).

(B) In 5% CO₂ kommt es durch die spontane Umwandlung in HCO₃⁻ zur Bildung großer Mengen H⁺. Diese können über Na⁺/H⁺-Austauscher gegen Na⁺ und K⁺ aus der Zelle transportiert werden. Erhöhte intrazelluläre Level an Na⁺ und K⁺ beeinflussen die Osmolarität der Zelle und führen zur Hemmung des HOG-Signalweges.

(C) In Luft fallen entsprechend geringere Mengen H⁺ in der Zelle an. Dadurch ist auch der Transport von Na⁺ und K⁺ in die Zellen vermindert. In der Folge sinkt die Osmolarität der Zelle im Vergleich zum Extrazellulärraum, was hyperosmotischen Stress auslöst. Dadurch wird der HOG-Signalweg aktiviert.

Unter 5% CO₂ wäre folglich zum einen der Signalweg über Pkh1/2 und Sch9 aktiv, der die Induktion von *NCE103* hemmt. Zum anderen würde keine Aktivierung des HOG-Signalweges erfolgen, wodurch Sko1 unphosphoryliert vorliegt und als Repressor wirkt (Abb. 26A). Interessanterweise wurde gezeigt, dass Sch9 mit Hog1 und Sko1 interagiert und Sko1 *in vitro* phosphoryliert, allerdings an anderer Stelle als Hog1 (Pascual-Ahuir & Proft, 2007). Wenn Hog1 ebenfalls aktiv ist und Sko1 phosphoryliert, führt diese doppelte Phosphorylierung dazu, dass Sko1 aktivierend wirkt. Die Auswirkungen der Sch9-vermittelten Phosphorylierung allein sind dagegen spekulativ, aber eventuell wird die Repressorwirkung von Sko1 abgeschwächt. In Luft dagegen ist Sch9 inaktiv, Cst6 und eventuell Aca1 sind aktiv und induzieren die *NCE103* Expression (Abb. 26B). Gleichzeitig führen die geringen HCO₃⁻ Level zu einer Aktivierung des HOG-Signalweges, wodurch phosphoryliertes Pbs2 Hog1 phosphoryliert. In der Folge phosphoryliert Hog1 Sko1. Sko1 wirkt dann als Aktivator und induziert ebenfalls die *NCE103* Expression. Einen vergleichbaren Regulationsmechanismus konnten Proft und Struhl bereits 2002 für Sko1 zeigen: Sko1 kann demnach sowohl von Hog1 als auch von PKA, welche wie Sch9 zur Familie der AGC Kinasen gehört, phosphoryliert werden. Dabei beeinflussen sich die Phosphorylierungen durch beide Aktivatoren gegenseitig und regulieren die Aktivität von Sko1 als Aktivator oder Repressor (Proft & Struhl, 2002). *SKO1* Homologe existieren zudem sowohl in *C. albicans* als auch in *C. glabrata*.

In diesem hypothetischen System würde eine Deletion von Sch9 bei 5% CO₂ zwar zu einer Aktivierung von Cst6 und eventuell auch Aca1 und damit Induktion von *NCE103* führen, allerdings würden hohe HCO₃⁻ Konzentrationen zu einer Hemmung des HOG-Signalweges führen. Dadurch würde Sko1 als Repressor fungieren und die ungehemmte Induktion der *NCE103* Expression drosseln. Exakt das ist auch auf Proteinebene zu sehen (Abb. 14). Zwar sind die *Nce103* Level bei 5% CO₂ in $\Delta sch9$ erhöht, erreichen jedoch keinesfalls das gleiche Niveau wie unter Luft-Bedingungen. Die mögliche Beteiligung des HOG-Signalweges an der Carboanhydrase-Regulation würde auch die verminderte *NCE103*^{Luft} Expression in $\Delta pbs2$ erklären, denn dann würde der komplette zweite Aktivierungsweg über Sko1 inaktiviert werden. Interessant wäre es, die Auswirkungen von *SKO1/CST6/ACA1* Doppel- oder

Dreifachmutanten sowie einer *HOG1/SCH9* Doppelmutante auf die *NCE103* Expression in unterschiedlichen CO_2 -Bedingungen zu überprüfen. Möglicherweise könnte so eine Beteiligung des HOG-Signalweges an der Regulation der Carboanhydrase bewiesen werden.

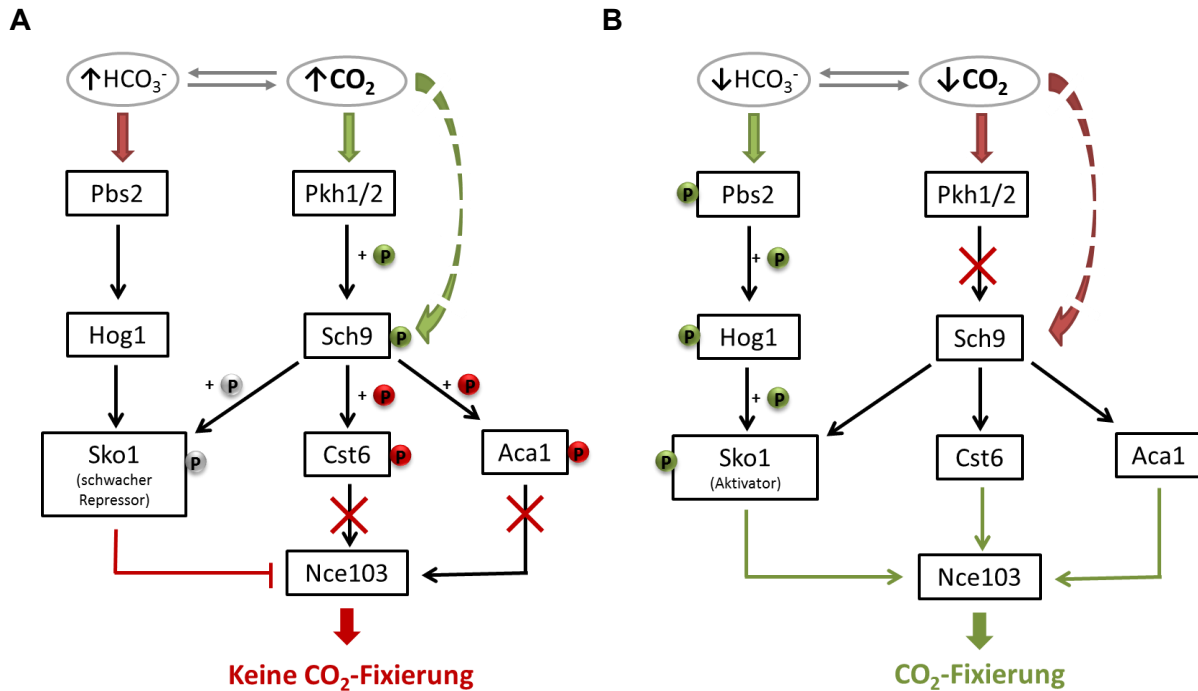


Abb. 26 Mögliche Regulationswege der Carboanhydrase-Expression unter verschiedenen CO_2 -Bedingungen

(A) Hoch- CO_2 -Bedingungen (5%) führen zur Aktivierung von *Sch9* über *Pkh1/2*. *Sch9* könnte auch direkt über CO_2 aktiviert werden. Aktives, phosphoryliertes *Sch9* phosphoryliert wiederum *Cst6*, eventuell auch *Aca1*, wodurch beide Aktivatoren gehemmt werden und die *NCE103* Expression nicht induzieren können. Parallel scheint auch der HOG-Signalweg die Carboanhydrase-Expression zu beeinflussen. In 5% CO_2 ist dieser inaktiv, dadurch wirkt der Transkriptionsfaktor *Sko1* als Repressor und hemmt ebenfalls die *NCE103* Expression. Zudem ist eine Phosphorylierung von *Sko1* durch *Sch9* beschrieben, welche ebenfalls Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors haben könnte.

(B) In Luft (niedrig- CO_2 -Bedingungen) ist *Sch9* aufgrund fehlender Phosphorylierung inaktiv, *Cst6* und *Aca1* dagegen aktiv, was eine Induktion der *NCE103* Expression zur Folge hat. Geringe HCO_3^- -Level resultieren in geringerer Osmolarität der Zellen und Aktivierung des HOG-Signalweges. *Pbs2* phosphoryliert *Hog1* und *Hog1* phosphoryliert *Sko1*, wodurch *Sko1* vom Repressorkomplex abgespalten wird und als Aktivator wirkt.

4.4.3. pH-Regulation

Die durch die Umwandlung von CO_2 in HCO_3^- entstehenden Protonen (H^+) müssen nicht zwangsläufig über Antiporter aus der Zelle transportiert werden, sondern könnten zunächst auch intrazellulär verbleiben und so beispielsweise über die Stressantwort auf schwache Säuren (weak acid response)

den pH-Wert der Zelle beeinflussen (Kane, 2016). Dabei diffundieren bei geringem extrazellulärem pH schwache Säuren in die Zelle und zerfallen dort aufgrund des neutraleren pH in Säureanionen und Protonen (Giannattasio et al, 2013). Dadurch kommt es zur intrazellulären Ansäuerung, welche durch die bei der CO₂-Fixierung entstehenden Protonen verstärkt werden würde. Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes wiederum beeinflussen in *S. cerevisiae* die Ladung von Metaboliten, die Funktion und Faltung von Proteinen, die Membranpermeabilität sowie Wachstum und Proliferation (Orij et al, 2011). Interessanterweise wurde für *C. albicans* gezeigt, dass Säurestress die Expression von *NCE103* in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors Mnl1 erhöht (Ramsdale et al, 2008). Folglich ist neben der Osmolarität bzw. dem HOG-Signalweg auch ein Einfluss des pH-Wertes auf die CO₂-Anpassung möglich, jedoch gibt es hierfür anhand der gewonnenen Ergebnisse keine Indizien.

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Anpassung an vorherrschende CO₂-Bedingungen der Umwelt ist essentiell für das Überleben von Mikroorganismen, die sich ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Carboanhydrasen sind hochkonservierte Enzyme, die weitestgehend in allen Domänen des Lebens zu finden sind (Eukaryonten, Bakterien, Archäen). Sie dienen der Umwandlung von CO₂ in dessen fixierte Form HCO₃⁻, wodurch metabolische Ansprüche der Zellen auch unter atmosphärisch niedrigen CO₂-Bedingungen erfüllt werden können. Eine Deletion der Carboanhydrase ist für fast alle Organismen letal, wenn nicht ausreichend CO₂ zur Verfügung steht. Darin zeigt sich die zentrale Bedeutung der Carboanhydrase für das Überleben in ökologischen Nischen, in denen verfügbares CO₂ stark limitiert ist.

In dieser Arbeit wurde die Regulation der Carboanhydrase *NCE103* im Modellorganismus *S. cerevisiae*, sowie in den humanpathogenen Pilzen *C. albicans* und *C. glabrata* untersucht. Dabei wurde mit Pkh1/2/Sch9 die dem Transkriptionsfaktor Cst6/Rca1 übergeordnete Signalkaskade identifiziert, die für die Phosphorylierung von Cst6/Rca1 und damit für die CO₂-abhängige Regulation von *NCE103* verantwortlich ist. Zudem wurde gezeigt, dass dieser Regulationsmechanismus hochkonserviert ist und auf *C. albicans* und *C. glabrata* übertragen werden kann. Die CO₂-Adaptation über Carboanhydrasen ist ein zentraler Prozess, der neben der CO₂-Homöostase auch eine Vielzahl weiterer Zellfunktionen steuert und beeinflusst. Dazu gehören die Regulation des pH-Wertes von Zellen und Organellen, der Membrantransport von Metaboliten, die Biofilmbildung, die Zellatmung und biosynthetische Reaktionen wie Gluconeogenese, Harnstoff- und Fettsäuresynthese (Bahn & Muhlschlegel, 2006; Henry, 1996; Raven, 2006; Sharabi et al, 2009; Supuran, 2008b). Zudem ist die Aktivität der Carboanhydrase Voraussetzung für die Aktivierung weiterer wichtiger CO₂-abhängiger Signalwege, wie z. B. dem Adenylylcyclase/cAMP/PKA-Signalweg (Klengel et al, 2005). Daher stellen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse einen signifikanten Beitrag zum Grundverständnis der CO₂-Adaptation in Hefepilzen dar und eröffnen neue Möglichkeiten und Ziele zur gezielten

therapeutischen Behandlung von Pilzkrankungen. Vor allem für *C. albicans* und *C. glabrata* Biofilme, die medizinische Implantate wie Katheter, Herzschrittmacher oder künstliche Gelenke besiedeln und ausgeprägte räumliche CO₂-Gradienten aufweisen, ist die Ausrichtung auf pilzspezifische Komponenten der CO₂-Anpassung eine vielversprechende neue Therapieoption (Hall et al, 2010; Nobile & Johnson, 2015).

Es zeigte sich, dass die *NCE103* Expression neben der identifizierten Regulationskaskade über Pkh1/2 /Sch9/Cst6 zusätzlich von weiteren Faktoren und Signalwegen reguliert wird und damit deutlich komplexer ist als zunächst angenommen. Nicht alle beobachteten Effekte lassen sich durch die Funktion von Sch9 erklären. So erscheint eine Beteiligung des HOG-Signalweges wahrscheinlich, da mehrere Komponenten die CO₂-abhängige *NCE103* Regulation beeinflussten. Um die daraus abgeleitete Hypothese zum Zusammenspiel von Osmolarität und CO₂-Anpassung zu überprüfen, sind weiterführende Experimente notwendig. Auch ein Einfluss des Cst6-Paralogs Aca1 auf die *NCE103* Expression in *S. cerevisiae* scheint möglich und sollte in Zukunft genauer untersucht werden. Zusätzlich zu den genannten alternativen Regulationswegen sind durch die starke Vernetzung der CO₂-Regulation mit anderen Zellfunktionen auch diverse Rückkopplungsmechanismen denkbar, die vor allem bei Deletionen einzelner Schlüsselfaktoren zum Tragen kommen.

Wie initial vermutet, ist die CO₂-Regulation durch Cst6/Rca1 in den humanpathogenen Hefen *C. albicans* und *C. glabrata* konserviert. Auch die Funktion der übergeordneten Kinase Sch9 hinsichtlich der *NCE103* Regulation ist vergleichbar. Auf Grundlage dieser Experimente ist eine weiterführende Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf andere *Candida*-Arten möglich. Interessanterweise besitzen auch *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus nidulans* CO₂-abhängig regulierte Carboanhydrasen und weisen Homologe von Cst6/Rca1 auf (Han et al, 2010). Folglich besteht die Möglichkeit, dass der in dieser Arbeit identifizierte und charakterisierte Regulationsweg nicht nur in Hefepilzen, sondern auch in anderen Ascomyzeten eine Rolle spielt.

6. Literaturverzeichnis

Aguilera J, Petit T, de Winde JH, Pronk JT (2005a) Physiological and genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to high carbon dioxide concentrations. *FEMS Yeast Res* **5**: 579-593

Aguilera J, Van Dijken JP, De Winde JH, Pronk JT (2005b) Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. *Biochem J* **391**: 311-316

Albuquerque CP, Smolka MB, Payne SH, Bafna V, Eng J, Zhou H (2008) A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**: 1389-1396

Alspaugh JA, Pukkila-Worley R, Harashima T, Cavallo LM, Funnell D, Cox GM, Perfect JR, Kronstad JW, Heitman J (2002) Adenylyl cyclase functions downstream of the Galpha protein Gpa1 and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell* **1**: 75-84

Amoroso G, Morell-Avrahov L, Muller D, Klug K, Sultemeyer D (2005) The gene *NCE103* (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Mol Microbiol* **56**: 549-558

Andersson I, Backlund A (2008) Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol Biochem* **46**: 275-291

Babazadeh R, Furukawa T, Hohmann S, Furukawa K (2014) Rewiring yeast osmostress signalling through the MAPK network reveals essential and non-essential roles of Hog1 in osmoadaptation. *Sci Rep* **4**: 4697

Bahn YS, Cox GM, Perfect JR, Heitman J (2005) Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Current biology : CB* **15**: 2013-2020

Bahn YS, Muhlschlegel FA (2006) CO₂ sensing in fungi and beyond. *Curr Opin Microbiol* **9**: 572-578

Banuelos MA, Sychrova H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology* **144** (Pt 10): 2749-2758

Brown SM, Campbell LT, Lodge JK (2007) *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Curr Opin Microbiol* **10**: 320-325

Burghout P, Cron LE, Gradstedt H, Quintero B, Simonetti E, Bijlsma JJ, Bootsma HJ, Hermans PW (2010) Carbonic anhydrase is essential for *Streptococcus pneumoniae* growth in environmental ambient air. *J Bacteriol* **192**: 4054-4062

Casamayor A, Torrance PD, Kobayashi T, Thorner J, Alessi DR (1999) Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Current biology : CB* **9**: 186-197

Cen Y, Fiori A, Van Dijck P (2015) Deletion of the DNA Ligase IV Gene in *Candida glabrata* Significantly Increases Gene-Targeting Efficiency. *Eukaryotic cell* **14**: 783-791

Chen D, Wang Y, Zhou X, Wang Y, Xu JR (2014) The Sch9 kinase regulates conidium size, stress responses, and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *PloS one* **9**: e105811

Chen SL, Gutmanns F (1976) Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. *Biotechnol Bioeng* **18**: 1455-1462

Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J (2000) Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* **289**: 625-628

Cheng HC, Qi RZ, Paudel H, Zhu HJ (2011) Regulation and function of protein kinases and phosphatases. *Enzyme Res* **2011**: 794089

Cleves AE, Cooper DN, Barondes SH, Kelly RB (1996) A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **133**: 1017-1026

Cottier F, Leewattanapasuk W, Kemp LR, Murphy M, Supuran CT, Kurzai O, Muhlschlegel FA (2013) Carbonic anhydrase regulation and CO₂ sensing in the fungal pathogen *Candida glabrata* involves a novel Rca1p ortholog. *Bioorg Med Chem* **21**: 1549-1554

Cottier F, Raymond M, Kurzai O, Bolstad M, Leewattanapasuk W, Jimenez-Lopez C, Lorenz MC, Sanglard D, Vachova L, Pavelka N, Palkova Z, Muhlschlegel FA (2012) The bZIP transcription factor Rca1p is a central regulator of a novel CO₂ sensing pathway in yeast. *PLoS pathogens* **8**: e1002485

Cummins EP, Selfridge AC, Sporn PH, Sznajder JI, Taylor CT (2014) Carbon dioxide-sensing in organisms and its implications for human disease. *Cell Mol Life Sci* **71**: 831-845

da Silva Dantas A, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, Gow NA (2016) Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Curr Opin Microbiol* **34**: 111-118

Dastidar RG, Hooda J, Shah A, Cao TM, Henke RM, Zhang L (2012) The nuclear localization of SWI/SNF proteins is subjected to oxygen regulation. *Cell Biosci* **2**: 30

de Groot BL, Engel A, Grubmuller H (2003) The structure of the aquaporin-1 water channel: a comparison between cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. *J Mol Biol* **325**: 485-493

Del Prete S, Vullo D, Fisher GM, Andrews KT, Poulsen SA, Capasso C, Supuran CT (2014) Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*--the eta-carbonic anhydrases. *Bioorg Med Chem Lett* **24**: 4389-4396

Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR (2015) mTORC1 drives HIF-1alpha and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene* **34**: 2239-2250

Downey M, Houlsworth R, Maringele L, Rollie A, Brehme M, Galicia S, Guillard S, Partington M, Zubko MK, Krogan NJ, Emili A, Greenblatt JF, Harrington L, Lydall D, Durocher D (2006) A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell* **124**: 1155-1168

Du H, Guan G, Xie J, Cottier F, Sun Y, Jia W, Muhlschlegel FA, Huang G (2012) The transcription factor Flo8 mediates CO₂ sensing in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **23**: 2692-2701

Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neueglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confanioleri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M, Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44

Elleuche S, Poggeler S (2009) Evolution of carbonic anhydrases in fungi. *Curr Genet* **55**: 211-222

Endeward V, Cartron JP, Ripoché P, Gros G (2008) RhAG protein of the Rhesus complex is a CO₂ channel in the human red cell membrane. *FASEB J* **22**: 64-73

Endeward V, Musa-Aziz R, Cooper GJ, Chen LM, Pelletier MF, Virkki LV, Supuran CT, King LS, Boron WF, Gros G (2006) Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO₂ transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB J* **20**: 1974-1981

Erez O, Kahana C (2002) Deletions of *SKY1* or *PTK2* in the *Saccharomyces cerevisiae* *trk1Δtrk2Δ* mutant cells exert dual effect on ion homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* **295**: 1142-1149

Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **292**: 288-290

Fasolo J, Sboner A, Sun MG, Yu H, Chen R, Sharon D, Kim PM, Gerstein M, Snyder M (2011) Diverse protein kinase interactions identified by protein microarrays reveal novel connections between cellular processes. *Genes & development* **25**: 767-778

Fox GC, Shafiq M, Briggs DC, Knowles PP, Collister M, Didmon MJ, Makrantonis V, Dickinson RJ, Hanrahan S, Totty N, Stark MJ, Keyse SM, McDonald NQ (2007) Redox-mediated substrate recognition by Sdp1 defines a new group of tyrosine phosphatases. *Nature* **447**: 487-492

Garcia-Gimeno MA, Struhl K (2000) Aca1 and Aca2, ATF/CREB activators in *Saccharomyces cerevisiae*, are important for carbon source utilization but not the response to stress. *Mol Cell Biol* **20**: 4340-4349

Giannattasio S, Guaragnella N, Zdravcic M, Marra E (2013) Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Front Microbiol* **4**: 33

Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acids research* **20**: 1425

Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**: 179-182

Gotz R, Gnann A, Zimmermann FK (1999) Deletion of the carbonic anhydrase-like gene *NCE103* of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast (Chichester, England)* **15**: 855-864

Granger DL, Perfect JR, Durack DT (1985) Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest* **76**: 508-516

Hahn JS, Thiele DJ (2002) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *The Journal of biological chemistry* **277**: 21278-21284

Hall RA, De Sordi L, MacCallum DM, Topal H, Eaton R, Bloor JW, Robinson GK, Levin LR, Buck J, Wang Y, Gow NA, Steegborn C, Muhlschlegel FA (2010) CO₂ acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS pathogens* **6**: e1001193

Han KH, Chun YH, Figueiredo Bde C, Soriani FM, Savoldi M, Almeida A, Rodrigues F, Cairns CT, Bignell E, Tobal JM, Goldman MH, Kim JH, Bahn YS, Goldman GH, Ferreira ME (2010) The conserved and divergent roles of carbonic anhydrases in the filamentous fungi *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **75**: 1372-1388

Henry RP (1996) Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu Rev Physiol* **58**: 523-538

Hogan DA, Muhlschlegel FA (2011) *Candida albicans* developmental regulation: adenylyl cyclase as a coincidence detector of parallel signals. *Curr Opin Microbiol* **14**: 682-686

Homann OR, Dea J, Noble SM, Johnson AD (2009) A phenotypic profile of the *Candida albicans* regulatory network. *PLoS genetics* **5**: e1000783

Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research* **35**: W585-587

Huang G, Srikantha T, Sahni N, Yi S, Soll DR (2009) CO(2) regulates white-to-opaque switching in *Candida albicans*. *Current biology : CB* **19**: 330-334

Huber A, Bodenmiller B, Uotila A, Stahl M, Wanka S, Gerrits B, Aebersold R, Loewith R (2009) Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes & development* **23**: 1929-1943

Huber A, French SL, Tekotte H, Yerlikaya S, Stahl M, Perepelkina MP, Tyers M, Rougemont J, Beyer AL, Loewith R (2011) Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L. *The EMBO journal* **30**: 3052-3064

Huesgen PF, Lange PF, Rogers LD, Solis N, Eckhard U, Kleifeld O, Goulas T, Gomis-Ruth FX, Overall CM (2015) LysargiNase mirrors trypsin for protein C-terminal and methylation-site identification. *Nat Methods* **12**: 55-58

Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686-691

Humphrey SJ, James DE, Mann M (2015) Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab* **26**: 676-687

Inagaki M, Schmelzle T, Yamaguchi K, Irie K, Hall MN, Matsumoto K (1999) PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol Cell Biol* **19**: 8344-8352

Inglis DO, Sherlock G (2013) Ras signaling gets fine-tuned: regulation of multiple pathogenic traits of *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **12**: 1316-1325

Jacinto E, Lorberg A (2008) TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J* **410**: 19-37

Jain SK, Agrawal SC (1994) Fungitoxic effect of some organic volatile substances against fungi causing otomycosis. *Mycoses* **37**: 299-301

Janssen PJ, Lambreva MD, Plumere N, Bartolucci C, Antonacci A, Buonasera K, Frese RN, Scognamiglio V, Rea G (2014) Photosynthesis at the forefront of a sustainable life. *Front Chem* **2**: 36

Jorgensen P, Nishikawa JL, Bretkreutz BJ, Tyers M (2002) Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* **297**: 395-400

Jorgensen P, Rupes I, Sharom JR, Schneper L, Broach JR, Tyers M (2004) A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes & development* **18**: 2491-2505

Kaeberlein M, Powers RW, 3rd, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK (2005) Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* **310**: 1193-1196

Kaldenhoff R, Kai L, Uehlein N (2014) Aquaporins and membrane diffusion of CO₂ in living organisms. *Biochim Biophys Acta* **1840**: 1592-1595

Kane PM (2016) Proton Transport and pH Control in Fungi. *Adv Exp Med Biol* **892**: 33-68

Kaouass M, Audette M, Ramotar D, Verma S, De Montigny D, Gamache I, Torossian K, Poulin R (1997) The *STK2* gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**: 2994-3004

Kennelly PJ, Krebs EG (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *The Journal of biological chemistry* **266**: 15555-15558

Kim MS, Ko YJ, Maeng S, Floyd A, Heitman J, Bahn YS (2010) Comparative transcriptome analysis of the CO₂ sensing pathway via differential expression of carbonic anhydrase in *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* **185**: 1207-1219

Kitada K, Yamaguchi E, Arisawa M (1995) Cloning of the *Candida glabrata* *TRP1* and *HIS3* genes, and construction of their disruptant strains by sequential integrative transformation. *Gene* **165**: 203-206

Klengel T, Liang WJ, Chaloupka J, Ruoff C, Schroppel K, Naglik JR, Eckert SE, Mogensen EG, Haynes K, Tuite MF, Levin LR, Buck J, Muhlschlegel FA (2005) Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Current biology : CB* **15**: 2021-2026

Langereis JD, Zomer A, Stunnenberg HG, Burghout P, Hermans PW (2013) Nontypeable Haemophilus influenzae carbonic anhydrase is important for environmental and intracellular survival. *J Bacteriol* **195**: 2737-2746

Lehneck R, Elleuche S, Poggeler S (2014) The filamentous ascomycete *Sordaria macrospora* can survive in ambient air without carbonic anhydrases. *Mol Microbiol* **92**: 931-944

Lehneck R, Poggeler S (2014) A matter of structure: structural comparison of fungal carbonic anhydrases. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 8433-8441

Leroy C, Lee SE, Vaze MB, Ochsenbein F, Guerois R, Haber JE, Marsolier-Kergoat MC (2003) PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Molecular cell* **11**: 827-835

Lin X, Heitman J (2006) The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* **60**: 69-105

Lindskog S (1997) Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther* **74**: 1-20

Liu G, Bergenholm D, Nielsen J (2016) Genome-Wide Mapping of Binding Sites Reveals Multiple Biological Functions of the Transcription Factor Cst6p in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBio* **7**

Liu K, Zhang X, Lester RL, Dickson RC (2005) The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *The Journal of biological chemistry* **280**: 22679-22687

Liu W, Zhao J, Li X, Li Y, Jiang L (2010) The protein kinase CaSch9p is required for the cell growth, filamentation and virulence in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **10**: 462-470

Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell* **10**: 457-468

Lu JY, Lin YY, Sheu JC, Wu JT, Lee FJ, Chen Y, Lin MI, Chiang FT, Tai TY, Berger SL, Zhao Y, Tsai KS, Zhu H, Chuang LM, Boeke JD (2011) Acetylation of yeast AMPK controls intrinsic aging independently of caloric restriction. *Cell* **146**: 969-979

Lv X, Zhang W, Chen G, Liu W (2015) *Trichoderma reesei* Sch9 and Yak1 regulate vegetative growth, conidiation, and stress response and induced cellulase production. *J Microbiol* **53**: 236-242

Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **4**: 119-128

Merlin C, Masters M, McAteer S, Coulson A (2003) Why is carbonic anhydrase essential to *Escherichia coli*? *J Bacteriol* **185**: 6415-6424

Missner A, Kugler P, Saporov SM, Sommer K, Mathai JC, Zeidel ML, Pohl P (2008) Carbon dioxide transport through membranes. *The Journal of biological chemistry* **283**: 25340-25347

Mitchell AP (2005) Fungal CO₂ sensing: a breath of fresh air. *Current biology : CB* **15**: R934-936

Mogensen EG, Janbon G, Chaloupka J, Steegborn C, Fu MS, Moyrand F, Klengel T, Pearson DS, Geeves MA, Buck J, Levin LR, Muhlschlegel FA (2006) *Cryptococcus neoformans* senses CO₂ through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. *Eukaryotic cell* **5**: 103-111

Morano KA, Thiele DJ (1999) The Sch9 protein kinase regulates Hsp90 chaperone complex signal transduction activity *in vivo*. *The EMBO journal* **18**: 5953-5962

Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**: 599-605

Nakhoul NL, Davis BA, Romero MF, Boron WF (1998) Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO₂ permeability of *Xenopus oocytes*. *Am J Physiol* **274**: C543-548

Neville BA, d'Enfert C, Bougnoux ME (2015) *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. *FEMS Yeast Res* **15**

Nobile CJ, Johnson AD (2015) *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol* **69**: 71-92

Orij R, Brul S, Smits GJ (2011) Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1810**: 933-944

Ouspenski, II, Elledge SJ, Brinkley BR (1999) New yeast genes important for chromosome integrity and segregation identified by dosage effects on genome stability. *Nucleic acids research* **27**: 3001-3008

Pascual-Ahuir A, Proft M (2007) The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmostress-responsive genes. *The EMBO journal* **26**: 3098-3108

Pearce LR, Komander D, Alessi DR (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 9-22

Peggion C, Lopreiato R, Casanova E, Ruzzene M, Facchin S, Pinna LA, Carignani G, Sartori G (2008) Phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* Grx4p glutaredoxin by the Bud32p kinase unveils a novel signaling pathway involving Sch9p, a yeast member of the Akt / PKB subfamily. *FEBS J* **275**: 5919-5933

Persi MA, Burnham JC, Duhring JL (1985) Effects of carbon dioxide and pH on adhesion of *Candida albicans* to vaginal epithelial cells. *Infect Immun* **50**: 82-90

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**: e45

Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Arino J, Serrano R, Posas F (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *The EMBO journal* **20**: 1123-1133

Proft M, Struhl K (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Molecular cell* **9**: 1307-1317

Qie B, Lyu Z, Lyu L, Liu J, Gao X, Liu Y, Duan W, Zhang N, Du L, Liu K (2015) Sch9 regulates intracellular protein ubiquitination by controlling stress responses. *Redox biology* **5**: 290-300

Ramsdale M, Selway L, Stead D, Walker J, Yin Z, Nicholls SM, Crowe J, Sheils EM, Brown AJ (2008) *MNL1* regulates weak acid-induced stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **19**: 4393-4403

Raven JA (2006) Sensing inorganic carbon: CO₂ and HCO₃⁻. *Biochem J* **396**: e5-7

Rep M, Proft M, Remize F, Tamas M, Serrano R, Thevelein JM, Hohmann S (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol* **40**: 1067-1083

Riera M, Mogensen E, d'Enfert C, Janbon G (2012) New regulators of biofilm development in *Candida glabrata*. *Research in microbiology* **163**: 297-307

Rocha CR, Schroppel K, Harcus D, Marcil A, Dignard D, Taylor BN, Thomas DY, Whiteway M, Leberer E (2001) Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **12**: 3631-3643

Sharabi K, Lecuona E, Helenius IT, Beitel GJ, Sznajder JI, Gruenbaum Y (2009) Sensing, physiological effects and molecular response to elevated CO₂ levels in eukaryotes. *J Cell Mol Med* **13**: 4304-4318

Sheth CC, Johnson E, Baker ME, Haynes K, Muhlschlegel FA (2005) Phenotypic identification of *Candida albicans* by growth on chocolate agar. *Med Mycol* **43**: 735-738

Sheth CC, Mogensen EG, Fu MS, Blomfield IC, Muhlschlegel FA (2008) *Candida albicans* HSP12 is co-regulated by physiological CO₂ and pH. *Fungal Genet Biol* **45**: 1075-1080

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**: 850-858

Sobko A (2006) Systems biology of AGC kinases in fungi. *Sci STKE* **2006**: re9

Soupene E, Inwood W, Kustu S (2004) Lack of the Rhesus protein Rh1 impairs growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* at high CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7787-7792

Soupene E, King N, Feild E, Liu P, Niyogi KK, Huang CH, Kustu S (2002) Rhesus expression in a green alga is regulated by CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7769-7773

Srinivasan M, Mehta P, Yu Y, Prugar E, Koonin EV, Karzai AW, Sternglanz R (2011) The highly conserved KEOPS/EKC complex is essential for a universal tRNA modification, t⁶A. *The EMBO journal* **30**: 873-881

Stewart PS, Franklin MJ (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**: 199-210

Stichternoth C, Fraund A, Setiadi E, Giasson L, Vecchiarelli A, Ernst JF (2011) Sch9 kinase integrates hypoxia and CO₂ sensing to suppress hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **10**: 502-511

Stocchetto S, Marin O, Carignani G, Pinna LA (1997) Biochemical evidence that *Saccharomyces cerevisiae* YGR262c gene, required for normal growth, encodes a novel Ser/Thr-specific protein kinase. *FEBS Lett* **414**: 171-175

Sugajska E, Swiatek W, Zabrocki P, Geyskens I, Thevelein JM, Zolnierowicz S, Wera S (2001) Multiple effects of protein phosphatase 2A on nutrient-induced signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **40**: 1020-1026

Supuran CT (2008a) Carbonic anhydrases--an overview. *Curr Pharm Des* **14**: 603-614

Supuran CT (2008b) Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 168-181

Suzuki T, Yokoyama A, Tsuji T, Ikeshima E, Nakashima K, Ikushima S, Kobayashi C, Yoshida S (2011) Identification and characterization of genes involved in glutathione production in yeast. *Journal of bioscience and bioengineering* **112**: 107-113

Swaney DL, Beltrao P, Starita L, Guo A, Rush J, Fields S, Krogan NJ, Villen J (2013) Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods* **10**: 676-682

Taus T, Kocher T, Pichler P, Paschke C, Schmidt A, Henrich C, Mechtler K (2011) Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *J Proteome Res* **10**: 5354-5362

Taylor CT, Cummins EP (2011) Regulation of gene expression by carbon dioxide. *J Physiol* **589**: 797-803

Teng YB, Jiang YL, He YX, He WW, Lian FM, Chen Y, Zhou CZ (2009) Structural insights into the substrate tunnel of *Saccharomyces cerevisiae* carbonic anhydrase Nce103. *BMC Struct Biol* **9**: 67

Thoreen CC, Sabatini DM (2009) Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy* **5**: 725-726

Uehlein N, Lovisollo C, Siefritz F, Kaldenhoff R (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* **425**: 734-737

Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN, Loewith R (2007) Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell* **26**: 663-674

van Zyl W, Huang W, Sneddon AA, Stark M, Camier S, Werner M, Marck C, Sentenac A, Broach JR (1992) Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**: 4946-4959

van Zyl WH, Wills N, Broach JR (1989) A general screen for mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in tRNA biosynthesis. *Genetics* **123**: 55-68

Vandeputte P, Pradervand S, Ischer F, Coste AT, Ferrari S, Harshman K, Sanglard D (2012) Identification and functional characterization of Rca1, a transcription factor involved in both antifungal susceptibility and host response in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* **11**: 916-931

Varshney N, Schaekel A, Singha R, Chakraborty T, van Wijlick L, Ernst JF, Sanyal K (2015) A surprising role for the Sch9 protein kinase in chromosome segregation in *Candida albicans*. *Genetics* **199**: 671-674

Verstrepen KJ, Klis FM (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**: 5-15

Voordeckers K, Kimpe M, Haesendonckx S, Louwet W, Versele M, Thevelein JM (2011) Yeast 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) orthologs Pkh1-3 differentially regulate phosphorylation of protein kinase A (PKA) and the protein kinase B (PKB)/S6K ortholog Sch9. *The Journal of biological chemistry* **286**: 22017-22027

Wang Y, Aisen P, Casadevall A (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun* **63**: 3131-3136

Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, Li L, Longo VD (2008) Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS genetics* **4**: e13

Wei Y, Zheng XF (2009) Sch9 partially mediates TORC1 signaling to control ribosomal RNA synthesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **8**: 4085-4090

Weinberger M, Mesquita A, Carroll T, Marks L, Yang H, Zhang Z, Ludovico P, Burhans WC (2010) Growth signaling promotes chronological aging in budding yeast by inducing superoxide anions that inhibit quiescence. *Aging* **2**: 709-726

Welihinda AA, Tirasophon W, Green SR, Kaufman RJ (1998) Protein serine/threonine phosphatase Ptc2p negatively regulates the unfolded-protein response by dephosphorylating Ire1p kinase. *Mol Cell Biol* **18**: 1967-1977

Wilson LK, Benton BM, Zhou S, Thorner J, Martin GS (1995) The yeast immunophilin Fpr3 is a physiological substrate of the tyrosine-specific phosphoprotein phosphatase Ptp1. *The Journal of biological chemistry* **270**: 25185-25193

Wu WS, Li WH (2008) Identifying gene regulatory modules of heat shock response in yeast. *BMC genomics* **9**: 439

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484

Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL (2000) Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* **60**: 7075-7083

Young C, Mapes J, Hanneman J, Al-Zarban S, Ota I (2002) Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryotic cell* **1**: 1032-1040

Zabrocki P, Van Hoof C, Goris J, Thevelein JM, Winderickx J, Wera S (2002) Protein phosphatase 2A on track for nutrient-induced signalling in yeast. *Mol Microbiol* **43**: 835-842

Zaragoza O, Fries BC, Casadevall A (2003) Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO₂. *Infect Immun* **71**: 6155-6164

7. Abkürzungsverzeichnis

6x His	Hexahistidin-Signalpeptid
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyase
ACN	Acetonitril
Amt	Ammoniumtransporter
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
D	Asparaginsäure
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
H	Histidin
H ₂ O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HOG	High Osmolarity Glycerol

| Abkürzungsverzeichnis

IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IP	Immunpräzipitation
K	Lysin
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie
L	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
M	Methionin
MAP	Mitogen-activated protein
Mep	Methylaminpermease
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger- (Boten-) Ribonukleinsäure
MWCO	Molekulargewichts-Cut-off
<i>NCE103</i> ^{CO₂}	Expression von <i>NCE103</i> in 5% CO ₂
<i>NCE103</i> ^{Luft}	Expression von <i>NCE103</i> in Luft
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
ORF	Offener Leserahmen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	Phosphoinositide-abhängige Kinase 1
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit- Polymerasekettenreaktion
R	Arginin
RSLC	Rapid Separation Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
S	Serin

| Abkürzungsverzeichnis

SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Threonin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris/EDTA Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
TORC1	Target of rapamycin complex 1
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Dextrose-Medium
YEP	Hefeextrakt-Pepton-Medium
z. B.	zum Beispiel

8. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Unterteilung der Carboanhydrasen und deren Vorkommen	4
Tabelle 2: Verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	16
Tabelle 3: Verwendete <i>C. glabrata</i> -Stämme	22
Tabelle 4: Verwendete <i>C. albicans</i> -Stämme	23
Tabelle 5: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide	23
Tabelle 6: Verwendete Primer für qRT-PCR	27
Tabelle 7: Verwendete PCR-Primer für Überexpression in <i>E. coli</i>	28
Tabelle 8: Verwendete PCR-Primer für Überexpression in <i>S. cerevisiae</i> mithilfe des <i>GAL1</i> Promoters	29
Tabelle 9: Verwendete PCR-Primer für Genexpression in <i>S. cerevisiae</i>	30
Tabelle 10: Verwendete Primer für spezifische Mutagenese	30
Tabelle 11: Verwendete PCR-Primer für die <i>SCH9</i> Deletion in <i>C. glabrata</i>	33
Tabelle 12: Verwendete primäre Antikörper	34
Tabelle 13: Verwendete sekundäre Antikörper	35
Tabelle 14: Verwendete Proteasen für Massenspektrometrie	41
Tabelle 15: Sc <i>NCE103</i> Expression identifizierter Kinase-Mutanten	48
Tabelle 16: Sc <i>NCE103</i> Expression identifizierter Phosphatase-Mutanten	51
Tabelle 17: Bestimmung der Antikörpertiter mittels ELISA	58
Abb. 1 Fixierung von CO ₂ durch Umwandlung in Bikarbonat unter sich ändernden CO ₂ - Konzentrationen	3
Abb. 2 Einfluss von CO ₂ und HCO ₃ ⁻ auf humanpathogene Pilze	7
Abb. 3 Hypothesemodell zur CO ₂ -abhängigen Regulation von <i>NCE103</i> in Hefen	15
Abb. 4 Arbeitsablauf der Untersuchung der Mutantenbibliothek zur Identifizierung der Cst6-Kinase	25
Abb. 5 Deletion von <i>C. glabrata</i> <i>SCH9</i>	32
Abb. 6 Bestimmung der CO ₂ -abhängigen Expression von Sc <i>NCE103</i> und Sc <i>CST6</i> über die Zeit	46
Abb. 7 CO ₂ -abhängige Sc <i>NCE103</i> Expression möglicher Kinasekandidaten	48
Abb. 8 CO ₂ -abhängige Sc <i>NCE103</i> Expression möglicher Phosphatasekandidaten	52
Abb. 9 Nachweis der Überexpression von Sc <i>NCE103</i> -His, Sc <i>CST6</i> -His und Sc <i>SCH9</i> -His mittels Western Blot	53
Abb. 10 Aufreinigung von rekombinantem ScNce103-His mittels IMAC	55
Abb. 11 Aufreinigung von rekombinantem ScCst6-His mittels IMAC und Größenausschlusschromatographie	56
Abb. 12 Anreicherung von Sc <i>SCH9</i> mittels IMAC	57
Abb. 13 Testung der anti-ScNce103 und anti-Cst6 Antikörperspezifität	59
Abb. 14 CO ₂ -abhängige ScNce103 Proteinlevel in <i>S. cerevisiae</i> WT, Δ <i>cst6</i> und Δ <i>sch9</i>	60
Abb. 15 Untersuchung der Sc <i>NCE103</i> Promoteraktivierung	61
Abb. 16 Nachweis der ScCst6 – ScSch9 – Interaktion durch Immunpräzipitation	63
Abb. 17 Sc <i>SCH9</i> Überexpression in <i>S. cerevisiae</i> WT	64

Abb. 18 ScSch9 phosphoryliert ScCst6 <i>in vitro</i>	65
Abb. 19 Nachweis der Überexpression von ScCST6 in <i>S. cerevisiae</i> WT mithilfe des GAL1 Promoters...	66
Abb. 20 Vergleich der ScCst6 Phosphorylierungsstellen in <i>S. cerevisiae</i> WT und $\Delta sch9$	68
Abb. 21 Nachweis der Überexpression von ScCST6 in <i>S. cerevisiae</i> $\Delta sch9$	69
Abb. 22 Phosphoablative Mutation von Cst6 an Position S266 beeinflusst ScNCE103 ^{CO2} Regulation	71
Abb. 23 Die Funktion von Sch9 ist konserviert in pathogenen Hefen.....	73
Abb. 24 Pkh1/2 vermittelt die CO ₂ -abhängige Aktivierung des ScSch9 – ScCst6 - Signalwegs	77
Abb. 25 Möglicher Zusammenhang zwischen CO ₂ -Adaptation und HOG-Signalweg	89
Abb. 26 Mögliche Regulationswege der Carboanhydrase-Expression unter verschiedenen CO ₂ - Bedingungen.....	91

9. Anhang

9.1. Zusätzliche Daten

Tabelle X1: ScNCE103 Expression aller getesteten Kinase- und Phosphatasemutanten

Aufgelistet sind die Mittelwerte der ScNCE103 Expression in 5% CO₂ und Luft mit jeweils dazugehörigen Standardabweichungen (SD). Zudem ist die Vervielfachung der Expression als Quotient aus Expression in Luft und 5% CO₂ dargestellt sowie dessen Standardabweichung. Alle Mutanten wurden mindestens 2x gemessen.

	ScNCE103 ^{CO₂}	SD	ScNCE103 ^{Luft}	SD	Luft/CO ₂	SD
S. c. WT	1,00		5,64	2,63	5,64	2,63
<i>Δakl1</i>	1,54	0,90	5,81	2,48	5,13	4,62
<i>Δalk1</i>	0,67	0,35	1,89	0,16	3,22	1,28
<i>Δalk2</i>	1,16	0,11	5,22	4,17	4,42	3,28
<i>Δark1</i>	1,66	0,92	3,31	2,67	2,87	3,19
<i>Δatg1</i>	0,77	0,14	2,84	1,93	3,51	1,85
<i>Δbck1</i>	1,42	0,78	5,36	1,30	4,16	1,38
<i>Δbub1</i>	1,52	0,64	13,11	3,99	9,14	2,78
<i>Δbud32</i>	3,38	0,79	36,54	8,97	10,85	1,55
<i>Δcdc55</i>	1,31	0,34	12,32	2,36	9,86	3,20
<i>Δchk1</i>	1,12	0,03	3,36	1,79	2,99	1,51
<i>Δcka1</i>	0,95	0,31	2,86	1,44	3,44	2,57
<i>Δcka2</i>	0,86	0,03	1,96	0,44	2,27	0,42
<i>Δcla4</i>	0,76	0,59	5,52	0,14	10,21	7,72
<i>Δcmk1</i>	0,75	0,21	2,64	1,09	4,05	2,96
<i>Δcmk2</i>	1,06	0,13	5,74	2,01	5,55	2,57
<i>Δcmp2</i>	1,49	0,45	3,33	1,61	2,16	0,42
<i>Δcna1</i>	1,35	0,68	3,94	3,07	2,68	0,93
<i>Δcnb1</i>	1,61	0,09	6,36	1,48	3,92	0,69
<i>Δcst6</i>	0,97	0,20	2,70	1,65	2,75	1,45
<i>Δctk1</i>	1,44	0,74	7,65	4,14	5,35	2,57
<i>Δctk2</i>	1,71	0,48	7,30	2,78	4,35	1,47
<i>Δctk3</i>	1,57	0,38	5,94	2,15	3,80	1,30
<i>Δdbf2</i>	1,34	0,32	5,88	1,81	4,34	0,32
<i>Δdbf20</i>	1,08	0,07	4,50	1,31	4,15	0,95
<i>Δdcr2</i>	0,88	0,25	3,01	0,70	3,46	0,20
<i>Δdun1</i>	0,79	0,27	3,01	1,40	3,76	1,35
<i>Δelm1</i>	1,24	0,08	3,76	0,50	3,06	0,60
<i>Δenv7</i>	1,10	0,09	5,79	2,29	5,37	2,53
<i>Δfpk1</i>	1,07	0,57	2,64	0,79	2,66	0,68
<i>Δfrk1</i>	1,01	0,10	4,63	0,61	4,58	0,16
<i>Δfus3</i>	1,34	0,32	4,35	0,08	3,34	0,75
<i>Δgal83</i>	0,81	0,37	2,51	0,34	3,37	1,13
<i>Δgcn2</i>	1,29	0,17	3,94	1,01	3,02	0,38
<i>Δgin4</i>	0,96	0,38	3,45	1,66	3,53	0,33
<i>Δgpa2</i>	0,84	0,01	5,44	5,04	6,53	6,12
<i>Δhal5</i>	1,21	0,37	2,27	1,13	1,97	1,08

	ScNCE103 ^{CO2}	SD	ScNCE103 ^{Luft}	SD	Luft/CO ₂	SD
<i>Δhog1</i>	1,07	0,34	4,18	1,07	3,91	1,41
<i>Δhrk1</i>	0,65	0,13	2,72	0,88	4,14	0,55
<i>Δhsl1</i>	1,65	0,19	4,02	2,59	2,54	1,87
<i>Δime2</i>	1,00	0,45	2,97	0,38	3,80	2,79
<i>Δire1</i>	1,02	0,58	2,59	0,13	3,07	1,88
<i>Δisr1</i>	0,79	0,26	4,16	2,01	6,03	4,56
<i>Δkcc4</i>	0,92	0,18	3,60	0,41	3,94	0,33
<i>Δkdx1</i>	1,62	0,06	4,20	2,51	2,57	1,46
<i>Δkin1</i>	0,82	0,31	3,16	2,01	3,99	2,23
<i>Δkin2</i>	1,17	0,00	3,34	1,73	2,85	1,48
<i>Δkin3</i>	1,53	0,42	4,12	0,24	2,82	0,94
<i>Δkin4</i>	1,28	0,04	5,28	2,04	4,09	1,47
<i>Δkin82</i>	0,93	0,14	3,21	0,59	3,45	0,12
<i>Δkkq8</i>	0,84	0,43	4,95	2,59	5,84	0,09
<i>Δkns1</i>	1,03	0,39	3,88	0,21	4,03	1,32
<i>Δksp1</i>	1,18	0,71	3,08	0,41	3,05	1,49
<i>Δkss1</i>	0,88	0,50	1,71	0,41	2,15	0,74
<i>Δlcb5</i>	0,78	0,31	2,86	1,38	3,60	0,33
<i>Δltp1</i>	1,09	0,05	3,68	0,54	3,35	0,33
<i>Δmck1</i>	1,73	0,86	6,47	4,03	4,24	3,16
<i>Δmek1</i>	1,21	0,01	3,92	0,82	3,23	0,64
<i>Δmih1</i>	1,45	0,57	3,76	0,51	2,98	1,45
<i>Δmkk1</i>	1,10	0,86	4,56	3,60	4,14	0,04
<i>Δmkk2</i>	0,94	0,23	4,50	3,43	5,37	4,95
<i>Δmrk1</i>	0,58	0,19	2,81	1,98	4,70	2,58
<i>Δmsg5</i>	1,11	0,30	3,60	0,37	3,31	0,56
<i>Δnem1</i>	0,97	0,39	3,79	0,37	4,32	2,11
<i>Δnnk1</i>	0,83	0,20	2,32	0,43	2,82	0,15
<i>Δnpr1</i>	0,89	0,50	3,81	0,22	5,01	2,56
<i>Δoca1</i>	1,57	0,47	5,72	2,54	3,55	0,55
<i>Δpbs2</i>	1,23	0,65	2,66	2,36	2,30	0,60
<i>Δpho13</i>	1,34	0,60	5,06	0,99	4,67	3,24
<i>Δpho85</i>	1,21	0,08	5,77	2,47	4,70	1,72
<i>Δpkh1</i>	0,85	0,39	2,09	0,83	2,49	0,18
<i>Δpkh2</i>	0,85	0,02	2,71	0,08	3,20	0,00
<i>Δpkh3</i>	0,69	0,48	1,84	0,47	3,21	1,57
<i>Δpkp1</i>	1,17	0,26	4,33	3,49	3,46	2,10
<i>Δpkp2</i>	1,54	1,29	2,96	1,20	2,74	1,81
<i>Δppg1</i>	0,96	0,20	3,48	0,14	3,71	0,65
<i>Δpph21</i>	1,14	0,68	5,64	4,49	4,57	1,22
<i>Δpph22</i>	1,69	0,75	6,10	1,85	4,28	3,01
<i>Δpph3</i>	0,89	0,16	3,06	1,91	3,72	2,84
<i>Δppq1</i>	1,01	0,05	2,88	0,18	2,86	0,34
<i>Δpps1</i>	0,73	0,18	4,58	0,58	6,41	0,78
<i>Δppt1</i>	1,05	0,03	3,81	0,59	3,62	0,65

	ScNCE103 ^{CO2}	SD	ScNCE103 ^{Luft}	SD	Luft/CO ₂	SD
<i>Δppz1</i>	1,53	0,73	4,20	1,22	2,89	0,59
<i>Δppz2</i>	1,13	0,18	5,11	3,86	4,31	2,73
<i>Δprk1</i>	0,93	0,54	2,70	0,02	3,47	2,00
<i>Δprr1</i>	1,46	0,58	4,05	2,83	2,71	1,19
<i>Δprr2</i>	1,03	0,21	3,24	1,31	3,07	0,66
<i>Δpsk1</i>	0,90	0,26	3,91	0,29	4,49	0,96
<i>Δpsk2</i>	0,80	0,02	3,41	1,77	4,30	2,32
<i>Δpsr1</i>	0,98	0,60	4,31	1,07	5,01	1,98
<i>Δpsr2</i>	1,35	0,44	3,54	1,54	2,58	0,30
<i>Δptc1</i>	1,31	0,74	7,53	3,47	7,57	6,60
<i>Δptc2</i>	0,96	0,25	1,74	0,88	1,80	0,78
<i>Δptc3</i>	1,58	0,42	4,52	0,53	2,91	0,44
<i>Δptc4</i>	1,12	0,06	3,88	0,49	3,47	0,25
<i>Δptc5</i>	0,84	0,03	3,30	0,88	3,94	1,20
<i>Δptc6</i>	1,15	0,27	5,79	3,76	4,74	1,97
<i>Δptc7</i>	1,30	0,62	2,77	0,72	2,33	0,92
<i>Δptk1</i>	0,94	0,23	2,41	1,49	2,43	0,97
<i>Δptk2</i>	2,44	2,09	8,65	9,08	2,98	0,97
<i>Δptp1</i>	2,07	0,72	3,99	2,64	2,13	1,51
<i>Δptp2</i>	0,72	0,25	3,45	0,77	5,36	2,98
<i>Δptp3</i>	1,05	0,25	3,91	0,74	3,92	1,66
<i>Δrck1</i>	1,04	0,26	2,66	0,16	2,65	0,82
<i>Δrck2</i>	0,96	0,28	3,24	0,30	3,47	0,71
<i>Δrim11</i>	1,78	0,51	3,24	0,24	1,91	0,68
<i>Δrim15</i>	1,03	0,34	4,30	2,72	3,96	1,34
<i>Δrtk1</i>	0,82	0,33	3,92	1,23	5,50	3,69
<i>Δrtr1</i>	0,90	0,44	9,62	5,15	10,57	0,61
<i>Δrts1</i>	1,55	0,79	3,56	0,90	2,47	0,68
<i>Δsak1</i>	0,56	0,04	3,13	1,27	5,50	1,88
<i>Δsap155</i>	1,17	0,08	7,61	0,78	6,52	0,22
<i>Δsap185</i>	1,30	0,14	4,06	0,58	3,13	0,11
<i>Δsap4</i>	1,71	0,46	6,54	6,03	3,39	2,45
<i>Δsat4</i>	1,01	0,20	2,08	0,98	2,22	1,27
<i>Δsch9</i>	3,55	1,55	6,12	2,98	1,91	0,70
<i>Δsdp1</i>	1,26	0,25	2,45	0,30	1,95	0,14
<i>Δsip1</i>	1,06	0,27	3,64	3,08	3,15	2,08
<i>Δsip2</i>	0,91	0,33	2,41	0,48	2,93	1,58
<i>Δsiw14</i>	1,25	0,14	4,85	5,79	3,64	4,23
<i>Δskm1</i>	1,10	0,08	3,08	0,67	2,80	0,42
<i>Δsks1</i>	1,02	0,01	3,41	0,32	3,32	0,29
<i>Δsky1</i>	1,08	0,80	2,07	2,21	1,76	0,78
<i>Δslt2</i>	0,93	0,05	4,92	1,64	5,33	1,95
<i>Δsmk1</i>	1,33	0,23	4,58	2,04	3,63	2,17
<i>Δsnf1</i>	1,29	0,47	6,14	2,80	5,31	2,82
<i>Δsnf4</i>	0,98	0,37	2,99	1,42	3,57	2,80

	ScNCE103 ^{CO2}	SD	ScNCE103 ^{Luft}	SD	Luft/CO ₂	SD
<i>Δspo7</i>	0,94	0,20	7,33	1,39	7,87	0,44
<i>Δssk2</i>	1,73	1,33	5,17	2,16	3,52	1,06
<i>Δssk22</i>	0,55	0,20	2,04	0,41	3,82	0,62
<i>Δssn3</i>	1,35	0,11	4,03	0,49	2,97	0,12
<i>Δste11</i>	1,20	0,84	4,51	3,27	4,01	1,58
<i>Δste20</i>	1,98	1,50	3,03	2,43	1,56	0,65
<i>Δste7</i>	1,79	0,74	5,21	4,14	2,93	1,69
<i>Δswe1</i>	1,18	0,20	5,90	5,11	4,70	3,55
<i>Δtda1</i>	1,73	0,19	4,17	1,67	2,47	1,23
<i>Δtel1</i>	1,35	0,78	2,68	0,13	2,35	1,27
<i>Δtor1</i>	1,51	0,37	10,48	4,96	7,78	5,27
<i>Δtos3</i>	0,91	0,72	2,04	0,17	3,16	2,31
<i>Δtpd3</i>	2,16	0,65	9,60	2,58	4,80	1,85
<i>Δtpk1</i>	1,30	0,12	2,65	0,76	2,07	0,77
<i>Δtpk2</i>	0,86	0,39	2,99	0,06	3,89	1,81
<i>Δtpk3</i>	1,17	0,66	2,76	1,88	3,03	2,13
<i>Δvhs1</i>	0,87	0,22	3,15	1,69	3,76	2,27
<i>Δyak1</i>	1,31	0,06	3,19	0,62	2,42	0,36
<i>Δych1</i>	1,14	0,56	4,78	2,44	4,17	0,08
<i>Δyck1</i>	1,10	0,14	4,01	2,35	3,58	2,05
<i>Δyck2</i>	1,82	0,98	6,04	4,28	3,23	1,33
<i>Δyck3</i>	0,75	0,08	3,85	1,82	5,02	1,90
<i>Δygz3</i>	0,89	0,02	2,99	0,50	3,35	0,47
<i>Δypk1</i>	0,92	0,47	6,37	0,19	8,04	4,30
<i>Δypk2</i>	1,19	0,76	7,30	7,81	5,07	3,31
<i>Δypk3</i>	1,04	0,13	4,84	3,82	4,74	3,81
<i>ΔYPL150W</i>	0,97	0,32	2,62	0,76	2,71	0,11
<i>Δyvh1</i>	1,70	0,82	5,51	0,73	3,77	2,24

9.3. Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen

Sharif M, Pews-Davtyan A, Lukas J, **Pohlers S**, Rolfs A, Langer P, Beller M (2014) Palladium-catalysed Suzuki–Miyaura coupling reactions of Bromhexine and Ambroxol. *Tetrahedron* 08/2014; 70(34):5128–5135.

Lukas J, Pockrandt AM, Seemann S, Sharif M, Runge F, **Pohlers S**, Zheng C, Gläser A, Beller M, Rolfs A, Giese AK (2015) Enzyme enhancers for the treatment of Fabry and Pompe disease. *Mol Ther.* Mar;23:456-64.

Böhringer M, **Pohlers S**, Schulze S, Albrecht-Eckardt D, Piegsa J, Weber M, Martin R, Hünninger K, Linde J, Guthke R, Kurzai O (2016) *Candida albicans* infection leads to barrier breakdown and a MAPK/NF-κB mediated stress response in the intestinal epithelial cell line C2BBE1. *Cell Microbiol.* Jul;18(7):889-904.

Pohlers S, Martin R, Krüger T, Hellwig D, Hänel F, Kniemeyer O, Saluz HP, Van Dijck P, Ernst J, Brakhage A, Mühlischlegel F, Kurzai O (2017) Lipid signaling via Pkh1/2 regulates fungal CO₂ sensing through the kinase Sch9. *MBio.* (in press)

Vorträge

Pohlers S, Hellwig D, Krüger T, Hänel F, Martin R, Mühlischlegel F, Kurzai O (2015) Cst6 as regulator of the carboanhydrase gene *NCE103* in yeast.

49. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., Jena, Deutschland

Pohlers S, Hellwig D, Krüger T, Hänel F, Martin R, Mühlischlegel F, Kurzai O (2016) Regulation of CO₂ adaptation in nonpathogenic and pathogenic yeast.

13th ASM Conference on *Candida* and Candidiasis, Seattle, USA

Poster

Pohlers S, Hellwig D, Mühlshlegel F, Kurzai O (2014) Regulation of the carboanhydrase gene *NCE103* in *C. glabrata* and *S. cerevisiae*.

4. Gemeinsamer Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e. V. und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) e. V., Dresden, Deutschland

Pohlers S, Hellwig D, Krüger T, Martin R, Mühlshlegel F, Kurzai O (2015) CO₂-dependent regulation of the carboanhydrase gene *NCE103* in yeast.

6. FEBS Advanced Lecture Course on Human Fungal Pathogens, La Colle sur Loup, Frankreich

Pohlers S, Hellwig D, Krüger T, Hänel F, Martin R, Mühlshlegel F, Kurzai O (2015) Cst6 as regulator of the carboanhydrase gene *NCE103* in yeast.

49. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e.V., Jena, Deutschland

Pohlers S, Hellwig D, Krüger T, Hänel F, Martin R, Mühlshlegel F, Kurzai O (2016) Regulation of CO₂ adaptation in nonpathogenic and pathogenic yeast.

13th ASM Conference on Candida and Candidiasis, Seattle, USA

9.4. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Oliver Kurzai bedanken, der mir die Chance gegeben hat meine Doktorarbeit durchzuführen und mir Arbeitsplatz und Ressourcen zur Verfügung gestellt hat. Seine fortwährende fachliche Unterstützung, die kontinuierliche Förderung eigenständigen wissenschaftlichen Arbeitens und die angenehme Arbeitsatmosphäre innerhalb seiner Arbeitsgruppe haben maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Ein großer Dank gilt Prof. Axel Brakhage für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Promotionsarbeit.

Weiterhin danke ich Dr. Ronny Martin und Dr. Kerstin Hünninger, die mir während der gesamten Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und immer wieder neue wissenschaftliche Ideen und Anregungen hatten. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Daniela Hellwig für ihre tolle Einarbeitung und Betreuung bedanken. Sie hat mir mit viel Geduld und wissenschaftlicher Expertise das zunächst fachfremde Promotionsthema nahe gebracht und mir bis dahin völlig unbekannte pilzspezifische Grundlagen begreiflich gemacht. Außerdem hat sie mein wissenschaftliches Arbeiten im Labor durch ihre einfallsreiche, flexible und effektive Art entscheidend geprägt.

Dr. Thomas Krüger und Dr. Frank Hänel danke ich für Ihre Kooperationsbereitschaft und die fachliche Unterstützung und Durchführung bei Massenspektrometrie und Autoradiographie.

Ganz besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Fungal Septomics für all die unvergesslichen Erlebnisse zu Day Outs, Geburtstags- und Weihnachtsfeiern, Ausflügen und gemeinsamen Kuchenrunden. Ihr seid mir auch außerhalb des Labors gute Freunde geworden und ein eindrucksvolles Beispiel dafür, wie sehr ein tolles Arbeitsklima die Promotion, vor allem in schwierigen Zeiten, erleichtern kann. Liebe Cindy, ich danke dir sehr für deine technische Unterstützung im Labor und deine unglaubliche Hilfsbereitschaft, wenn ich mich mal wieder in meinem täglichen Zeitplan übernommen habe. Der morgendliche Kaffee, der pünktlich zu Arbeitsbeginn fertig war, hat mir viele Arbeitstage erträglicher gemacht. Liebe Antje, du hast mich meine ganze Promotionszeit hinweg begleitet und mich, wenn mal wieder nichts funktionieren wollte, in gemeinsamen Kaffeepausen aufgeheitert. Ich bin stolz darauf, dass wir bei Cappuccino geblieben sind und nie zum Alkohol übergehen mussten. Unsere Überlegungen zu Plan B bei Ikea haben mich immer wieder aufgemuntert. Mittlerweile bin ich überzeugt davon, dass wir beide es doch weiter bringen werden als Hotdog-Stand und Småland. Liebe Ines, du hast immer für Zusammenhalt, gute Stimmung und volle Tanzflächen gesorgt und uns mit Einführung des Schrottwichtelns bleibende Erinnerungen beschert. Liebe Lysett, du hast definitiv frischen Wind in meine manchmal eingefahrenen Denkweisen gebracht, sowohl wissenschaftlich als auch privat. Liebe

Silke, vielen Dank, dass du dich geduldig um alle von mir so ungeliebten bürokratischen Angelegenheiten gekümmert hast.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die immer an mich geglaubt haben, nie daran zweifelten, dass ich meine Pläne verwirkliche und mir fortwährend zeigen, wie stolz sie auf mich sind.

Mein größter Dank gilt Marcel, der meine schlechte Laune ertragen hat, wenn Arbeitstage nicht so gut liefen, und meinen Sorgen und Problemen trotz völliger wissenschaftlicher Unkenntnis geduldig zugehört hat. Danke, dass du während der letzten Jahre ohne Beschwerden deutlich mehr Zeit als ich mit einem kranken Kind zu Hause verbracht hast und mir damit viel Zeit und Raum für die Arbeit gegeben hast. Lieber Marius, du musstest häufiger auf mich verzichten und warst nicht selten eins der letzten Kinder, die aus dem Kindergarten abgeholt wurden. All das hast du selbstverständlich und ohne Klagen hingenommen. Du hast mir so schnell wie kein anderer Ablenkung verschafft und gezeigt, dass auch andere Dinge zählen. Was hilft es zu grübeln, warum die Immunpräzipitation nicht klappt, wenn endlich ein richtiger Ritterhelm gebastelt werden muss? Oder der Lieblingsindianer schon wieder verschollen ist? Und manchmal hatte ich genau dann Geistesblitze...

Zuletzt möchte ich mich auch bei all meinen Freunden bedanken, die bereitwillig für den dringend nötigen Ausgleich zum Forschungsalltag sorgten.

9.5. Selbstständigkeitserklärung

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

Die vorliegende Dissertation habe ich selbstständig verfasst und alle dazu verwendeten Hilfsmittel und Quellen, sowie persönliche Mitteilungen angegeben.

Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials unterstützt haben, habe ich benannt und in der Danksagung erwähnt.

Alle Personen die bei der Anfertigung der Manuskripte beteiligt waren, sind in der Publikationsliste aufgeführt.

Dritte Personen haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen.

Diese Arbeit wurde bisher weder an der Friedrich-Schiller-Universität Jena noch an einer anderen Hochschule als Dissertation oder in Form einer Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Jena, 23. Januar 2017

Susann Pohlert