

Komparative Funktionsanalyse der GPI- spezifischen Metallophosphoesterasen Cdc1, Ted1 und Dcr2 aus *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Biologie

der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sabrina Friederichs

aus Clausthal-Zellerfeld

Marburg

2023

Diese Dissertation wurde im Zeitraum von März 2019 bis Juni 2023 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Mösch am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der Disputation: _____

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „**Komparative Funktionsanalyse der GPI-spezifischen Metallophosphoesterasen Cdc1, Ted1 und Dcr2 aus *Saccharomyces cerevisiae***“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient. Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort & Datum

Unterschrift

”There’s a high probability [of failure]... but statistically speaking, there’s always a chance for unlikely events to take place.”

Connor, Detroit Become Human

Abstract

In eukaryotes, biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI) and transport of GPI-anchored proteins from the ER to the plasma membrane or the cell wall are mediated by a complex processing and sorting network involving more than 20 known enzymes. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the metallophosphoesterases (MPEs) Cdc1 together with Ted1 and Dcr2 catalyze two essential steps of GPI-anchor processing. In one step, the ethanolaminephosphate moiety of mannose-2 (EtNP-2) of the GPI-core is removed by Ted1 in the ER, a reaction that is required for efficient ER export. In addition, EtNP-2 can be removed by Dcr2 in the Golgi apparatus. In another step, Golgi-localized Cdc1 removes the EtNP moiety from mannose-1 (EtNP-1) of the GPI-core, a reaction that is thought to be essential for sorting of GPI-anchored proteins from the plasma membrane to the cell wall. While a substantial body of genetic and cell biological evidence has uncovered the essential function of these three enzymes in protein sorting, potential specific roles of these MPEs during cell wall stress or biofilm formation has not been investigated in detail. In addition, the structural basis for specific substrate recognition and processing by these enzymes is largely unknown.

In the first part of this work, the specific functions of *CDC1*, *TED1* and *DCR2* genes during cell wall stress and biofilm formation were investigated by gene dosage variation and exposure of respective yeast strains to different cell wall perturbing agents or biofilm-inducing conditions. These investigations indicate that Cdc1 is specifically sensitive against the cell wall perturbing agents Congo red and Calcofluor white, while Ted1 and Dcr2 appear to be highly sensitive against the β 1-3-glucan synthase inhibitor Caspofungin. These findings can be explained by different substrate specificities of the three enzymes. In contrast, no specific function of the three MPEs was observed during biofilm formation.

In a second part, a structure-guided analysis of Cdc1, Ted1 and Dcr2 was performed, in order to identify residues that are essential for function of the enzymes. In summary, a total of 30 previously unknown essential residues were identified that could be involved in co-factor binding, substrate binding or structural integrity of the enzymes. In addition, a total of 15 further residues were found, which are required for full functionality of the proteins under cell wall stress.

In the last part, it was attempted to obtain a variant of Cdc1 with a Ted1-like function, in order to identify residues that might confer substrate specificity. By employing an *in vitro* evolution-based approach, a Cdc1 variant carrying 33 amino acid mutations (Cdc1^{MORF}) could be isolated, which

was able to complement the Zn^{2+} -dependent growth defect of a yeast strain lacking Ted1, but not the lethal growth phenotype caused by the absence of both Ted1 and Dcr2. This finding suggests that Cdc1^{MORF} does not exhibit an altered specificity towards binding and processing of EtNP-2, but might instead have acquired a so far unknown function conferring increased Zn^{2+} -resistance. Importantly, however, Cdc1^{MORF} was also not able to complement the lethal growth phenotype of a strain lacking Cdc1. By performing a fine analysis of the 33 mutations, this phenotype enabled the identification of further residues essential for the functionality of Cdc1.

Taken together, this work identifies structural hotspots on the surface of GPI-specific MPEs that appear to be involved in co-factor binding, substrate binding or structural integrity of the enzymes as well as residues that confer robust function under cell wall stress.

Zusammenfassung

Die Biosynthese von Glycosylphosphatidylinositol (GPI) und der Transport von GPI-verankerten Proteinen vom ER zur Plasmamembran oder der Zellwand wird in Eukaryoten durch ein komplexes Prozessierungs- und Sortierungsnetzwerk vermittelt, an dem mehr als 20 bekannte Enzyme beteiligt sind. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* katalysieren die Metallophosphoesterasen (MPEs) Cdc1 zusammen mit Ted1 und Dcr2 zwei wesentliche Schritte der GPI-Anker Prozessierung. In einem Schritt wird der Ethanolaminphosphat Rest der Mannose-2 (EtNP-2) des GPI-Kerns durch Ted1 im ER entfernt. Dies ist eine Reaktion, die für den effizienten Export aus dem ER erforderlich ist. Des Weiteren kann EtNP-2 auch durch Dcr2 im Golgi-Apparat entfernt werden. In einem weiteren Schritt entfernt das Golgi lokalisierte Cdc1 den EtNP Rest von Mannose-1 (EtNP-1) des GPI-Kerns. Diese Reaktion ist mutmaßlich essentiell für die Sortierung von GPI-verankerten Proteinen von der Plasmamembran zur Zellwand. Während die essentielle Funktion dieser drei Enzyme bei der Proteinsortierung durch eine Vielzahl genetischer und zellbiologischer Experimente aufgedeckt wurde, ist die spezifische Rolle der MPEs bei Zellwandstress oder Biofilmbildung noch nicht im Detail untersucht. Zudem ist die strukturelle Grundlage für die spezifische Substraterkennung und -verarbeitung durch diese Enzyme weitgehend unbekannt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die spezifischen Funktionen der Gene *CDC1*, *TED1* und *DCR2* bezüglich Zellwandstress und Biofilmbildung untersucht. Hierzu wurden Hefestämme mit verschiedenen Gendosen dem Wachstum unter verschiedenen Substanzen, die mit der Zellwand interfereieren oder unter der Biofilmbildung untersucht. Die durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass Cdc1 spezifisch sensitiv gegenüber den Zellwand einlagernden Substanten Kongorot und Calcofluorweiß ist, während Ted1 und Dcr2 Sensitivität gegenüber des β 1-3-Glucansynthase-Inhibitors Caspofungin zeigten. Diese Befunde lassen sich durch unterschiedliche Substratspezifitäten der drei Enzyme erklären. Im Gegensatz dazu wurde keine spezifische Funktion der drei MPEs während der Biofilmbildung beobachtet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine Struktur-basierte Analyse von Cdc1, Ted1 und Dcr2 durchgeführt, um für die Enzymfunktion essentielle Reste zu identifizieren. Insgesamt wurden 30 bisher unbekannte essentielle Reste identifiziert, die an der Bindung des Co-Faktors, der Substratbindung oder der strukturellen Integrität der Enzyme beteiligt sein könnten. Zudem wurden insgesamt 15 weitere Reste gefunden, die für die volle Funktion der Proteine unter Zellwandstress erforderlich sind.

Ziel des letzten Teils war es, eine Variante von Cdc1 mit einer Ted1-artigen Funktion zu erhalten, um Reste zu identifizieren, die möglicherweise die Substratspezifität vermitteln. Mit Hilfe *in vitro*-Evolution-basierter Ansätze konnte eine Cdc1-Variante mit 33 mutierten Aminosäuren (Cdc1^{MORF}) isoliert werden, welche dazu in der Lage war, den Zn²⁺-abhängigen Wachstumsdefekt eines Hefestammes ohne Ted1 zu komplementieren, nicht aber den letalen Wachstumsphänotypen in gleichzeitiger Abwesenheit von Ted1 und Dcr2. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Cdc1^{MORF} keine veränderte Spezifität für die Bindung und Prozessierung von EtNP-2 aufweist, sondern stattdessen eine bisher unbekannte Funktion erworben haben könnte, die eine erhöhte Zn²⁺-Resistenz vermittelt. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass Cdc1^{MORF} nicht mehr dazu in der Lage war, den letalen Wachstumsphänotypen eines Stammes ohne Cdc1 zu komplementieren. Durch eine Feinanalyse der 33 Mutationen konnte dieser Phänotyp zur Identifizierung weiterer funktioneller Reste von Cdc1 führen.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit strukturelle Hotspots auf der Oberfläche von GPI-spezifischen MPEs identifiziert werden, die an der Bindung von Co-Faktoren, Substraten oder der strukturellen Integrität der Enzyme beteiligt sind. Auch konnten Reste ermittelt werden, welche die robuste Funktion unter Zellwandstress gewährleisten.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Zusammenfassung	III
1. Einleitung	1
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – ein eukaryotischer Modellorganismus.....	1
1.2 Die Zellwandmorphologie von <i>S. cerevisiae</i>	3
1.3 Zellwandproteine aus <i>S. cerevisiae</i>	5
1.4 Metallophosphoesterasen in <i>S. cerevisiae</i>	9
1.5 Struktur der Metallophosphoesterasen Cdc1, Ted1 und Dcr2.....	11
1.6 Die Rolle von Cdc1, Ted1 und Dcr2 in der GPI-Transport- und Sortierungsmaschinerie.....	14
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
2. Ergebnisse	21
2.1 Einfluss der Gendosis von <i>CDC1</i> , <i>TED1</i> und <i>DCR2</i> auf Zellwachstum und Differenzierung	21
2.1.1 Herstellung von Hefestämmen mit unterschiedlicher <i>CDC1</i> -, <i>TED1</i> - und <i>DCR2</i> - Gendosis.....	21
2.1.2 Zellwachstum unter Zellwandstress.....	24
2.1.3 Biofilmbildung.....	27
2.2 Einfluss der Lipid-Remodelase Cwh43 auf die Funktion von Cdc1 und Ted1.....	29
2.2.1 Stammkonstruktion.....	29
2.2.2 Zellwachstum unter Zellwand- und Membranstress.....	30
2.2.3 Agaradhäsion und Biofilmbildung.....	32
2.3 Einfluss von <i>CDC1</i> und <i>TED1</i> auf das Zellwandproteom unter Zellwandstress.....	34
2.4 Rekombinante Produktion von Cdc1 und Ted1 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>C. thermophilum</i>	37
2.4.1 <i>In silico</i> Analyse der MPE-Domänen von Cdc1 und Ted1.....	38
2.4.2 Optimierung der rekombinanten Produktion von Cdc1 und Ted1 in <i>E. coli</i>	38
2.4.3 Rekombinante Produktion und Reinigung von ScCdc1 und ScTed1.....	40
2.5 Strukturbasierte funktionelle Analyse von Cdc1, Ted1 und Dcr2.....	42
2.5.1 Auswahl von Aminosäureresten zur Analyse.....	42
2.5.2 Identifizierung essentieller Aminosäurereste.....	45
2.5.3 Identifizierung von Aminosäureresten mit Stress-spezifischer Funktion.....	48
2.6 Reziproker Austausch der MPE-Domänenfunktion von Cdc1, Ted1 und Dcr2.....	51
2.7 Funktionelle Analyse der Cdc1- und Ted1-Orthologe aus dem filamentösen Pilz <i>C. thermophilum</i>	53
2.8 Veränderung der Funktion von Cdc1 mittels <i>in vitro</i> Evolution.....	56
2.8.1 Isolierung einer <i>CDC1</i> -Variante mit <i>TED1</i> -spezifischem, Zink ²⁺ -resistenten Phänotyp.....	56
2.8.2 Zuordnung der in Cdc1 ^{MORF} mutierten Reste zur Cdc1- und Ted1/ Dcr2-spezifischen Funktion.....	59
3. Diskussion	65
3.1 Zellwandstresse weisen auf unterschiedliche Substratspektren von Cdc1 und Ted1/ Dcr2 hin	65

3.2 Zink ²⁺ könnte die Dcr2 Aktivität beeinflussen.....	69
3.3 Die Spezifität von Cdc1, Ted1 und Dcr2 kann mit den hergestellten MPE-Chimären nicht übertragen werden.....	72
3.4 Strukturelle Grundlage der spezifischen Funktion von Cdc1, Ted1 und Dcr2.....	73
3.4 Konservierung der Cdc1- und Ted1-Funktion in <i>C. thermophilum</i>	79
3.6 Schlusswort und Ausblick.....	82
4. Material.....	84
4.1 Oligonukleotide.....	84
4.2 Stämme und Plasmide.....	95
4.2.1 <i>E. coli</i> Stämme.....	95
4.2.2 <i>S. cerevisiae</i> Stämme.....	96
4.2.3 Plasmide.....	99
4.2.4 Cdc1 ^{MORF}	108
4.3 Chemikalien, Puffer und Nährmedien.....	109
4.4 Antikörper, Stressoren und Antibiotika.....	112
4.5 Enzyme und Kits.....	113
4.6 Software.....	113
5. Methoden.....	115
5.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Mikroorganismen.....	115
5.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	115
5.1.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	115
5.1.2.1 Mating von <i>S. cerevisiae</i>	115
5.1.2.2 Sporulation und Tetraden Dissektion.....	115
5.1.3 Bestimmung der optischen Dichte.....	116
5.1.4 Anlegen von Dauerkulturen zur langfristigen Lagerung.....	116
5.2 Molekularbiologische Methoden.....	116
5.2.1 Herstellung von kompetenten Zellen und Transformationstechniken.....	116
5.2.1.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> nach (Mandel & Higa 1970).....	116
5.2.1.2 Herstellung kompetenten <i>E. coli</i> zur Elektroporation nach (Dower et al. 1988).....	117
5.2.1.3 Herstellung und Transformation von kompetenten <i>S. cerevisiae</i> Zellen nach (Knop et al. 1999).....	117
5.2.2 Isolierung von DNA.....	118
5.2.2.1 Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	118
5.2.2.2 Isolierung von genomischer DNA mittels LiOAc aus <i>S. cerevisiae</i> nach (Lööke et al. 2011).....	119
5.2.3 Vervielfältigung von DNA nach (Peake 1989) und PCR-basierte Klonierung.....	119
5.2.3.1 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....	119
5.2.3.2 Ortsspezifische Mutagenese PCR nach (Weiner et al. 1994).....	119
5.2.3.3 Colony Test-PCR mit <i>E. coli</i> (Bergkessel & Guthrie 2013).....	120
5.2.3.4 Herstellung von <i>S. cerevisiae</i> Deletionskassetten mittels PCR und Integration in das Genom (Janke et al. 2004).....	120
5.2.3.5 Test-PCR mit genomischer <i>S. cerevisiae</i> DNA.....	121
5.2.3.6 PCR basierte <i>in vitro</i> Evolution.....	122

5.2.3.7.1 Ungerichtete Mutagenese spezifischer ORFs mittels Error Prone PCR nach (Wilson & Keefe 2001).....	122
5.2.3.7.2 Identifizierung von Klonen mit Phänotyp.....	122
5.2.3 Klassische Klonierungstechniken.....	123
5.2.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	123
5.2.3.2 Fällung von DNA mit Ethanol.....	123
5.2.3.3 Restriktion von Plasmiden mittels DNA-Endonukleasen.....	123
5.2.3.4 Dephosphorylierung von 5-DNA-Enden.....	123
5.2.3.5 Eliminierung von Template-DNA mittels DpnI-Verdau.....	124
5.2.3.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	124
5.2.3.7 Mengenbestimmung von DNA mittels Nanodrop ND Spektrometer.....	124
5.2.3.8 Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase.....	124
5.2.3.9 Herstellung von Plasmiden mittels <i>in vivo</i> Ligation nach (Jansen et al. 2005).....	125
5.2.3.10 Sequenzanalyse von DNA nach (Sanger et al. 1977).....	125
5.3 Wachstumsanalysen mit <i>S. cerevisiae</i>	125
5.3.1 Wachstumsanalysen in Flüssigkultur.....	125
5.3.2 Wachstumsanalysen auf Festmedien.....	126
5.3.2.1 Biofilmbildung.....	126
5.3.2.2 Agaradhäsion.....	126
5.5 Proteinbiochemische Techniken.....	127
5.5.1 Herstellung von Zellwandextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	127
5.5.1.1 Extraktion von Zellwänden.....	127
5.5.1.2 Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie und Auswertung.....	128
5.5.2 Nachweis von rekombinanten Proteinen.....	129
5.5.2.1 Größenauftrennung von Proteinen mittels Denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	129
5.5.2.2 Coomassie Färbung.....	129
5.5.2.3 Western Blot Analyse.....	130
5.5.3 Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i> im analytischen Maßstab.....	130
5.5.4 präparative Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i>	131
5.5.5 Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC).....	131
5.5.6 Isolierung von Proteinen mittels Größenausschlusschromatographie.....	132
6. Referenzen.....	133
7. Anhang.....	152
8. Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnis.....	154
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	154
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	155
9. Danksagung.....	157
10. Lebenslauf.....	159

1. Einleitung

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* – ein eukaryotischer Modellorganismus

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein pilzlicher Organismus, der Anteil an vielen alltäglichen Prozessen hat. Neben traditioneller Braukunst und der Herstellung von Backwaren, wird die Bäckerhefe auch als Arzneimittel zur Behandlung von Reiseerkrankungen oder für kosmetische Zwecke verwendet. Als einfacher eukaryotischer Organismus ist *S. cerevisiae* jedoch auch im wissenschaftlichen Kontext ein sehr erfolgreiches System zur Erforschung zellulärer Prozesse. Der seit den Achtziger Jahren als Modellorganismus etablierte Pilz besitzt ein kompaktes, komplett sequenziertes Genom, welches sich über 16 Chromosomen erstreckt. Auf dem Genom befinden sich etwa 5300-5400 verschiedene Protein-codierende Gene (Mackiewicz *et al.* 2002). Die übersichtliche Genomgröße wie auch die leichten und vielfältigen DNA-Manipulationsmöglichkeiten, die für *S. cerevisiae* entwickelt wurden, machen den Pilz zu einem beliebten Modellorganismus.

Neben der grundlegenden Erforschung eukaryotischer, zellulärer Prozesse ist *S. cerevisiae* allerdings auch in weiteren Wissenschaftsfeldern von Interesse. Der Pilz weist beispielsweise viele essentielle Orthologe zum Menschen auf, die in etwa der Hälfte aller Fälle direkt funktionell übertragbar sind (Kachroo *et al.* 2015). Auch existieren Orthologe zwischen *S. cerevisiae* und dem Menschen, die mit Erbkrankheiten assoziiert sind (Botstein & Fink 2011). Dies macht *S. cerevisiae* auch in medizinischen Forschungsansätzen relevant. Im Kontext der synthetischen Mikrobiologie gibt es Ansätze zur Etablierung exogener Stoffwechselwege oder Verbesserung nativer Synthesewege in *S. cerevisiae* mit dem Ziel, den Pilz als Plattform zur Herstellung von industriellen Metaboliten wie beispielsweise Biokraftstoff zu verwenden (Kim *et al.* 2013; Liu *et al.* 2022). Im Jahr 2022 wurde *S. cerevisiae* von der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) zur Mikrobe des Jahres gekürt, was auf die bestehende Bedeutsamkeit des Modellorganismus im wissenschaftlichen Kontext hindeutet.

Die Bäckerhefe ist sowohl in haploider als auch in diploider Form lebensfähig (Abb. 1) (Herskowitz 1988). Das Zellwachstum wird in beiden Formen durch asymmetrische, mitotische Teilungen ermöglicht: aus einer Mutterzelle proliferiert mittels Sprossung eine Tochterzelle, welche anschließend durch Cytokinese abgeschnürt wird (Hartwell 1974).

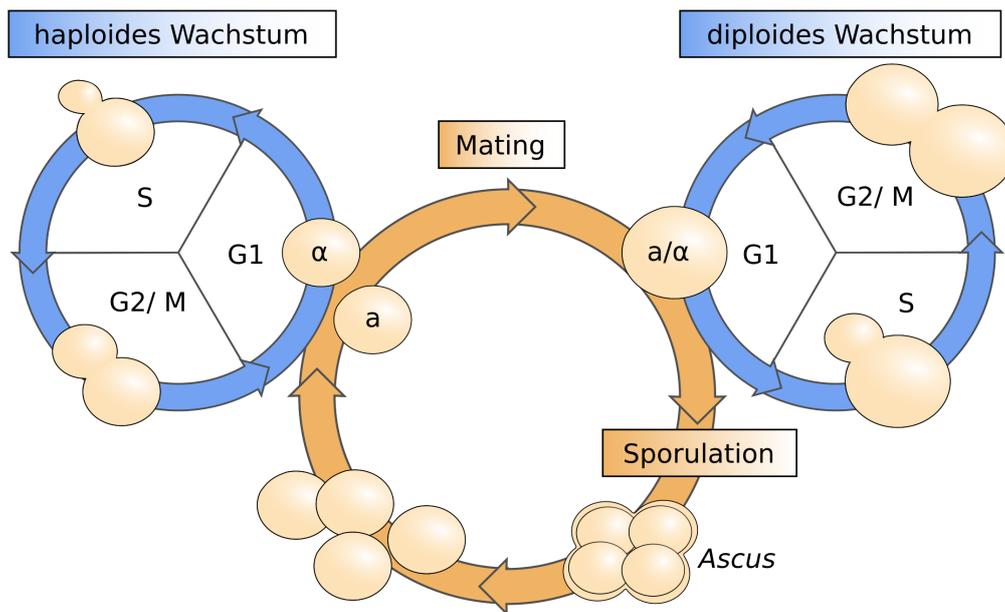


Abb. 1: Der Lebenszyklus von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae Zellen vermehren sich im haploiden und im diploiden Zustand durch asymmetrische Teilungen (blau). Zwei haploide Zellen verschiedenen Geschlechtstyps können sich paaren und diploide Zellen generieren. Bei schlechter Nährstoffversorgung sporulieren diploide Zellen und bilden einen *Ascus* mit bis zu vier haploiden Sporen aus (orange).

In der Natur findet man *S. cerevisiae* aufgrund der Fitness bedingten Vorteile eines doppelten Chromosomensatzes bevorzugt in diploider Form. In ihrer haploiden Form besitzt der heterothallische Pilz zwei Geschlechtstypen a und α , welche auf dem *MAT*-Lokus codiert sind (Klar 1987; Herskowitz 1988). Ist ein ausreichendes Nährstoffangebot gewährleistet, kann es zur Konjugation zweier Zellen verschiedenen Geschlechtstyps kommen. Hierzu senden die Zelltypen geschlechtsspezifische Pheromone (a -Pheromone bzw. α -Pheromone) in die Umwelt aus (Hagen *et al.* 1986; Jenness *et al.* 1986). Zudem besitzen beide Zelltypen Oberflächen-Rezeptoren, um die Pheromone des anderen Geschlechtstyps wahrnehmen zu können (Hagen *et al.* 1986; Jenness *et al.* 1986). Nimmt eine haploide Zelle die Pheromone des anderen Geschlechtstyps wahr, wird eine komplexe Signalkaskade aktiviert, welche zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1 Phase sowie zur Expression von paarungsspezifischen Genen führt (Schrick *et al.* 1997). Es kommt schließlich zur Agglutination, dann zur Plasmogamie, der Verschmelzung der Zellwände und schlussendlich zur Karyogamie, der Verschmelzung der Zellkerne (Terrance & Lipke 1981; Leberer *et al.* 1997; Sieber *et al.* 2023). Aus zwei konjugierten Zellen sprosst eine diploide Zelle, welche sich mitotisch fortpflanzt (Sieber *et al.* 2023). Diploide *S. cerevisiae* Zellen können je nach Nährstoffangebot in zwei unterschiedlichen Formen wachsen: in einer Hefeform und in einer filamentösen Form (Gimeno *et al.* 1992). Der Wechsel zwischen den beiden Formen ist stark reguliert (Gimeno *et al.* 1992; Kron & Gow 1995).

Filamentöses Wachstum kann durch einen Stickstoffmangel induziert werden (Mitchell 1994; Kron & Gow 1995). Es kommt zur Ausbildung invasiver Pseudohyphen, welche durch morphologisch längere, miteinander verkettete Zellen in Erscheinung treten (Gimeno *et al.* 1992; Gancedo 2001). Unter Kohlenstoff- und Stickstoffmangel sporulieren diploide *S. cerevisiae* Zellen (Mitchell 1994; Neiman 2011). Hierzu durchlaufen sie im Zellkern geschlossene meiotische Teilungen und bilden anschließend einen *Ascus* mit bis zu vier haploiden Sporen aus (Neiman 2005, 2011). Analog zur Ausbildung von Pseudohyphen reagieren auch haploide Zellen auf Stickstoffmangel durch die Ausbildung adhäsiver Wachstumsverbände (Brückner & Mösch 2012). Haploide homothallische *S. cerevisiae* Mutterzellen sind nach Durchlaufen einer mitotischen Teilung des Weiteren dazu in der Lage, ihren Geschlechtstyp zu wechseln (Jensen & Herskowitz 1984; Haber 1992).

S. cerevisiae ist taxonomisch in die Division der Schlauchpilze Ascomycoten, die Klasse der *Saccharomycetes* und die Familie der *Saccharomycetaceae* einzuordnen (Kurtzman 2003). Von *S. cerevisiae* existieren eine ganze Reihe verschiedener Wildtypisolate und Laborstämme, die sich sowohl geno- als auch phänotypisch stark unterscheiden können. So wurden beispielsweise im Jahre 2018 im Rahmen eines Screens 1011 verschiedene Isolate untersucht (Peter *et al.* 2018). Der im wissenschaftlichen Hintergrund populärste Stammhintergrund ist *S. cerevisiae* S288c (Mortimer & Johnston 1986). Dieser Stamm besitzt den Vorteil, dass er lediglich eine minimale Nährstoffversorgung benötigt und nicht flokkuliert (Mortimer & Johnston 1986). Für Zellwand spezifische Analysen eignet sich *S. cerevisiae* Σ 1278*b* durch seine Vielzahl an Zellwandprotein vermittelten Phänotypen besonders gut (van Mulders *et al.* 2009; Dowell *et al.* 2010).

1.2 Die Zellwandmorphologie von *S. cerevisiae*

Als eukaryotischer Organismus ist *S. cerevisiae* Zell-morphologisch kompartimentiert. Neben klassischen eukaryotischen Zellkompartimenten wie dem Zellkern, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Mitochondrien weisen pilzliche sowie pflanzliche und Algenzellen als Besonderheit zudem eine Zellwand auf. Obgleich die genaue Zusammensetzung der Zellwand je nach Wachstumsphase und -form variiert, kann ihre grundsätzliche Struktur in eine innere und eine äußere Schicht eingeteilt werden (Abb. 2) (Klis 1994).

Die innere Schicht der Zellwand ist etwa 70-100 nm dick (Cappellaro *et al.* 1994). Sie besteht aus einer dünnen, die Plasmamembran umgebenden Chitinschicht, die etwa 2 % der Zellwand ausmacht und an ein dichtes, komplexes Gebilde aus β 1-3 und β 1-6 verknüpften Glukanen (60 %) anschließt.

Die äußere Schicht der Zellwand ist im Gegensatz zur Inneren sehr dicht an Elektronen (Osumi 1998). Sie besteht aus Mannoproteinen, welche überwiegend hochglykosyliert sind (Klis 1994). Im Allgemeinen wird diesen eine Schutzfunktion zugesprochen, da sie die inneren Teile der Zellwand beispielsweise vor fremden Enzymen abschirmen (Zlotnik *et al.* 1984; Nobel *et al.* 1990).

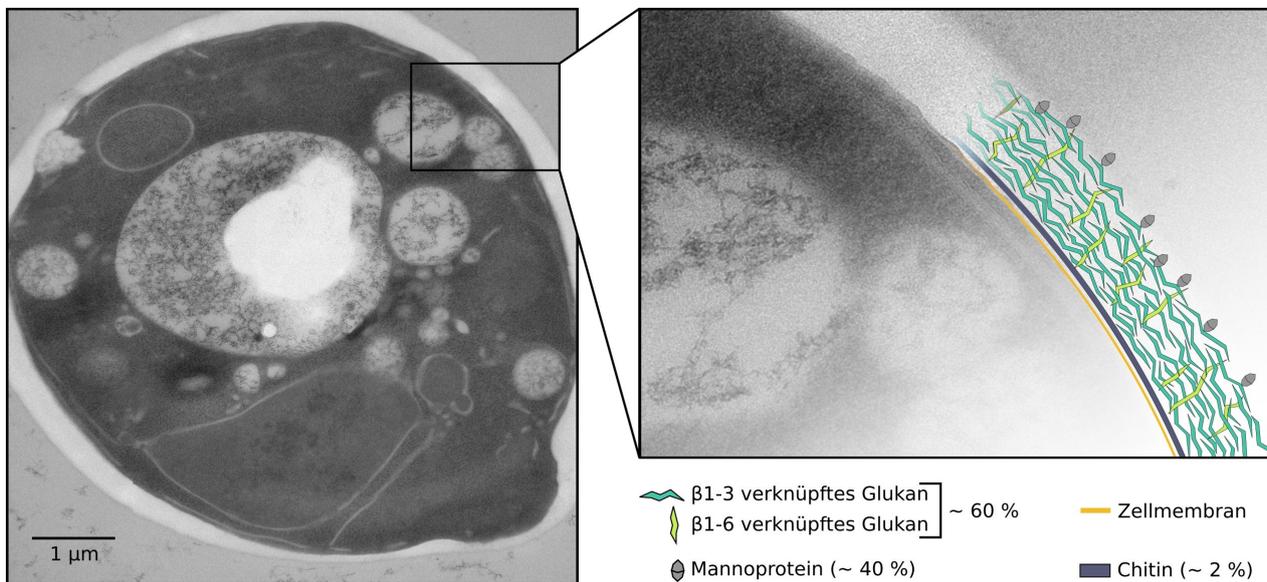


Abb. 2: Übersicht der *S. cerevisiae* Zellwand Morphologie

Elektronenmikroskopische Aufnahme des *S. cerevisiae* $\Sigma 1278b$ -Stamms YHUM3461. Die Zellplasmamembran sowie die einzelnen Bestandteile der Zellwand sind schematisch markiert.

Bei *S. cerevisiae* dient die Zellwand in erster Linie dem Schutz und der Formgebung einer Zelle und vermittelt vor allem mechanische Stabilität (Smith *et al.* 2000; Klis *et al.* 2002; Lesage & Bussey 2006). Dies ermöglicht sowohl die Toleranz gegenüber äußeren, mechanischen Reizen als auch die Erhaltung der Osmolarität des zelleigenen Cytoplasmas (Klis *et al.* 2006). Bei der Zellwand handelt es sich jedoch gleichzeitig auch um eine dynamische wie flexible Struktur, um verschiedene Wachstumsformen und Umweltanpassungen wie beispielsweise Mating, Sporulation oder die Ausbildung von Pseudohyphen zu gewährleisten (Morris *et al.* 1986; Smith *et al.* 2000; Klis *et al.* 2002). Dem zugrunde liegend sind die Synthese, Erhaltung und Anpassung der Zellwand essentielle Prozesse zum Überleben der Zelle (Lesage & Bussey 2006). Es konnten in der Vergangenheit 1200 Gene in *S. cerevisiae* identifiziert werden, welche an der Zellwandsynthese und der Erhaltung ihrer Integrität beteiligt sind (Groot *et al.* 2001; Verna *et al.* 1997; García *et al.* 2015). Teilt sich beispielsweise eine Hefezelle durch Sprossung, so sind allein an der Determinierung des Sprosspunktes sowie der Zellwandsynthese knapp 50 Gene direkt beteiligt (Cabib *et al.* 1998). Die Bildung eines Sprosses ist mit dem Abbau der Zellwand am Sprosspunkt verbunden, einem hoch regulierten Pro-

zess, der einerseits die Zellexpansion ermöglicht, ohne dass es zum Zerbersten der Zellen aufgrund des Zellturgors kommt (Levin 2005).

Zellen reagieren auf verschiedene Weise auf unterschiedliche Zellwandstresse. So weisen Hefen beispielsweise unter erhöhtem osmotischen Druck ein verhältnismäßig kleineres Zellvolumen und verdickte Zellwände auf. Diese Änderungen sind reversibel (Morris *et al.* 1986). Auch der Chitingehalt kann zur Erhaltung der Zellwandintegrität unter Zellwandstress oder spezifischen Nährstoffbedingungen stark ansteigen (Popolo *et al.* 1997; Bulik *et al.* 2003). Es gibt eine ganze Reihe verschiedener Substanzen, welche als Zellwand-Stressoren für Forschungszwecke oder als Antimycotika eingesetzt werden (García *et al.* 2015). Die Farbstoffe Calcofluorweiß und Kongorot sind nur zwei von vielen Beispielen dafür. Kongorot komplexiert mit Teilen des Glukannetzwerks der Zellwand und stört dort die Struktur (Vannini *et al.* 1983; Kopecká & Gabriel 1992). Calcofluorweiß bindet Chitin und stört auf diese Weise die strukturelle Integrität der Zellwand (Elorza *et al.* 1983). Ein anderes klassisches Beispiel ist das Antimykotikum Caspofungin, welches als Inhibitor der β 1-3 Glukansynthase, den Aufbau und die Instandhaltung der Zellwand stört (Deresinski & Stevens 2003), (Letscher-Bru & Herbrecht 2003). Analog zu diesen klassischen Zellwand-Stressoren existieren auch Substanzen, die Plasmamembran-Stress auslösen und den Zellwandintegritätssignalweg (CWI) aktivieren wie beispielsweise SDS (Igual *et al.* 1996). Auch können weniger spezifische Stressoren mit weitreichenden Konsequenzen auf grundlegende zelluläre Prozesse einen Einfluss auf die Zellwand haben wie beispielsweise Temperaturstress oder Stress durch Metallionen (Rowley *et al.* 1993; Vidair *et al.* 1996; Belcastro *et al.* 2005; Richter *et al.* 2010; Wysocki & Tamás 2010; Hosiner *et al.* 2014).

1.3 Zellwandproteine aus *S. cerevisiae*

Zellwandproteine in *S. cerevisiae* sind funktional ausgesprochen vielfältig. Sie spielen eine Rolle bei der Instandhaltung der Zellwandstabilität (Ragni *et al.* 2007) und haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Morphologie der Zellen (Ghanegolmohammadi *et al.* 2021). Als Interaktionsplattform der Zellumgebung befinden sich in der Zellwand jedoch auch sensorische Proteine, die beispielsweise andere Zellen oder spezifische Stresse erkennen können (Klis *et al.* 2006; Dranginis *et al.* 2007).

Bei einer großen Anzahl der Zellwandproteine aus *S. cerevisiae* handelt es sich um glykosylierte Mannoproteine (Klis 1994; Groot *et al.* 2005). Auf genomischer Ebene sind in *S. cerevisiae* 36

Mannoprotein-codierende Gene bekannt, von denen mehr als die Hälfte aus einer Genomduplikation hervorgegangen sind (Diss *et al.* 2017). In einer Zellwandproteomanalyse von *S. cerevisiae* konnten mehr als 20 verschiedenen Proteine identifiziert werden, welche kovalent an die Zellwand-Polysaccharide gebunden sind (Yin *et al.* 2005; Yin *et al.* 2007). Die exakte Zusammensetzung des Zellwandproteoms unterscheidet sich stark nach Entwicklungszyklus, Umweltbedingungen und *S. cerevisiae* Stamm (Smits *et al.* 1999; Aguilar-Uscanga & François 2003). So gibt es beispielsweise klinisch relevante *S. cerevisiae* Isolate, deren Zellwandproteome sich signifikant von *S. cerevisiae* S288c unterscheiden und Ähnlichkeit zu pathogenen Vertretern der *Saccharomycetaceae* wie beispielsweise *C. glabrata* zeigen (Hsu *et al.* 2015). Auch in Wachstumsverbänden wie Biofilmen herrscht beispielsweise ein deutlich verändertes Zellwandproteom: das Adhäsion Flo11 ist ein Zellwandprotein, welches unter anderem die Zell-Zell-Adhäsion ermöglicht und zentral für die Bildung von Biofilmen ist (Reynolds & Fink 2001).

Durch die hohe Diversität und variierende Zusammensetzung von Zellwandproteinen in *S. cerevisiae* werden diese durch verschiedenste Mechanismen in die Zellwand eingebaut (Lesage & Bussey 2006; Orlean 2012). Tatsächlich werden dabei nicht alle Proteine kovalent mit Bestandteilen der Zellwand verknüpft. So existiert beispielsweise eine Familie von Mechanosensorproteinen, die sogenannte Wsc-Familie, welche durch ihren Domänen-artigen Aufbau durch die Schichten der Zellwand ragen und mit einer einzelnen Transmembrandomäne in der Zellmembran verbunden sind (Kock *et al.* 2015). Dies ermöglicht die intrazelluläre Signalweiterleitung bei mechanischen Reizen und führt zur Aktivierung des Zellwandintegritäts-Signalweges (CWI) (Verna *et al.* 1997; Lodder *et al.* 1999).

Andere Proteine der Zellwand sind weder mit der Zellwand noch der Zellmembran verbunden. Sie werden mittels Disulfidbrücken an andere Zellwandproteine verknüpft (Klis *et al.* 2002). Ein Beispiel für Disulfidbrücken-verbundene Zellwandproteine ist das A-Agglutinin Aga2 (Watzel *et al.* 1988; Cappellaro *et al.* 1994).

Viele Zellwandproteine werden kovalent an Bestandteile der Zellwand verknüpft. So werden einige Proteine mithilfe einer Alkali-sensitiven Bindung an das β 1-3-Glukan der Zellwand verknüpft, wie beispielsweise die Familie der Pir-Proteine (Mrsä *et al.* 1997; Lesage & Bussey 2006). Die Pir-Proteine (*Proteins with Internal Repeats*) bilden eine Familie aus fünf Zellwandproteinen, welche sich durch ihre Domäne von sieben bis zehn sequenziellen Wiederholungen auszeichnet (Toh-e *et al.* 1993; Mrsä *et al.* 1997; Ecker *et al.* 2006). Es wird vermutet, dass sie mittels einer Esterbindung

zwischen einem glykosylierten Rest und einer Glukose des β 1-3-Glukans an die Zellwand gebunden sind (Ecker *et al.* 2006). Durch mehrere dieser Bindungen kommt es zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Zellwand (Klis *et al.* 2006).

Eine weitere große Gruppe kovalent mit der Zellwand verknüpfter Proteine wird mit Glykosylphosphatidylinositol (GPI) modifiziert und anschließend mit einem Teil des GPIs am β 1-6-Glukan der Zellwand verbunden (Nobel & Lipke 1994; Lu *et al.* 1995; Lesage & Bussey 2006). In *S. cerevisiae* sind mehr als 60 mutmaßliche Proteine bekannt, die mit GPI modifiziert werden (Caro *et al.* 1997; Groot *et al.* 2003). In *Candida albicans*, einer humanpathogenen Art der *Saccharomycetales*, wurden sogar fast doppelt so viele mutmaßliche GPI-verankerte Proteine (104 Stück) identifiziert (Groot *et al.* 2003). GPI-verankerte Zellwandproteine wie beispielsweise Adhäsine zum Anheften und Besiedeln von Wirtsschleimhautzellen gelten als große Virulenzfaktoren dieser Spezies (Calderone & Fonzi 2001). Dies verdeutlicht die Relevanz der Aufklärung der GPI-Anker Biosynthese auch im Zusammenhang mit Pathogenität und der Entwicklung neuer Antimykotika. Da die GPI Anker Biosynthese nur moderate Ähnlichkeit zwischen *S. cerevisiae* sowie humanpathogenen Hefen und dem Menschen aufweist (Karathia *et al.* 2011), stellt dieser Sekretionsweg einen möglichen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Antimykotika dar.

GPI-Anker sind Verbindungen aus strukturell komplexen Glykophospholipiden, die im ER posttranslational an Zellwand- und Membranproteine geknüpft werden (Pittet & Conzelmann 2007). Die Kernstruktur von GPI ist in allen Eukaryoten konserviert (Abb. 3) (Fankhauser *et al.* 1993; Takeda & Kinoshita 1995).

Sie besteht aus einem Trimannosylkern mit verschiedenen glykosidischen Bindungen (Man α 1-2Man α 1-6Man) (Fankhauser *et al.* 1993). An die erste der drei Mannose-Einheiten (Man-3) ist ein Ethanolaminphosphat (EtNP) gebunden, was für die kovalente Bindung des GPI-Ankers mit dem Zielprotein notwendig ist (Pittet & Conzelmann 2007; Kinoshita & Fujita 2016). An die letzte der Mannose-Einheiten (Man-1) ist α 1-4 glykosidisch ein Glukosamin (GlcNH $_2$) gebunden. Das Glukosamin ist α 1-6 glykosidisch an Phosphatidylinositol (PI) gebunden. Insgesamt ergibt sich daraus der GPI-Kern: EtNP-Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcNH $_2$ α 1-6Myo-Inositol-1-P-Lipid (Fankhauser *et al.* 1993; Kinoshita & Fujita 2016).

Der GPI-Kern kann verschiedene Lipide aufweisen (Paulick & Bertozzi 2008). Neben dem GPI Vorläuferlipid Phosphatidylinositol (PI) sind in *S. cerevisiae* für reife GPI-Anker zwei weitere Arten von Lipiden bekannt (Conzelmann *et al.* 1992; Fankhauser *et al.* 1993; Pittet & Conzelmann

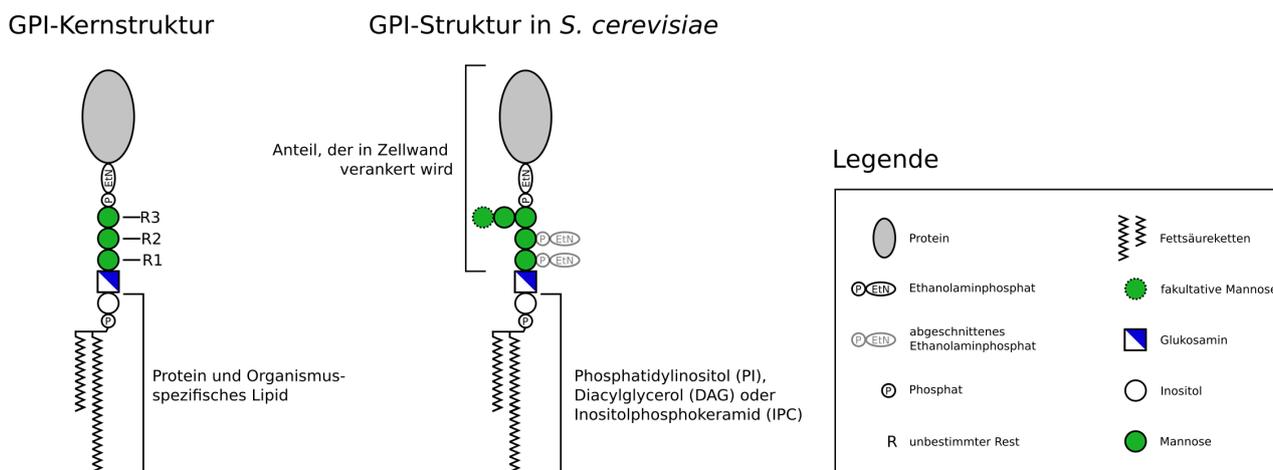


Abb. 3: Struktureller Aufbau von GPI

Die Kernstruktur von GPI ist in Eukaryoten konserviert. *S. cerevisiae* spezifische Reste sind ein bis zwei weitere Mannose-Einheiten an Man-3, sowie jeweils ein EtNP an Man-1 und Man-2. Bekannte Fettsäuren maturer *S. cerevisiae* GPI-Anker sind PI, DAG und IPC.

2007; Yoko-O *et al.* 2018). Neben Diacylglycerol (DAG) wird kann der Lipid Teil des Ankers auch aus Inositolphosphokeramid (IPC) bestehen (Fankhauser *et al.* 1993). So wurde beispielsweise für den GPI-Anker des Zellwandproteins Cwp2 gezeigt werden, dass er PI als Fettsäure beibehält, während der GPI-Anker des Gas1 Zellwandproteins Keramidstrukturen aufweist (Yoko-O *et al.* 2013; Yoko-O *et al.* 2018).

Neben verschiedenen Lipiden besitzt der GPI-Kern zudem Art-spezifische Seitengruppen, welche auf verschiedene Arten mit dem GPI-Kern verknüpft sein können (Paulick & Bertozzi 2008). Diese Seitengruppen machen die GPI-Biosynthese zu einem möglichen Ziel zur Entwicklung neuer Antimykotika (Takeda & Kinoshita 1995). In *S. cerevisiae* kann der Rest an Man-3 aus einer oder zwei weiteren Mannose-Einheiten (Man-4 und Man-5) bestehen, welche jeweils über eine α 1-2 an Man3 und eine α 1-3 oder α 1-2 glykosidische Bindung an Man4 geknüpft sind (Fankhauser *et al.* 1993; Paulick & Bertozzi 2008). An Man-1 und Man-2 befindet sich in *S. cerevisiae* GPI-Vorläufern ein EtNP, welche dort über Phosphodiesterbindungen verknüpft sind, in reifen GPI-Ankern jedoch nicht gefunden werden (Fankhauser *et al.* 1993; Canivenc-Gansel *et al.* 1998; Benachour *et al.* 1999). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass beide Reste während der GPI-Biosynthese durch Proteine mit Phosphoesterase-Aktivität eliminiert werden und dass dieser Prozess essentiell ist (Vazquez *et al.* 2014; Chen *et al.* 2021).

1.4 Metallophosphoesterasen in *S. cerevisiae*

Die Spaltung von Phospho(di)esterbindungen ist eine grundlegende enzymatische Reaktion, die in vielen zellulären Prozessen essentiell ist. Phosphodiesterbindungen bilden nicht nur das Rückgrat der DNA und RNA, indem sie Nukleotide miteinander verknüpfen, sie kommen auch in vielen anderen zellulären Komponenten wie beispielsweise in Form der Phosphoglykosylierung von Proteinen vor (Mehta *et al.* 1996; Matange *et al.* 2015).

In *S. cerevisiae* existieren eine ganze Reihe von Proteinen, welche dazu in der Lage sind, solche Bindungen zu spalten (Offley & Schmidt 2019). Ein klassisches Beispiel sind die Phosphodiesterasen Pde1 und Pde2, welche zur Superfamilie der „Zyklischen AMP Phosphodiesterasen“ gehören und folglich zyklisches AMP und zyklisches GMP als Substrate aufweisen (Ma *et al.* 1999; Thevelein & Winde 1999). Neben dieser bekannten Gruppe existiert unter anderem die Superfamilie der „Metallophosphoesterasen“ (MPEs) (IPR029052) und der nahezu deckungsgleichen „calcineurintypischen Phosphoesterasen“ (IPR004843) (Paysan-Lafosse *et al.* 2023). Beide Familien weisen grundsätzlich vielfältige und ubiquitär vertretene Proteine auf, welche Phosphomonoester- und Phosphodiesterbindungen spalten können (Koonin 1994; Aravind & Koonin 1998). Das namensgebende Protein Calcineurin ist eine domänenartig aufgebaute, Calcium- und Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Phosphatase, welche beispielsweise in Gehirn, Muskeln und dem Skelett von Säugetieren vorkommt (Balendiran *et al.* 1995). Proteine mit calcineurintypischer Domäne zeichnen sich durch ein einzigartiges, spezifisches Peptidmotif aus: DxH-(~25)-GdxxD-(~25)-GNHD/E (Bairoch 1993; Koonin 1994; Zhuo *et al.* 1994). Dieses Peptidmotif deckt sich mit dem MPE-Signaturmotif: DxH-x_n-GD-x_n-GNHD/E-x_n-H-x_n-GHxH (Goldberg *et al.* 1995; Matange *et al.* 2015). Beide Peptidmotive sind Teil der katalytischen Domäne von Phosphoesterasen und unter anderem für die Komplexierung zweier divalenter Kationen als Co-Faktor verantwortlich (Goldberg *et al.* 1995; Klabunde *et al.* 1996). Die erste gelöste Tertiärstruktur eines Proteins mit derartigen Domänenarchitektur war von der säugetierischen *Purple Acid Phosphatase* (Lindqvist *et al.* 1999). In der Ordnung der „Echten Hefen“ *Saccharomycetales* mit etwa 1000 bekannten Spezies (Suh *et al.* 2006) können 3164 mutmaßliche Proteine mit MPE-Domäne innerhalb der Interpro Datenbank gefunden werden (Paysan-Lafosse *et al.* 2023). In *S. cerevisiae* gibt es 22 bekannte Proteine, welche eine solche Domäne aufweisen (Paysan-Lafosse *et al.* 2023) (Abb. 4).

Durch ihr breites Substratspektrum weisen diese 22 Proteine trotz struktureller Ähnlichkeiten der MPE-Domäne eine Vielzahl verschiedener Funktionen im Zellzyklus und Metabolismus, beim Ma-

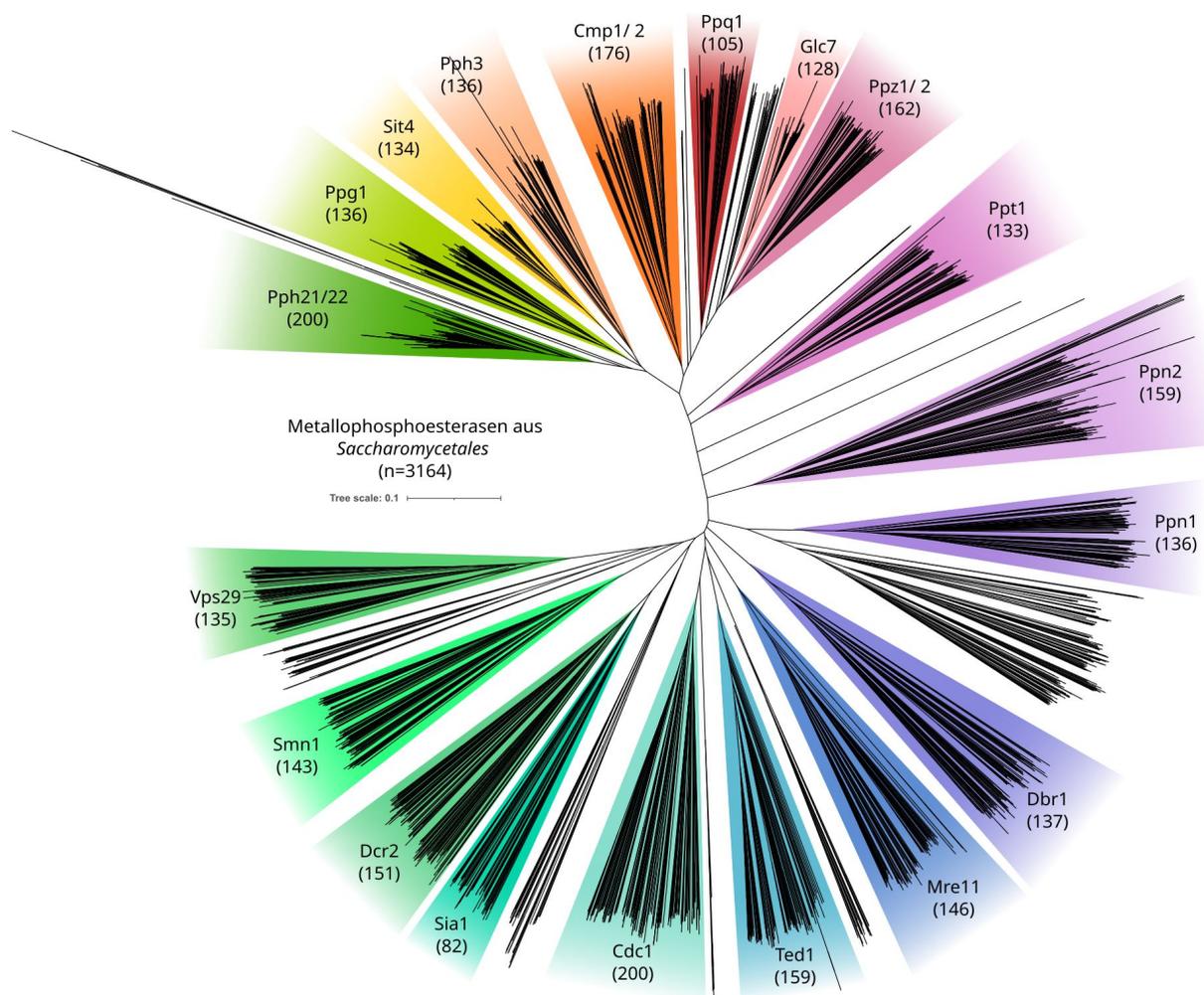


Abb. 4: Phylogenetischer Stammbaum von Proteinen mit MPE-Domäne aus *S. cerevisiae*

Alle Proteine mit MPE-Domäne aus dem Taxon Saccharomycetales wurden aus der Interpro Datenbank (Paysan-Lafosse *et al.* 2023) heruntergeladen und mittels ClustalW Algorithmus ein phylogenetischer Baum angefertigt. Der Baum wurde mittels iTOL visualisiert (Letunic & Bork 2021).

ting und bei spezifischen Stressantworten sowie der GPI-Biosynthese auf. So war von allen 22 Vertretern beispielsweise Dbr1 eines der ersten Proteine, welches in einem genetischen *Screen* identifiziert und dem eine Rolle als Phosphoesterase beim Entzweigen von RNA Lariatens zugesprochen wurde (Chapman & Boeke 1991; Zhuo *et al.* 1994).

Bei anderen Proteinen blieb ihre genaue Funktion lange unklar. So wurde Cdc1 beispielsweise bereits in den 70er Jahren im Zuge einer phänotypischen Charakterisierung Temperatur-sensitiver Allele identifiziert (Hartwell *et al.* 1973). Dennoch konnte seine spezifische Funktion erst etwa 40 Jahre später aufgeklärt werden (Vazquez *et al.* 2014). Im Gegensatz zu allen anderen Metallophos-

phoesterasen aus *S. cerevisiae* ist Cdc1 das einzig essentielle Protein (Giaever *et al.* 2002). Bei Cdc1 wie auch Ted1 handelt es sich um GPI-Remodelasen mit konservierter Phosphoesterase Domäne (Vazquez *et al.* 2014; Manzano-Lopez *et al.* 2015). Beide Proteine eliminieren während der GPI-Biosynthese ein EtNP von Man-1 (Cdc1) bzw. Man-2 (Ted1) des GPI-Ankers. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Phosphoesterase Dcr2 ebenfalls eine Rolle in der GPI-Anker Prozessierung spielt (Chen *et al.* 2021). Das Protein besitzt eine Ted1-redundante Funktion (Chen *et al.* 2021). Alle drei Proteine zählen laut Inerpro Datenbank Kategorisierung sowohl zu den Calcineurinartigen- als auch zu den Metallophosphoesterasen (Paysan-Lafosse *et al.* 2023).

1.5 Struktur der Metallophosphoesterasen Cdc1, Ted1 und Dcr2

Cdc1, Ted1 und Dcr2 weisen eine dreiteilige Domänenstruktur mit einer N-terminalen Region, einer MPE-Domäne und einer C-terminalen Region auf. Die N-terminale Region ist bei Cdc1 und Ted1 etwa gleich lang (~80 Aminosäuren) und besitzt laut Interpro Datenbankeintrag eine vorhergesagte Transmembrandomäne (Paysan-Lafosse *et al.* 2023). Dcr2 besitzt hingegen eine etwa 250 Aminosäuren lange N-terminale Region, für die bislang kein spezifisches Domänenmotif identifiziert wurde, die aber ebenfalls eine Transmembrandomäne beinhaltet (Chen *et al.* 2021). Die C-terminale Region unterscheidet sich stark zwischen den drei Proteinen. Während Dcr2 C-terminal nur wenige Peptide aufweist, so besitzt Ted1 eine weitere mutmaßliche Transmembrandomäne und Cdc1 zwei weitere Transmembrandomänen, welche mittels einer cytosolischen α -Helix verbunden sind.

Auch die MPE-Domänen der drei Proteine unterscheiden sich bezüglich ihrer Domänenarchitektur (Abb. 5). Die MPE-Domäne von Cdc1 erstreckt sich über die Aminosäurereste S87-D387. Dcr2 weist eine ähnlich lange MPE-Domäne von G246-L556 auf und Ted1 besitzt eine größere MPE-Domäne von D77-A448. Grundsätzlich können MPE-Domänen aus einer sehr diversen Anzahl von Sekundärstrukturelementen bestehen (Matange *et al.* 2015). Das zentrale β -Faltblatt-Sandwich wird bei Cdc1 und Dcr2 aus 11 β -Faltblättern gebildet. Bei Ted1 weist es 13 β -Faltblätter auf. Die unstrukturierten Bereiche zwischen den einzelnen Sekundärstrukturelementen unterscheiden sich in ihrer Länge stark zwischen den drei Proteinen. Cdc1, Ted1 und Dcr2 weisen mutmaßliche Orthologe im filamentösen Pilz *Chaetomium thermophilum* auf (UniProt 2023). Ted1 besitzt zudem ein menschliches Ortholog Pgap5 (Fujita *et al.* 2009). Das MPE-Motif kann in fünf verschiedene Blöcke (Block I – Block V) unterteilt werden (Matange *et al.* 2015). Block V zeigt die größte Sequenzvariation zwischen den gezeigten Proteinen. So unterscheidet sich *CtDcr2* an dieser Stelle (LSDH)

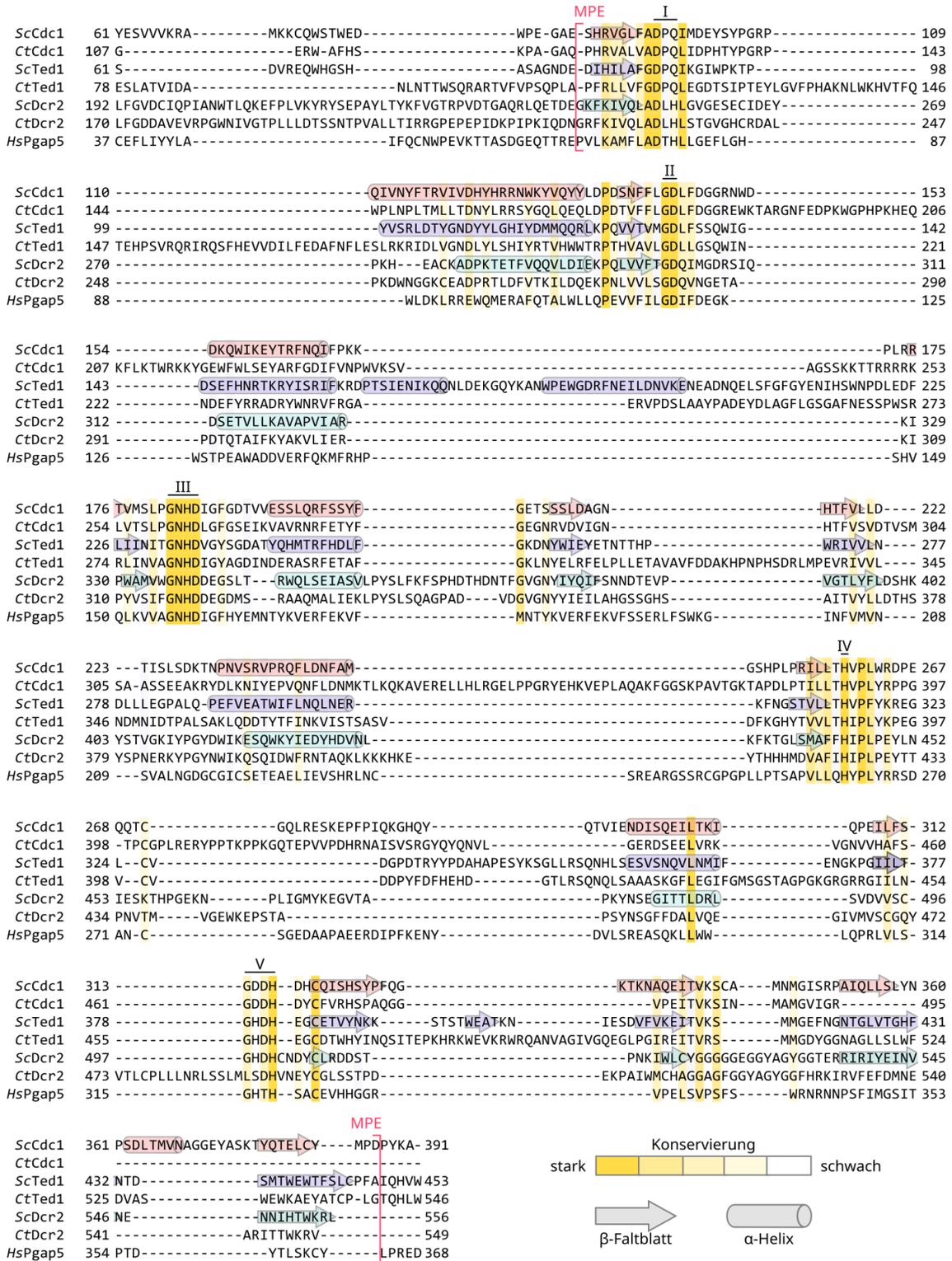


Abb. 5: Proteinsequenzalignment von Cdc1, Ted1 und Dcr2 aus *S. cerevisiae* und *C. thermophilum*
 Das Proteinsequenzalignment wurden mithilfe des ClustalOmega-Algorithmus (Thompson *et al.* 1994; Sievers *et al.* 2011; Madeira *et al.* 2019) hergestellt und anhand der Strukturen manuell angeglichen. Die Proteine ScCdc1 (P40986), CtCdc1 (G0SCJ2), ScTed1 (P40533), CtTed1 (G0S165), ScDcr2 (Q05924), CtDc2 (G0SH04) und HsPgap5 (Q53F39) wurden verwendet.

von *ScDcr2* (GHDH) und allen weiteren Proteinen, während *ScCdc1* (GDDH) und *ScTed1* (GHDH) jeweils die gleiche Sequenz wie ihre Orthologe aus *C. thermophilum* aufweisen. Die Tertiärstruktur der drei GPI-spezifischen Metallophosphoesterasen (Abb. 6) konnte über Kristallstrukturanalyse bislang nicht aufgeklärt werden. Jedoch existieren genaue 3D-Modelle von Cdc1 (P40986), Ted1

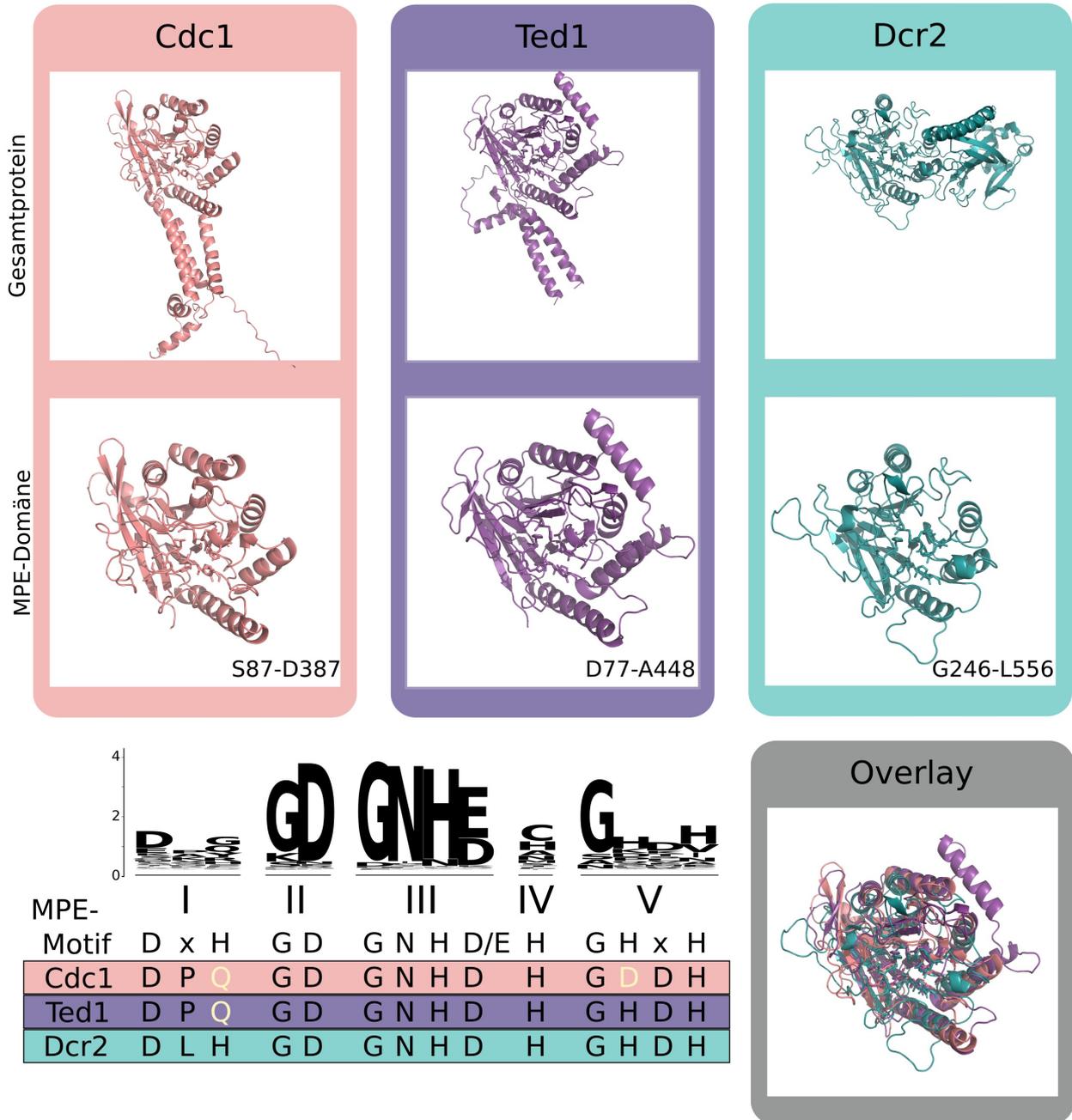


Abb. 6: 3D-Modell der Metallophosphoesterasen Cdc1, Ted1 und Dcr2

Tertiärstrukturmodelle von Cdc1, Ted1 und Dcr2 der AlphaFold Datenbank (Varadi *et al.* 2022). Die MPE-Domänengrenzen wurden mithilfe der auf Interpro hinterlegten Domänengrenzen (Paysan-Lafosse *et al.* 2023) und anhand der Struktur festgelegt. Das Sequenzlogo basiert auf den 3164 Proteinen mit MPE-Domäne aus *Saccharomycetales* von Interpro (Paysan-Lafosse *et al.* 2023) und wurde mithilfe des WebLogo Tools hergestellt (Crooks *et al.* 2004). Je häufiger ein MPE-Rest an einer bestimmten Stelle aufgetreten ist, desto größer ist er dargestellt. Abweichungen von Cdc1 und Ted1 vom MPE-Motif sind beige dargestellt.

(P40533) und Dcr2 (Q5924) in der AlphaFold Strukturdatenbank (Varadi *et al.* 2022). Oberhalb des β -Faltblatt-Sandwiches befinden sich die hoch konservierten Reste des MPE-Signaturmotifs. Diese Reste sind sich im Vergleich zwischen den drei Proteinen strukturell und positionell am ähnlichsten. Vom MPE-Zentrum entfernte Bereiche weisen abgesehen vom zentralen β -Faltblatt-Sandwich strukturell die stärksten Unterschiede auf. So Cdc1, Ted1 und Dcr2 weisen jeweils 5 positionell deckungsgleiche α -Helices auf. Darüber hinaus besitzt jedes der drei Proteine drei weitere einzigartige α -Helices.

Die Blöcke des MPE-Signaturmotifs sind innerhalb der *Saccharomycetales* verschieden stark konserviert. In Block II und Block III sind die konservierten Reste am ubiquitärsten vertreten. In Block V ist vor allem das erste Glycin des Motifs vertreten. Dagegen variieren die weiteren Reste des Blocks V innerhalb der *Saccharomycetales* stärker. Am häufigsten ist jedoch die kanonische MPE-Signatursequenz zu finden. Die größte Variation ist von Block I und Block IV zu finden. In Block IV ist Cystein in den *Saccharomycetales* im Gegensatz zum kanonischen Histidin der häufigste Rest. Cdc1 und Ted1 zeigen leichte sequenzielle Abweichung vom durchschnittlich in *Saccharomycetales* vorzufindenden MPE-Signaturmotif. In Block I des Motifs befindet sich bei Cdc1 und Ted1 ein Glutamin anstelle eines Histidins. Des Weiteren besitzt Cdc1 in Block V statt Histidin ein Aspartat. Der variable Rest in Block V ist bei allen drei Proteinen ein Aspartat. Der grundsätzlich in *Saccharomycetales* variabelste Block IV entspricht bei Cdc1, Ted1 und Dcr2 der kanonischen MPE-Signatursequenz.

1.6 Die Rolle von Cdc1, Ted1 und Dcr2 in der GPI-Transport- und Sortieremaschinerie

Die GPI-Biosynthese ist ein äußerst komplexer Prozess, der durch einen mehrstufigen, membranständigen Syntheseweg mit mehr als 20 Proteinen katalysiert wird (Orlean & Menon 2007) (Abb. 7). Da sowohl Plasmamembran-ständige als auch Zellwandproteine GPI-verankert sein können, muss der Transport und die Erkennung durch spezifische Enzyme stets gewährleistet sein.

Die Synthese von GPI beginnt auf der cytoplasmatischen Seite des ERs und wird anschließend in seiner Vorläuferform GlcN-PI durch einen energieintensiven enzymatischen Prozess in das ER Lumen umgelagert (Watanabe *et al.* 1999; Pomorski & Menon 2006; Orlean & Menon 2007). Danach erfolgt die Acylierung des Inositols durch Gwt1, wie auch das schrittweise Anfügen der Mannose-Einheiten und EtNP-Einheiten (Franzot & Doering 1999; Umemura *et al.* 2003; Komath *et al.*

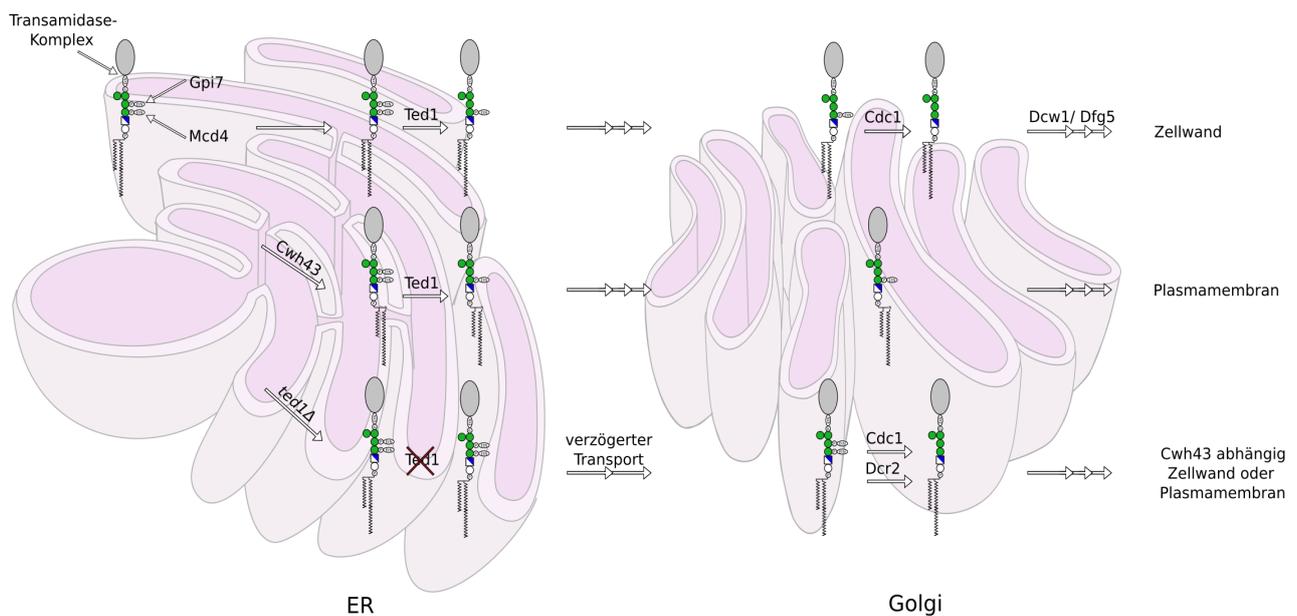


Abb. 7: Übersicht der GPI-Biosynthese

Die GPI-Anker Biosynthese beginnt im ER. Die EtNP-Transferasen Mcd4 und Gpi7 fügen dem GPI-Anker EtNP-1 und EtNP-2 zu. Die Verknüpfung von Zielprotein und GPI wird danach durch den Transamidase-Komplex vermittelt. Cwh43 initiiert den Austausch von PI zu IPC für GPI-verankerte Plasmamembranproteine. Ted1 eliminiert EtNP-1 bei allen GPI-verankerten Proteinen. *TEDI*-Deletionsstämme weisen verzögerten Transport GPI-verankerter Proteine aus dem ER auf. Dcr2 ist ebenfalls dazu in der Lage, EtNP-2 zu eliminieren. Cdc1 eliminiert im Golgi EtNP-1 bei GPI-verankerten Zellwandproteinen. Nur nach Eliminierung von EtNP-1 können die Proteine von Dcw1 und Dfg5 in die Zellwand eingebaut werden.

2018). Es ist nicht vollständig geklärt, in welcher Reihenfolge Mannose-Einheiten und EtNPs an den GPI-Kern geknüpft werden (Komath *et al.* 2018). Die Mannose-Einheiten werden durch die Mannosyltransferase I – IV mit dem GPI-Vorläufer verbunden (Orlean & Menon 2007; Komath *et al.* 2018). Das Anfügen der EtNPs erfolgt durch die katalytische Umsetzung von Phosphatidylethanolamin (PE) (Imhof *et al.* 2000). An Man-1 wird durch die essentielle EtNP-Transferase Mcd4 ein EtNP angefügt (EtNP-1) (Gaynor *et al.* 1999). Das Anfügen von EtNP-1 ist notwendig, um EtNP-3 mit dem GPI-Kern zu verknüpfen (Imhof *et al.* 2004). Die Bindung des für das Verknüpfen von GPI und Zielprotein essentielle EtNP-3 erfolgt anschließend durch Gpi13 (Flury *et al.* 2000; Taron *et al.* 2000). Für die Reaktion wird ein GPI-Kern aus mindestens vier Mannose-Einheiten benötigt (Taron *et al.* 2000). Als letztes erfolgt die Bindung von EtNP-2 an Man-2 durch die EtNP-Transferase Gpi7 (Benachour *et al.* 1999). Nach der Fertigung dieses GPI-Intermediates erfolgt schließlich die Verknüpfung von Zielprotein und GPI im ER durch den Transamidase-Komplex (Pittet & Conzelmann 2007; Fujita & Kinoshita 2010; Komath *et al.* 2018).

Proteine, welche mit GPI modifiziert werden sollen, weisen eine spezifische Domänenstruktur auf (Caras *et al.* 1987). Neben der N-terminalen Signalsequenz zum Transport in den sekretorischen Transportweg besitzen die Proteine zudem eine C-terminal lokalisierte Erkennungssequenz mit einem spezifischen Motif für die Verknüpfung mit GPI (Caras *et al.* 1987). Diese C-terminale Erkennungssequenz setzt sich aus einem hydrophoben Bereich, einer Zwischensequenz und der Spaltungs- bzw. Verknüpfungsstelle mit dem GPI-Anker (ω Site) zusammen (Caras & Weddell 1989; Moran & Caras 1991; Eisenhaber *et al.* 1998; Pittet & Conzelmann 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Aminosäuren in der ω -Minusregion die Lokalisation GPI-verankerter Proteine in der Zellwand oder Plasmamembran bestimmen können (Hamada *et al.* 1999; Frieman & Cormack 2003). Das Schneiden des Proteins an der ω Site sowie das Verknüpfen mit dem EtNP-3 des GPI-Ankers durch eine Amidbindung erfolgt durch den Transamidase Komplex (Pittet & Conzelmann 2007; Fujita & Kinoshita 2010; Kinoshita 2016). Der Transamidasekomplex besteht insgesamt aus fünf Untereinheiten (Gaa1, Gab1, Gpi8, Gpi16, Gpi17) (Ohishi *et al.* 2000; Fraering *et al.* 2001; Ohishi *et al.* 2001; Hong *et al.* 2003).

Nach der Verknüpfung von GPI und Protein erfolgt eine komplexe Prozessierungs- und Sortiermaschinerie, bevor die GPI-verankerten Proteine ihre finale Lokalisation in der Plasmamembran oder Zellwand erreichen. Die Lokalisation vieler Enzyme, die Teil dieses komplexen GPI-Sekretionsnetzwerks sind und ihr Zweck sind bis heute nicht vollständig geklärt (Tashima *et al.* 2006; Losev *et al.* 2008; Yofe *et al.* 2016; Yang & Banfield 2020). Die Sortierung GPI-verankerter Proteine beginnt bereits im ER (Muñiz & Riezman 2000; Muñiz *et al.* 2001). Die dort lokalisierte GPI-Remoldase Cwh43 ist am Austausch von PI zu Keramid beteiligt (Ghugtyal *et al.* 2007; Umemura *et al.* 2007; Yofe *et al.* 2016). Dieser Austausch wird benötigt, um die GPI-verankerten Proteine schon im ER in verschiedene ER Exit Sites (ERES) zu sortieren (Rodriguez-Gallardo *et al.* 2022). Er dient außerdem als Lokalisierungssignal des GPI-verankerten Proteins für die Plasmamembran (Yoko-O *et al.* 2018). Es konnte gezeigt werden, dass EtNP-1 und EtNP-2 für die Cwh43-Aktivität benötigt werden und dass eine Deletion von *CWH43* zu verhältnismäßig höheren Mengen von GPI-verankerten Proteinen im ER führt (Benachour *et al.* 1999; Zhu *et al.* 2006; Yoko-O *et al.* 2013). Interessanterweise ist das zu Cwh43 funktionelle Ortholog aus dem Menschen Pgap2 vorrangig im Golgi und nur in geringen Mengen im ER lokalisiert (Tashima *et al.* 2006).

Vor dem Export der GPI-verankerten Proteine aus dem ER kommt es zur Eliminierung von EtNP-2 durch die Metallophosphoesterase Ted1 (Manzano-Lopez *et al.* 2015). Ted1 erkennt sowohl GPI-

Anker mit PI als auch jene mit Keramidstrukturen, die zuvor durch Cwh43 prozessiert wurden (Manzano-Lopez *et al.* 2015; Rodriguez-Gallardo *et al.* 2022). *TEDI*-Deletionsstämme weisen einen verzögerten Transport GPI-verankerter Proteine und eine Akkumulation ebendieser im ER auf (Yoko-O *et al.* 2018). Dies führt zur Aktivierung der *Unfolded Protein Response* (UPR) im ER (Jonikas *et al.* 2009). Interessanterweise kann dieses Phänomen nicht in *ted1Δ cwh43Δ*-Zellen beobachtet werden (Yoko-O *et al.* 2018). Der GPI-Anker dient als Signal für den Export der Proteine in COP II Vesikeln in den Golgi-Apparat (Doering & Schekman 1996). Hierzu erkennt und bindet der Transmembran Cargo Rezeptor P24 Komplex GPI-verankerte Proteine ohne EtNP-2 (Manzano-Lopez *et al.* 2015). Da somit die Eliminierung von EtNP-2 notwendig für einen effizienten Transport der GPI-verankerten Proteine ist, wird angenommen, dass die Ted1-Funktion einen Qualitätskontrollmechanismus darstellt (Haass *et al.* 2007). Missgefaltete GPI-verankerte Proteine im ER werden im Gegensatz zu anderen Proteinen nicht vorrangig über die ER-assoziierte Degradation (ERAD) abgebaut (Fujita *et al.* 2006; Goder & Melero 2011). Der Transport GPI-verankerter Proteine in COP II Vesikeln aus dem ER in den Golgi Apparat erfolgt getrennt von anderen Proteinen (Muñiz *et al.* 2001). Im Golgi finden weitere Modifikationen des GPI-Glykans und der Fettsäuren statt (Sipos *et al.* 1995; Reggiori *et al.* 1997). So kommt es beispielsweise zum Anknüpfen von Man-5 bei etwa 20-30 % aller GPI-Anker durch ein bisher unbekanntes Protein (Sipos *et al.* 1995; Pittet & Conzelmann 2007).

Die Metallophosphoesterase Cdc1 eliminiert im Golgi EtNP-1 vom GPI-Anker (Vazquez *et al.* 2014). Das Abschneiden des EtNP-1 Restes ist mutmaßlich essentiell für die Erkennung durch Dfg5 und damit für den Einbau in die Zellwand (Vazquez *et al.* 2014; Vogt *et al.* 2020). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Eliminierung von EtNP-1 tatsächlich die essentielle Funktion von Cdc1 ist (Vazquez *et al.* 2014). Es wird angenommen, dass Cdc1 keine Cwh43-prozessierten GPI-Anker mit Keramid erkennt und so als Teil der GPI-Sortierungsmaschinerie zur finalen Trennung von GPI-verankerten Zellwand- und Plasmamembranproteinen führt (Vazquez *et al.* 2014; Essen *et al.* 2020; Vogt *et al.* 2020).

Des Weiteren eliminiert Dcr2 im Golgi Apparat analog zu Ted1 EtNP-2 Reste von GPI-Ankern (Chen *et al.* 2021). Somit besitzen Ted1 und Dcr2 bezüglich der Eliminierung von EtNP-2 die gleiche Funktion. Die Doppeldeletion von *TEDI* und *DCR2* zu einem synthetisch letalen Phänotypen (Chen *et al.* 2021). GPI-verankerte Proteine können auch ohne die Eliminierung von EtNP-2 bis hin zur Plasmamembran transportiert werden, führen dort aber zur Aktivierung des CWI und schließlich

zum Spindelassemblierungskontrollpunkt (Chen *et al.* 2021). Für den pilzlichen Organismus *Aspergillus fumigatus* konnte gezeigt werden, dass EtNP-2 essentiell für den korrekten Transport und die Lokalisation von GPI-verankerten Zellwandproteinen ist (Ouyang *et al.* 2019).

Nach dem Transport zur Plasmamembran werden GPI-verankerte Zellwandproteine, welche zuvor von Cdc1 prozessiert wurden, durch die Mannosidasen Dcw1 und Dfg5 mit dem β 1-6 verknüpften Glukanen der Zellwand verknüpft (Kitagaki *et al.* 2002; Vazquez *et al.* 2014; Vogt *et al.* 2020).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Mit der Eliminierung von EtNP-1 und EtNP-2 während der GPI-Anker Biosynthese weisen die Metallophosphoesterasen Cdc1, Ted1 und Dcr2 essentielle Funktionen in der komplexen Prozessierungsmaschinerie GPI-verankerter Proteine auf. Dennoch ist bislang wenig darüber bekannt, wie die Proteine spezifische Substrate erkennen. Insbesondere ist nicht geklärt, wie Cdc1 und Ted1/Dcr2 zwischen EtNP-1 und EtNP-2 unterscheiden und wie Cdc1 zwischen GPI-verankerten Zellwand- und Plasmamembranproteinen unterscheidet. Obwohl in den letzten Jahren immer neue und detailliertere Modelle bezüglich der GPI-Anker Biosynthese und dem Transport GPI-verankerter Proteine veröffentlicht wurden, sind viele Wechselwirkungen von Cdc1, Ted1 und Dcr2 in der komplexen Sortierungsmaschinerie bislang nicht verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe einer systematischen phänotypischen Analyse das aktuelle Modell zur Sortierung und Prozessierung GPI-verankerter Proteine zu verifizieren und zu erweitern. Auch sollten Cdc1, Ted1 und Dcr2 zur vergleichenden Analyse phänotypisch charakterisiert werden. Die Identifizierung der Substratspektren von Cdc1 und Ted1 sollte zudem Aufschluss über spezifische Substrate der beiden Proteine liefern.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Lösung der Tertiärstruktur von Cdc1 und Ted1, um bereits veröffentlichte Modelle der beiden Proteine zu validieren und eine Grundlage für die strukturbasierte Analyse der Proteine zu setzen. Diese strukturbasierte Analyse sollte in einem geeigneten System dazu dienen, essentielle Reste von Cdc1, Ted1 und Dcr2 zu identifizieren und funktional in Hinblick auf Substratbindung, Metallbindung und strukturelle Integrität zu kartieren. Die komparative Analyse der drei Proteine sollte auch eine Kartierung im Hinblick auf Bereiche der Proteine, welche eine Kernfunktion und welche eine spezifische Funktion aufweisen, ermöglichen. Des Weiteren sollten durch die Komplementationsanalyse mit gezielten MPE-Chimären und durch einen *in vitro* Evolutionsansatz Proteinreste und -domänen identifiziert werden, welche einen Einfluss auf die

Substratspezifität besitzen. Die Komplementationsanalyse mithilfe mutmaßlich funktioneller Orthologe von Cdc1 und Ted1 sollte Aufschluss über speziesübergreifende Konservierung der Funktion beider MPEs liefern.

2. Ergebnisse

2.1 Einfluss der Gendosis von *CDC1*, *TED1* und *DCR2* auf Zellwachstum und Differenzierung

2.1.1. Herstellung von Hefestämmen mit unterschiedlicher *CDC1*-, *TED1*- und *DCR2*-Gendosis

Bislang ist nicht geklärt, inwieweit *Ted1* und *Dcr2* unabhängig voneinander funktionieren und ob es Unterschiede zwischen *Cdc1*, *Ted1* und *Dcr2* bezüglich Gendosis abhängiger Phänotypen gibt. Um mögliche Unterschiede zwischen den drei MPEs charakterisieren zu können, wurden verschiedene Hefestämme hergestellt, in denen die Gendosis von *CDC1*, *TED1* und *DCR2* gezielt verändert wurde. Hierzu wurden zunächst die chromosomalen Kopien von *CDC1*, *TED1* und *DCR2* deletiert und durch verschiedene Plasmid-basierte Wildtyp Gene mit unterschiedlichem Rückgrat und Kopienzahl ersetzt. Da sowohl die Deletion von *CDC1* als auch die gleichzeitige Deletion von *TED1* und *DCR2* letal sind, wurden die gewünschten Stämme über die Generierung diploider Zellen mit anschließender Sporulation und Tetradendisektion hergestellt. (Abb. 8).

Da für *TED1* lediglich im S288c-Stammhintergrund gezeigt wurde, dass das Gen nicht essentiell ist, wurde zunächst als Kontrolle *TED1* in einem diploiden *S. cerevisiae* $\Sigma 1278b$ -Stamm deletiert (*TED1/ted1 Δ*) und dieser Stamm anschließend sporuliert. Das Tetradenwachstum der *TED1/ted1 Δ* Stämme zeigte vier lebensfähige Sporen. Dies zeigt, dass es sich bei *TED1* auch im $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund um ein nicht-essentielles Gen handelt. Anschließend wurde in zwei haploiden $\Sigma 1278b$ -Stämmen verschiedenen Geschlechtstyps das *TED1*-Gen deletiert und die Stämme gekreuzt. In diesem Stammhintergrund wurde zusätzlich eine Kopie von *DCR2* deletiert (*ted1 Δ /ted1 Δ* , *DCR2/dcr2 Δ*), sodass der Stamm genotypisch lediglich eine funktionale Kopie von *DCR2* und keine Kopie von *TED1* enthielt. Das Tetradenmuster dieses Stamms zeigte zwei lebensfähige Sporen mit *ted1 Δ DCR2* Genotyp und für zwei Sporen den letalen *ted1 Δ dcr2 Δ* -Genotyp. Das gleiche Tetradenmuster wurde nach der Einzeldelation von *CDC1* in einem diploiden Wildtyp-Stamm (*CDC1/cdc1 Δ*) zur analogen Stammkonstruktion sichtbar.

Im nächsten Schritt wurde in die diploiden Stämme mit genomischen Deletionen ein *Rescue*-Plasmid eingebracht. Dieses enthält *TED1* bzw. *CDC1* unter seinem nativen Promotor und Terminator sowie das *URA3*-Gen zur Selektion. Durch eine Deletion in der *CEN*-Region des *Rescue*-Plasmids

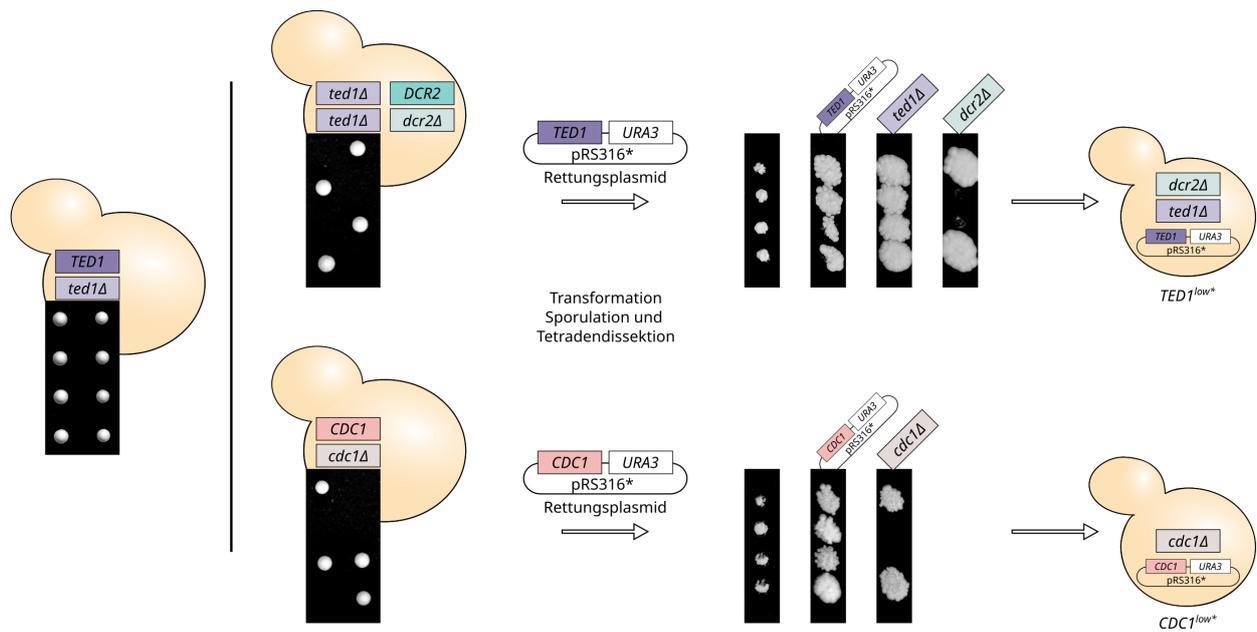


Abb. 8: Konstruktion von *S. cerevisiae* Stämmen zur Etablierung eines *Plasmid Shuffling* Systems für *Cdc1*, *Ted1* und *Dcr2*

CDC1, *TED1* und *DCR2* wurden nach (Janke *et al.* 2004) mit verschiedenen Resistenzkassetten deletiert um drei diploide Stämme mit folgenden Genotypen zu erhalten *CDC1/cdc1Δ::kanMX4*, *TED1/ted1Δ::NatNT2* und *ted1Δ::NatNT2/ted1Δ::NatNT2* *DCR2/dcr2Δ::hphNT1*. Die Stämme wurden sporuliert, um zu zeigen, dass die deletierten Gene essentiell im verwendeten Σ 1278b-Stammhintergrund sind. Nach Transformation der *Rescue*-Plasmide in den *CDC1/cdc1Δ*-Stamm sowie den *ted1Δ/ted1Δ* *DCR2/dcr2Δ*-Stamm wurden die Sporen auf den Erhalt des *Rescue*-Plasmids sowie auf die gezeigten Gendeletionen durch Replikatlattierungen auf entsprechenden Selektionsmedien überprüft.

kommt es zu einer höheren Verlustrate. Diese Plasmide (durchschnittlich 1 Kopie pro Zelle und instabile Weitergabe) wurden für die Stammkonstruktion verwendet, da sie ermöglichen einen effizienten Austausch (*Plasmid Shuffling*) durch andere Plasmide ermöglichen. Die hergestellten Stämme mit *Rescue*-Plasmid wurden sporuliert und die Sporen auf die genomische Deletion von *CDC1* bzw. *DCR2* und *TED1* sowie den Erhalt des *Rescue*-Plasmids überprüft. Zwei von vier Sporen einer Tetrade wiesen den gewünschten Genotyp mit genomischer Deletion der Gene und *Rescue*-Plasmid auf. Im Folgenden werden diese Stämme mit *CDC1^{low*}* (*cdc1Δ* mit *CDC1* in pRS316*) und *TED1^{low*}* (*ted1Δ dcr2Δ* mit *TED1* in pRS316*) bezeichnet.

Ausgehend von *CDC1^{low*}* und *TED1^{low*}* wurden die instabilen *Rescue*-Plasmide (*ARS CEN6** Plasmide mit erhöhter Verlustrate) der Stämme durch Plasmidvarianten mit anderen Vektoren ersetzt, um Mengen spezifische Phänotypen zu identifizieren (Abb. 9). Hierzu wurden *Rescue*-Plasmide mit intakter *ARS CEN6*-Region (*CDC1^{low}*, *TED1^{low}*, *DCR2^{low}*, 1-2 Kopien pro Zelle) und mit 2μ m Region (*CDC1^{high}*, *TED1^{high}*, *DCR2^{high}*, ~20 Kopien pro Zelle) eingeführt. Zudem wurde für das *CDC1*-

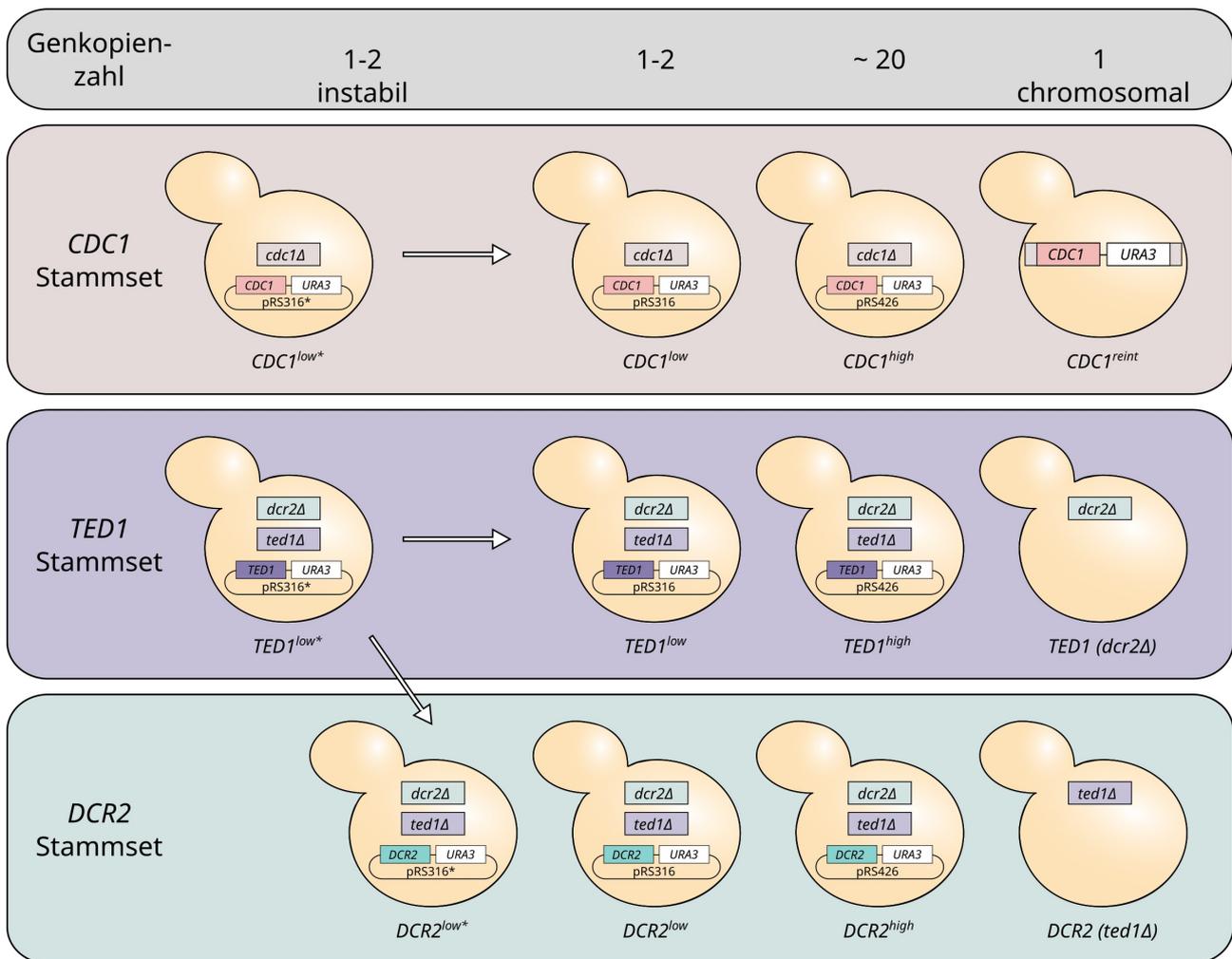


Abb. 9: Stammset zur Gendosis-abhängigen phänotypischen Analyse von Cdc1, Ted1 und Dcr2

CDC1^{low}* und *TED1^{low*}* wurden mit dem entsprechenden Wildtypgen in einem *LEU2*-basierten pRS315-Plasmid transformiert und auf den Verlust der *Rescue*-Plasmide durch 5-FOA selektioniert. Anschließend wurden die Gene in einem stabilen pRS316-Rückgrat (niedrige Kopienzahl) und in einem pRS426-Rückgrat (hohe Kopienzahl) in die Zellen gebracht. *DCR2* wurde ebenfalls im pTF27 (instabile Variante von pRS316) eingebracht. *CDC1* wurde im pRS306-Rückgrat in das Genom reintegriert. Alle Stämme wurden auf den Verlust des *LEU2*-basierten Plasmids überprüft. Für *TED1* und *DCR2* wurden zudem Einzeldelensionsstämme nach (Janke *et al.* 2004) hergestellt.

Stammset *CDC1* in das Chromosom des *CDC1*-Deletionsstamms reintegriert (*CDC1^{reint}*). Für *TED1* und *DCR2* wurden als weitere Referenz Einzeldelensionsstämme der Gene verwendet, um die Funktion des einen Proteins unabhängig vom anderen zu analysieren (*TED1 (dcr2Δ)* und *DCR2 (ted1Δ)*). Dieses Stammset liefert keinen eindeutigen Beweis über die tatsächliche Proteinmenge in jedem der Stämme, da die Genkopienzahl nicht zwangsläufig mit der Proteinmenge korreliert. Dennoch wird in den folgenden Analysen vorausgesetzt, dass eine niedrigere oder erhöhte Genkopienzahl eine Auswirkung auf die Proteinmenge besitzt.

2.1.2 Zellwachstum unter Zellwandstress

Die hergestellten Stammsets mit verschiedenen Gendosen von *CDC1*, *TEDI* und *DCR2* wurden nachfolgend verschiedenen phänotypischen Analysen unterzogen. Als erstes wurde das Wachstum der drei Stammsets in Flüssigkultur analysiert (Abb. 10).

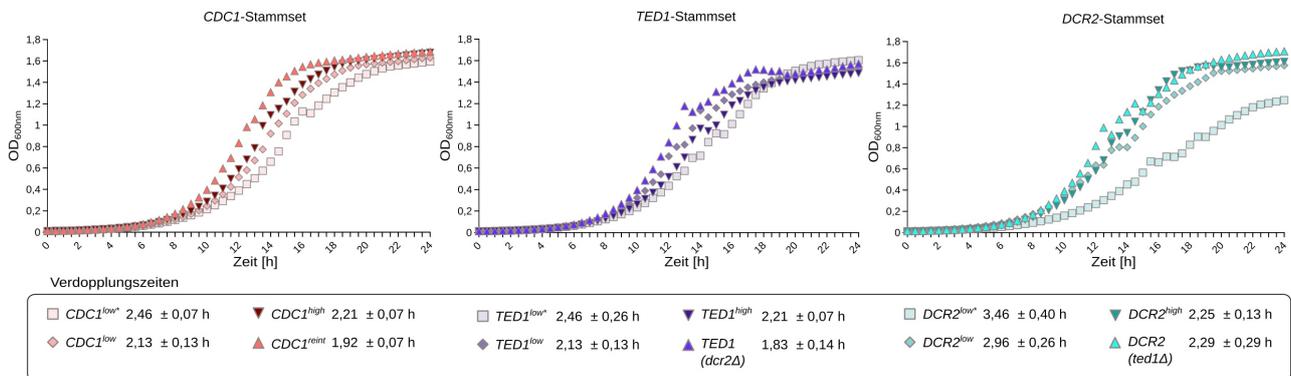


Abb. 10: Wachstumsanalyse des *CDC1*-, *TEDI*- und *DCR2*-Stammsets in Flüssigkultur

Zur Wachstumsanalyse wurden Übernachtskulturen der Stammsets auf eine OD_{600nm} von 0,05 eingestellt und davon je 200 μ l in Duplikaten in eine 96-Wellplatte überführt. Die Wachstumsanalyse erfolgte mittels Fluorimeter in Sc-Medium für 24 h unter schnellem Schütteln. Die OD_{600nm} der Kulturen wurde alle 30 min bestimmt. Die Kurven zeigen Mittelwerte aus drei Messungen à zwei biologischen Replikaten. Die Abweichung der Verdopplungszeit beschreibt die Standardabweichung.

Alle Stämme des *CDC1*- und *TEDI*-Sets zeigten ein vergleichbares Wachstum mit Verdopplungszeiten zwischen 1,83 h und 2,46 h in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Stämme mit *low**-Hintergrund wuchsen am langsamsten, erreichten ihre stationäre Wachstumsphase allerdings wie alle anderen Stämme der beiden Sets bei einer Zelldichte OD_{600nm} von etwa 1,6. Am schnellsten wuchsen *CDC1^{reint}* und *TEDI (dcr2Δ)*. Im Vergleich zu diesen beiden Sets konnte für das *DCR2*-Stammset ein leichtes Wachstumsdefizit für alle Stämme ermittelt werden. Die am schnellsten in Flüssigkultur wachsenden Stämme dieses Sets waren *DCR2^{high}* und *DCR2 (ted1Δ)* mit Verdopplungszeiten von etwa 2,3 h in der exponentiellen Wachstumsphase. Auch in diesem Set ist der am langsamsten wachsende Stamm *DCR2^{low*}*. Mit einer Verdopplungszeit von 3,46 h in der exponentiellen Wachstumsphase zeigt dieser Stamm ein signifikantes Wachstumsdefizit gegenüber *DCR2 (ted1Δ)*. Die hohe Anzahl der Plasmid-basierten Genkopien in den *high*-Stämmen führte bei keinem der Gene zu signifikanten Veränderungen im Wachstum in Flüssigkultur. Insgesamt scheint die Gendosis von *CDC1*, *TEDI* und *DCR2* bei Wachstum in Flüssigkultur lediglich für *DCR2* bei zu niedriger Gendosis eine Rolle zu spielen.

Um ein besseres Verständnis der komplexen Sekretion und Prozessierung GPI-verankerter Proteine zu erhalten, wurden die Gendosis-abhängigen *CDC1*-, *TEDI*- und *DCR2*- Stämme phänotypisch auf

ihr Wachstum unter Zellwandstress untersucht. Zu diesem Zweck wurden Wachstumsanalysen mithilfe der Zellwandstresse Caspofungin (Hemmung der β 1-3-Glukansynthase), Calcofluorweiß und Kongorot (Einlagerung beider Farbstoffe in die Glukanschicht der Zellwand) durchgeführt (Abb. 11).

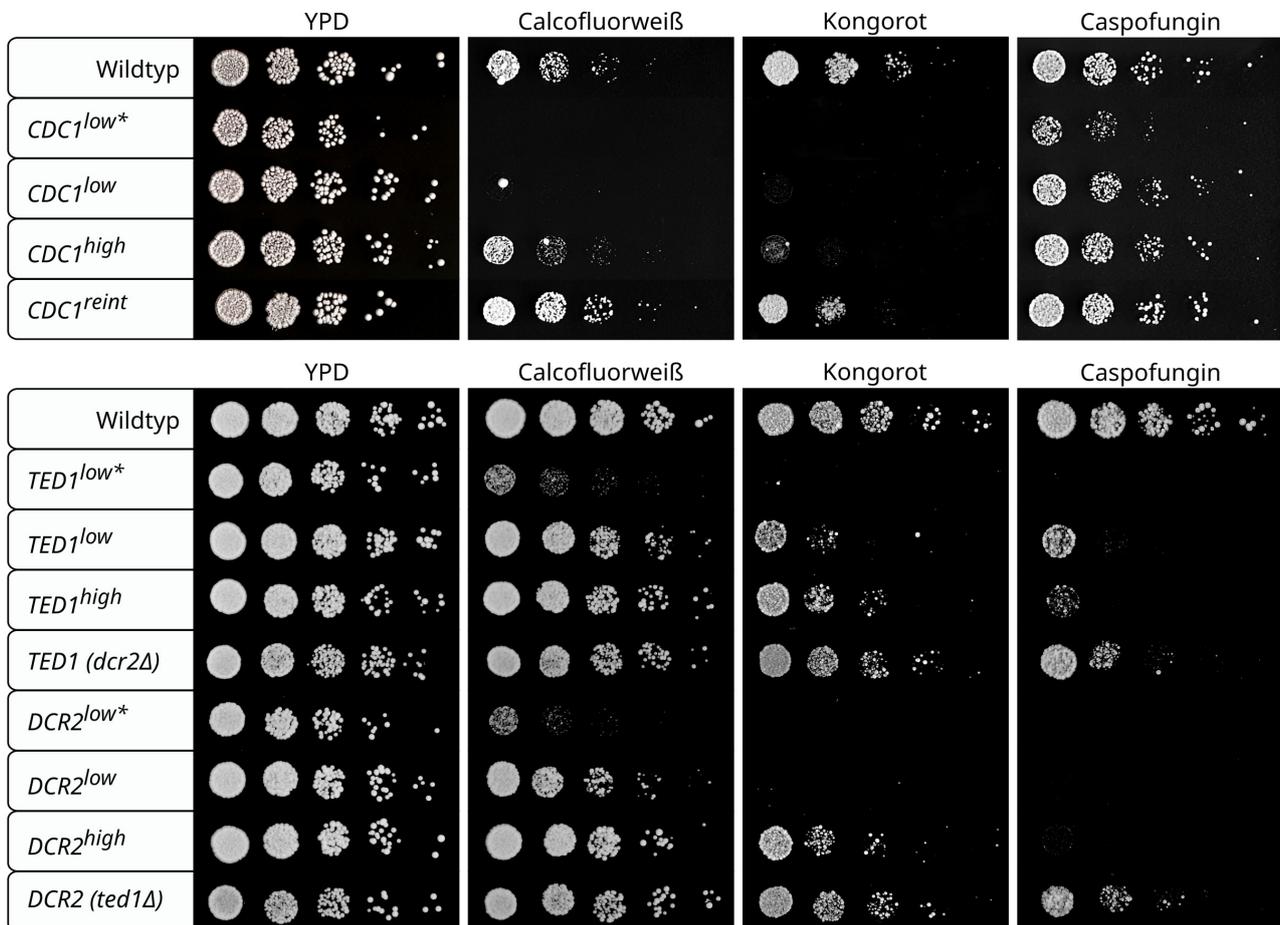


Abb. 11: Phänotypische Analyse des Mengen spezifischen *CDC1*-, *TED1*- und *DCR2*- Stammsets unter Zellwandstress

Die Stämme wurden in Sc-Medium angezogen, auf eine OD_{600nm} von 0,2 eingestellt und anschließend seriell im Verhältnis 1:5 verdünnt und auf YPD-Festmedium mit und ohne verschiedene Stressoren aufgetropft. Die Stressoren wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: Caspofungin 4,8mg/ml, Calcofluorweiß 0,125 %, Kongorot 600 μ g/ml. Die Stämme wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Pro Bedingung wurde jeweils das *CDC1*-Stammset auf einer Platte und das *TED1*- und *DCR2*-Stammset auf einer Platte gemessen. Als Wildtypkontrolle diente YHUM0455. Das Bild zeigt einen repräsentativen Klon aus zwei Messungen mit zwei biologischen Replikaten.

Alle drei Stammsets wurden diesen Stressoren in den gleichen Konzentrationen ausgesetzt, um nicht nur innerhalb sondern auch zwischen den verschiedenen Stammsets Aussagen zur Mengen spezifischen Stresstoleranz von Cdc1, Ted1 und Dcr2 treffen zu können. Für die Wachstumsanalyse wurden die Stammsets in Flüssigkultur auf eine distinkte Zellzahl eingestellt und serielle 1:5 Verdünnungen dieser Kultur auf verschiedene Festmedien aufgetropft.

Im *CDC1*-Stammset konnten starke Wachstumsunterschiede in Abhängigkeit von der Gendosis unter Zellwandstress identifiziert werden. Während unter Wachstum auf Caspofungin nur *CDC1^{low*}* ein Wachstumsdefizit mit etwa 5-25-fach schlechterem Wachstum im Vergleich zum Wildtyp aufwies, zeigten die Stämme bei Zugabe einer der beiden Farbstoffe auch bei *CEN*-Plasmid-basierter Expression (*CDC1^{low}*) kein Wachstum. Die erhöhte Plasmidkopien Anzahl im *CDC1^{high}*-Stamm führte unter dem Stress Calcoflourweiß zu Wachstum. Bei der Wachstumsanalyse unter Kongorotstress zeigte der Stamm ebenfalls Wachstum, welches allerdings 25-fach verringert im Vergleich zum Wildtyp war. *CDC1^{reint}* verhielt sich im Wachstum wie die Wildtyp-Kontrolle.

Für das *TEDI*- und *DCR2*-Stammset konnten ebenfalls Plasmid Kopienzahl abhängige Phänotypen unter Zellwandstress identifiziert werden. Das *TEDI*-Stammset war in seiner Anfälligkeit gegenüber Zellwandstress grundsätzlich robuster als die *DCR2*-Stämme. Die schwächsten Plasmid Kopienzahl spezifischen Auswirkungen wurden unter Wachstum mit Calcoflourweiß gefunden. Bei dieser Stressbedingung zeigten *TEDI^{low*}* und *DCR2^{low*}* kleinere Kolonien und ein 25-125-fach schwächeres Wachstum als die Wildtypkontrolle. Die *CEN*-Plasmid-basierte Expression in *TEDI^{low}* und *DCR2^{low}* sowie die Stämme mit erhöhter Kopienzahl und Einzeldelensionsstämme zeigten keine Wachstumsdefizite. Die beiden Stammsets unterschieden sich bei ihrem Wachstum auf Kongorot. *TEDI^{low*}* sowie *DCR2^{low*}* und *DCR2^{low}* waren nicht dazu in der Lage, unter diesem Zellwandstress zu wachsen. Dagegen zeigte *TEDI^{low}* ein Wachstumsdefizit mit einem etwa 25-fach schlechterem Wachstum als der Wildtyp und die beiden Stämme mit erhöhter Kopienzahl *TEDI^{high}* und *DCR2^{high}* ein etwa 5-fach schlechteres Wachstum im Vergleich zum Kontrollstamm. Die Einzeldelensionsstämme zeigten kein Wachstumsdefizit. Die stärksten Auswirkungen auf das Wachstum beider Stammsets hatte Caspofungin. Sogar die beiden Einzeldelensionsstämme *TEDI* (*dcr2Δ*) und *DCR2* (*ted1Δ*) zeigten ein etwa 5-fach reduziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Die Plasmid-basierte Expression von *DCR2* führte in keinem Stamm zu Wachstum unter Caspofungin-Stress. *TEDI^{low}* zeigte von Plasmid-basierten *TEDI*-Stämmen das stärkste Wachstum. Dennoch wuchs der Stamm etwa 25-125-mal schlechter als die Kontrolle. Interessanterweise zeigt *TEDI^{high}* schlechteres Wachstum als *TEDI^{low}*.

Insgesamt konnten für alle drei Gene starke Gendosiseffekte unter Zellwandstress identifiziert werden. Die *CDC1*-Gendosis spielte unter den getesteten Bedingungen vor allem bei Wachstum unter den beiden Farbstoffen Calcofluorweiß und Kongorot eine Rolle. Im Gegensatz dazu konnten für *TEDI* und *DCR2* vor allem Gendosiseffekte bei Wachstum unter Caspofunginstress beobachtet wer-

den. Die *DCR2*-Gendosis zeigte in Abwesenheit von *TEDI* grundsätzlich stärkere Effekte als die *TEDI*-Gendosis in Abwesenheit von *DCR2*.

2.1.3 Biofilmbildung

Anschließend wurde die Biofilmbildung der Gendosis-abhängigen Stämme unter normaler (2 % Glukose) und niedriger (0,5 % Glukose) Kohlenstoffversorgung untersucht (Abb. 12). Die Bildung von Biofilmen wird zentral mithilfe des GPI-verankerten Zellwandadhäsins Flo11 gesteuert und ist ein sehr sensitiver Phänotyp in Bezug auf minimale intrazelluläre Veränderungen (Bouyx *et al.* 2021). Flo11 eignet sich insbesondere im verwendeten $\Sigma 1278b$ -Stammhintergrund für phänotypische Analysen, da das Adhäsins viele spannende Phänotypen vermittelt, die auch im Zusammenhang mit humanpathogenen Hefen stehen (Dranginis *et al.* 2007; van Mulders *et al.* 2009; Lipke 2018; Timmermans *et al.* 2018). Als Kontrolle für dieses Experiment diente neben einem Wildtyp-Stamm ein *FLO11*-Deletionsstamm. Die Deletion des Adhäsins *FLO11* führt zu einem Unvermögen der Zellen, Adhäsion zu vermitteln oder Biofilme zu bilden (Fidalgo *et al.* 2008; Fischer *et al.* 2008).

Die Bildung von Biofilmen war bei Plasmid-basierter Expression von *CDC1* deutlich eingeschränkt. So zeigten *CDC1^{low*}*, *CDC1^{low}* und *CDC1^{high}* unter normaler Kohlenstoffversorgung kaum Biofilm-typische Strukturierungen der Zellenverbände wie es im Wildtyp und bei *CDC1^{reint}* zu erkennen war. Unter niedriger Kohlenstoffversorgung kam es im *CDC1^{low*}*-Stamm ebenfalls kaum zur Strukturierung der Zelloberfläche im Vergleich zum Wildtyp. Die Biofilme von *CDC1^{low}* und *CDC1^{high}* waren strukturiert, aber deutlich kleiner als der Wildtyp und *CDC1^{reint}*. Unter geringer Kohlenstoffversorgung konnte eine starke Korrelation zwischen Plasmid Kopienzahl und Biofilmbildung beobachtet werden. *CDC1^{low*}*, zeigte unter dieser Bedingugn den am schwächsten ausgeprägten Biofilm. Die Biofilme von *CDC1^{low}* und *CDC1^{high}* waren deutlich kleiner als der Biofilm des Wildtyps und des *CDC1^{reint}*-Stamms, zeigten aber eine strukturierte Oberfläche und ausufernde Ränder.

Im *TEDI*- und *DCR2*-Stammset bildeten sich am wenigstens ausgeprägte Biofilme im *TEDI^{low*}*- und *DCR2^{low*}*-Stamm. Grundsätzlich war die Biofilmbildung des *TEDI*-Stammsets im Vergleich zum *DCR2*-Stammset allerdings stärker ausgeprägt. Die Biofilme der Einzeldelentionsstämme waren unter geringer Kohlenstoffversorgung vergleichbar mit der Wildtypkontrolle. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen des *CDC1*-Stammsets. Die Biofilmbildung unter normaler Kohlenstoffversorgung wich für das *TEDI*-Stammset von den bisherigen Beobachtungen ab. Am wenigsten Biofilmbildung zeigte hier der Einzeldelentionsstamm *TEDI* (*dcr2Δ*). Die Plasmid-basierte

Ergebnisse

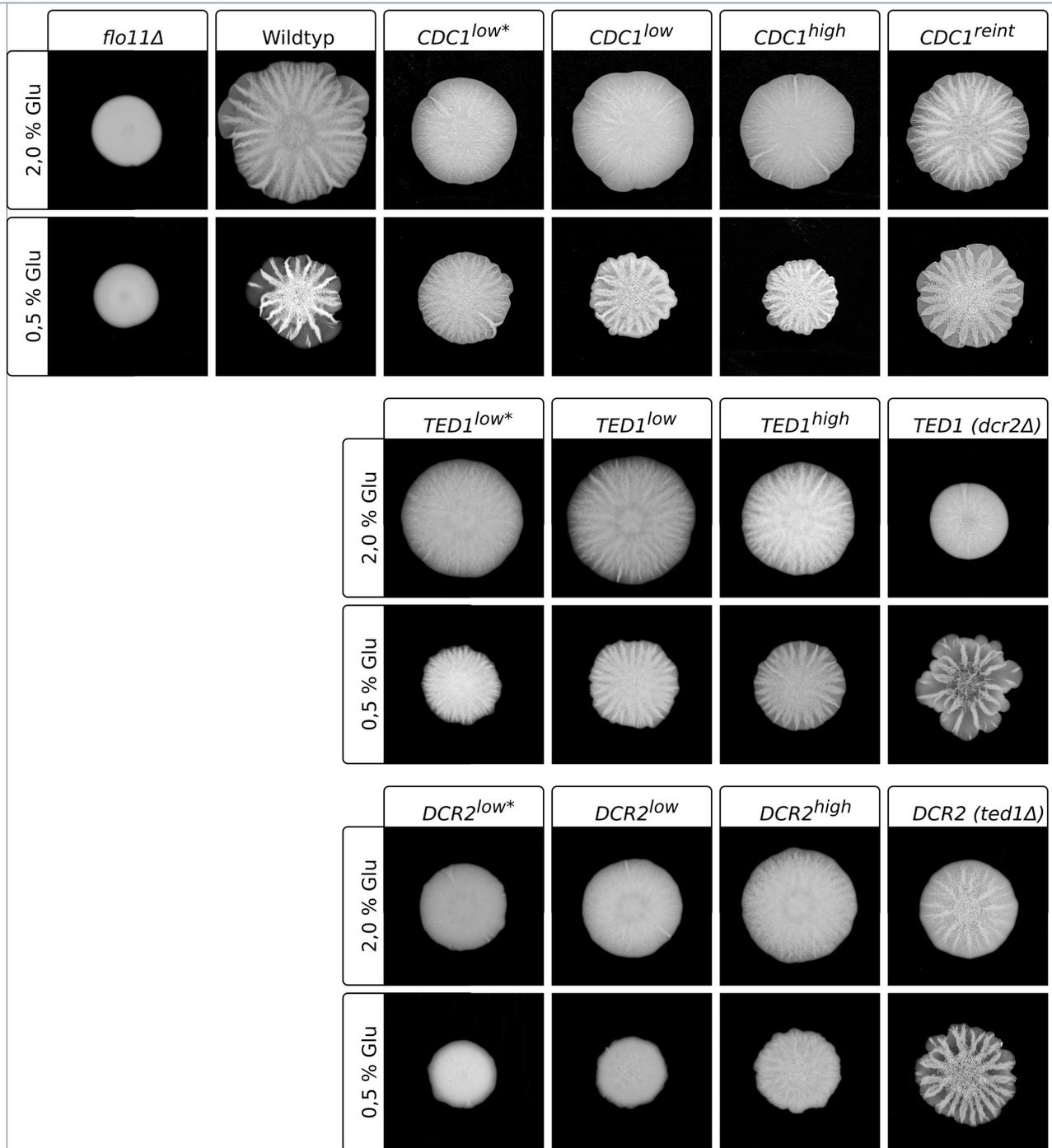


Abb. 12: Biofilmbildung des *CDC1*-, *TED1*- und *DCR2*-Stammsets

Zur Biofilmbildung wurden je 5 μ l einer Flüssigkultur mit OD_{600nm} von 1,0 auf die Mitte einer halbfesten YPD-Platte mit 0,3 % Agar getropft und für 5-7 Tage wachsen gelassen. Als Wildtypkontrolle diente YHUM0455, als *FLO11*-Deletionsstamm diente YHUM2829.

Expression führte in allen anderen Stämmen des *TED1*-Sets zu einer stärkeren Strukturierung und besserem Wachstum als bei der Einzeldelation. *TED1^{high}* zeigte aus diesem Set die stärkste Biofilmbildung, die allerdings schwächer als im Wildtyp war. Im *DCR2*-Stammset zeigte unter geringer Kohlenstoffversorgung *DCR2^{low*}* die schwächste Biofilmbildung. *DCR2 (ted1Δ)* zeigte die stärkste

Biofilmbildung aus dem Set. Dennoch ist dieser Biofilm deutlich kleiner als die Wildtypkontrolle und weniger strukturiert.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Gendosis von *CDC1*, *TED1* und *DCR2* eine große Rolle für die Ausbildung von Biofilmen spielt. Die größten Gendosiseffekte konnten für *DCR2* ermittelt werden, während die Gendosis von *TED1* im Vergleich eine geringere Rolle spielte.

2.2 Einfluss der Lipid-Remodelase Cwh43 auf die Funktion von Cdc1 und Ted1

2.2.1 Stammkonstruktion

Anhand einer systematischen phänotypischen Analyse sollten folgend genetische Interaktionen und die Reihenfolge im komplexen GPI-Sekretionsnetzwerk sowie die Abhängigkeit von Cdc1 und Ted1 bezüglich Cwh43 analysiert werden. Cwh43 ist im Zusammenhang mit der Klärung von spezifischen Substraten von Cdc1 und Ted1 interessant, da nur membranständige GPI-verankerte Proteine als seine Substrate gelten (Yoko-O *et al.* 2018). Des Weiteren wurde in vergangenen Studien eine genetische Interaktion von *TED1* und *CWH43* nachgewiesen (Yoko-O *et al.* 2018). Es wird vermutet, dass Cwh43 und Cdc1 keine gemeinsamen Substrate besitzen und ihre Funktion nicht voneinander abhängt. Dies ist jedoch nicht bewiesen (Vogt *et al.* 2020). Die Analysen sollten daher Aufschluss darüber geben, ob es weitere Interaktionen oder eine funktionelle Abhängigkeit zwischen *CDC1*, *TED1* und *CWH43* gibt. Für die Analyse wurden neben entsprechenden Deletionsstämmen von *CDC1* und *TED1* auch Stämme mit Deletion der Lipid-Remodelase *CWH43* hergestellt und zur Analyse hinzugezogen, um synergistische und additive Effekte bei der Abwesenheit mehrerer Gene analysieren zu können. Die Rolle von Dcr2 bei der Eliminierung von EtNP-2 war zum Zeitpunkt der Datenerhebung nicht publiziert (Chen *et al.* 2021). Daher wurde *DCR2* nicht in die folgenden Analysen einbezogen.

Insgesamt wurde ein Stammset aus sieben verschiedenen Deletionskombinationen für phänotypische Analysen hergestellt (Abb. 13). Da *CDC1* nicht vollständig deletiert werden kann, wurde für die folgenden Analysen der *CDC1^{low*}* Stamm als Stamm mit reduzierter *CDC1*-Gendosis im Vergleich zum Wildtyp verwendet. Die übrigen Gene *TED1* und *CWH43* wurden systematisch mithilfe von Deletionskassetten deletiert. Die Mehrfachdeletionsstämmen wurden durch Kreuzung der entsprechenden Stämme mit anschließender Tetradendisektion generiert. Auf diese Weise wurden Stämme

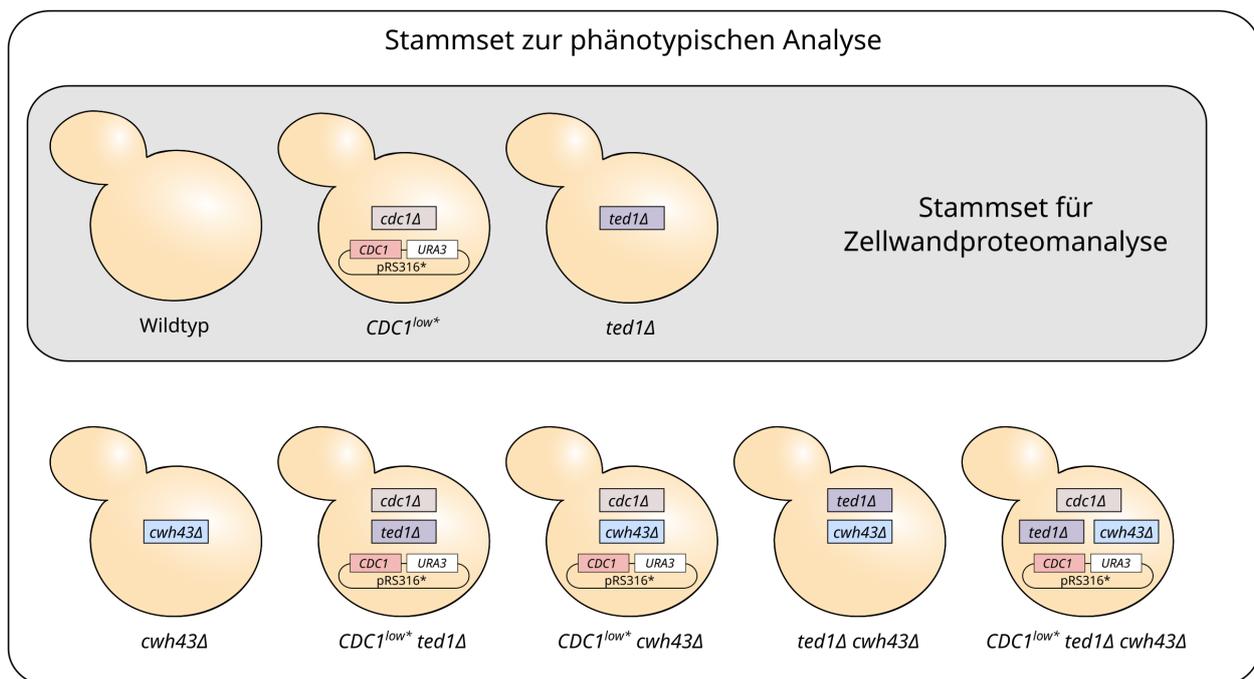


Abb. 13: Stammset für die systematische phänotypische Analyse von GPI-Biosynthese Deletionsmutanten

Die Einzeldelation der Gene erfolgte nach (Janke *et al.* 2004) mit den Resistenzmarkern: *cdc1Δ::kanMX4*, *ted1Δ::NatNT2*, *cwh43Δ::hphNT1*. Die Mehrfachdeletionsstämme wurden durch Kreuzen der Einzeldelationsstämme und anschließende Sporulation generiert. Das grau hinterlegte Stammset wurde für die Zellwandproteomanalyse verwendet. Alle gezeigten Stämme wurden phänotypisch charakterisiert. Als Wildtyp Kontrolle diente YHUM0464.

hergestellt, die die Analyse des Wachstums unter Zellwandstress und Flo11-vermittelten Phänotypen in Abwesenheit einzelner Gene oder deren Kombination ermöglichen.

2.2.2 Zellwachstum unter Zellwand- und Membranstress

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der hergestellten Stämme unter spezifischen Zellwand- und Membranstressen untersucht. Hierzu wurden von den Stämmen Verdünnungsreihen gleicher Zellzahlen im Verhältnis 1:5 angelegt. Als Membranstress diente SDS, welches zu einer veränderten Permeabilität der Plasmamembran und zur Aktivierung des CWI führt (Igual *et al.* 1996; Bickle *et al.* 1998; Cócera *et al.* 1999). Als Zellwandstresse dienten Koffein (Aktivierung des CWI), Trypanblau und Kongorot (Einlagerung in Zellwandglukanschicht) und Caspofungin (Hemmung der β 1-3-Glukansynthese). Zudem wurden Zinkionen (Zinksulfat) als Stressor ausgewählt, da bekannt ist, dass *TEDI*-Deletionsstämme sensitiv gegenüber Zn^{2+} -Stress reagieren (Ruotolo *et al.* 2008) (Abb. 14).

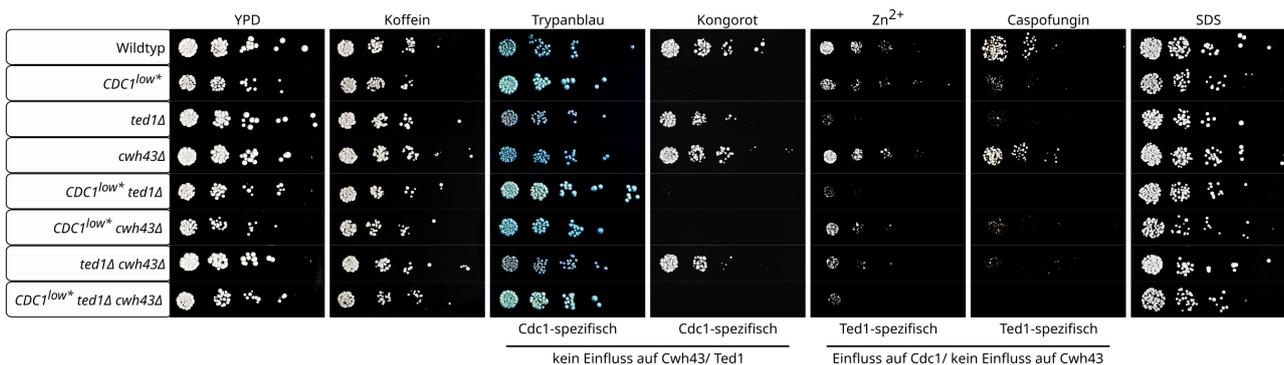


Abb. 14: Wachstumsanalyse verschiedener *CWH43*-abhängiger GPI-Biosynthese Deletionsmutanten unter Zellwand- und Membranstress

Die Stämme wurden in YPD-Medium angezogen und auf eine OD_{600nm} von 0,1 eingestellt. Es wurden serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:5 angefertigt und auf YPD-Platten mit und ohne Stressoren aufgetropft. Die Konzentration der Stressoren betrug: Koffein 1,5 mg/ml, Trypanblau 10 μ g/ml, Kongorot 550 μ g/ml, Zink-sulfat 12 mM, Caspofungin 4,8 μ g/ml und SDS 0,075 %. Die Zellen wurden 48 h bei 30 °C inkubiert. Als Wildtyp Kontrolle diente YHUM0464. Pro Bedingung wurden alle Stämme auf einer Platte vermessen. Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus zwei biologischen Replikaten, die doppelt vermessen wurden.

Auf Vollmedium (YPD) und unter Stress mit Koffein war bei keinem der Stämme ein signifikanter Unterschied im Wachstum zu erkennen. Unter Trypanblau-Stress zeigte der *CDC1^{low*}*-Stamm eine deutlich hellere Blaufärbung als der Wildtyp- sowie der *ted1Δ*- und *cwh43Δ*-Stamm. Dies deutet darauf hin, dass im *CDC1^{low*}*-Stammhintergrund der blaue Farbstoff nur in geringen Mengen in die Zellwand inkorporiert wurde. Dieser Effekt war in allen Stämmen mit *CDC1^{low*}*-Stammhintergrund (*CDC1^{low*} ted1Δ*, *CDC1^{low*} cwh43Δ* und *CDC1^{low*} ted1Δ cwh43Δ*) zu beobachten. Unter Kongorot-Stress zeigte sich ein analoges Wachstumsverhalten der Stämme. Der *CDC1^{low*}*-Stamm sowie alle anderen Stämme mit diesem Hintergrund zeigten kein Wachstum. Sowohl die *TEDI*- und *CWH43*-Einzeldelentionsstämme als auch der *ted1Δ cwh43Δ*-Stamm besaßen unter Kongorot-Stress ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum.

Unter Zn^{2+} -Stress zeigte der *TEDI*-Deletionsstamm ein Wachstumsdefizit um den Faktor von etwa 25 im Vergleich zum Wildtyp. Der *CDC1^{low*}*-Stamm zeigte ein leicht reduziertes Wachstum, welches knapp fünfmal schwächer war als das Wachstum des Wildtyps. Das gleiche konnte für Wachstum auf Caspofungin-haltigem Medium beobachtet werden. Der *cwh43Δ*-Stamm zeigte unter beiden Stressbedingungen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum. Alle Mehrfachdeletionsstämme mit *ted1Δ*-Stammhintergrund zeigten unter Zink²⁺- und Caspofungin-Stress das gleiche Wachstum wie der *ted1Δ*-Stamm, während alle *TEDI*-Stämme mit einem *CDC1^{low*}*-Stammhintergrund das gleiche Wachstum wie die einzelne *CDC1^{low*}*-Stammvariante besaßen. Für den Membranstress SDS konnten keine Wachstumsdefizite ermittelt werden.

Resümiert konnten *TEDI*-spezifische Wachstumsdefizite unter Stress mit Zink²⁺ und dem Zellwandstress Caspofungin ermittelt werden. Das *TEDI*-abhängige Wachstumsdefizit unter Caspofungin-Stress hat Auswirkungen auf die *CDC1*-Funktion, was ein Hinweis darauf sein kann, dass die Cdc1-Funktion von der Ted1-Funktion abhängt. Außerdem konnten *CDC1*-spezifische Wachstumsdefizite unter den Zellwandstressoren Trypanblau und Kongorot beobachtet werden. Diese hatten keinen Einfluss auf *TEDI* und *CWH43*, was bedeuten könnte, dass die Cdc1-Funktion unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf Ted1 und Cwh43 besitzt.

2.2.3 Agaradhäsion und Biofilmbildung

Im nächsten Schritt sollten die hergestellten Deletionsstämme phänotypisch anhand eines GPI-verankerten Zellwandreporterproteins analysiert werden. Als Reporter wurde auch hier das Adhäsिन Flo11 gewählt. Als erstes wurden die GPI-Deletionsstämme auf ihre Fähigkeit untersucht, Adhäsion an festen Nährmedien zu vermitteln. Zur Adhäsionsanalyse wurden die Zellen auf festem Vollmedium wachsen gelassen und anschließend durch Waschen mit Wasser qualitativ auf ihre Adhäsionsfähigkeit überprüft (Abb. 15). Als Kontrollen dienten ein Wildtyp-Stamm und ein *FLO11*-Deletionsstamm.

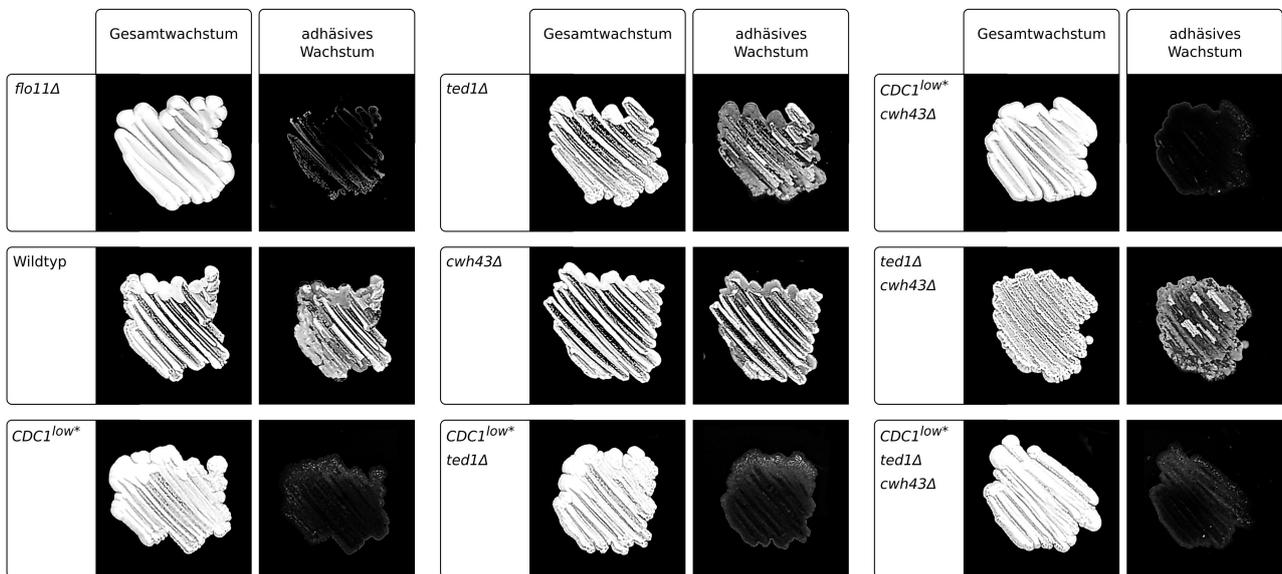


Abb. 15: Agaradhäsion der verschiedenen GPI-Biosynthese Deletionsmutanten

Die Stämme wurden alle auf eine YPD-Platte überstrichen und 72 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden fotografiert (Gesamtwachstum). Anschließend wurden die Ausstriche unter einem gleichmäßigen Wasserstrahl gewaschen, bis die *flo11Δ*-Negativkontrolle (YHUM2829) nicht mehr zu sehen war. Die Ausstriche wurden erneut fotografiert (adhäsives Wachstum). Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus drei Messungen. Als Wildtyp Kontrolle diente YHUM0464.

Für die Einzeldelentionsstämme konnten verschiedene Phänotypen beobachtet werden. So waren der *ted1Δ*- sowie der *cwh43Δ*-Stamm weiterhin dazu in der Lage, adhäsiv zu wachsen. Allerdings zeigte der *ted1Δ*-Stamm im Gegensatz zum Wildtyp und zum *cwh43Δ*-Stamm eine leicht reduzierte Adhäsion. Im *CDC1^{low*}*-Stammhintergrund war keine Adhäsion erkennbar. Dieses Adhäsionsverhalten traf ebenfalls auf alle Mehrfachdelentionsstämme mit *CDC1^{low*}*-Stammhintergrund zu.

Als zweiter Flo11-vermittelter Phänotyp wurde das Stammset auf seine Fähigkeit zur Biofilmbildung auf halbfesten Medien untersucht. Zur Untersuchung des Stammsets auf Biofilmbildung wurden diese in Flüssigkultur auf eine distinkte Zellzahl eingestellt und dann für 10-14 Tage auf halbfesten Medien unter normaler Kohlenstoffversorgung (2 % Glukose) und geringer Kohlenstoffversorgung (0,2 % Glukose) inkubiert und anschließend die Biofilme qualitativ analysiert (Abb. 16).

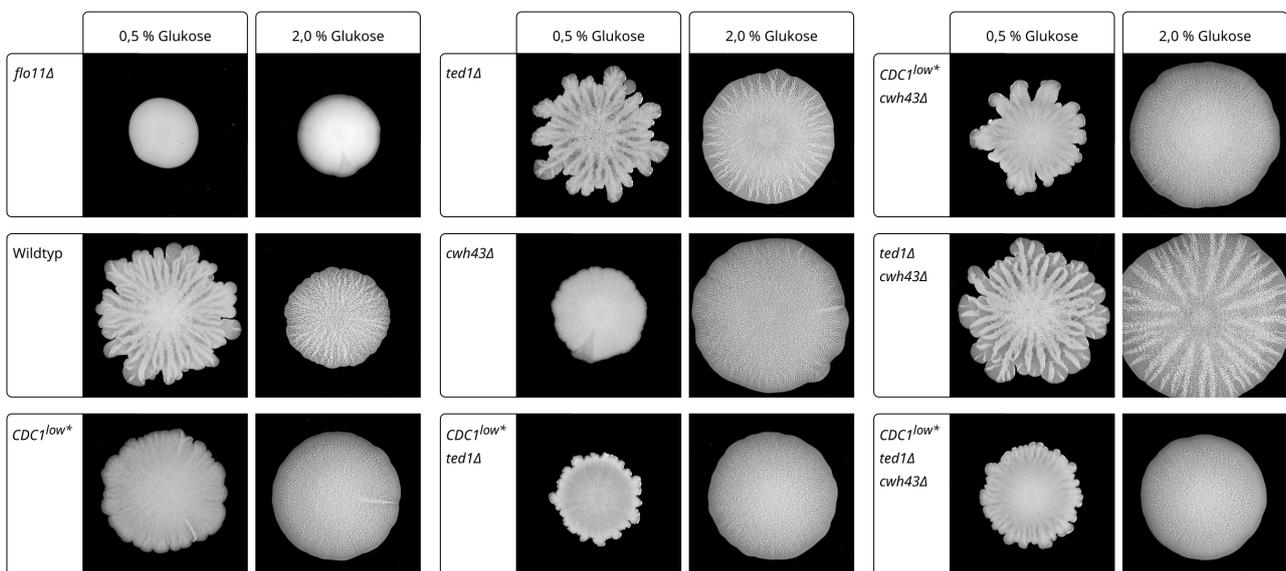


Abb. 16: Biofilm verschiedener GPI-BDeletionsmutanten auf halbfesten Oberflächen

Zur Beobachtung der Stämme auf Biofilmbildung wurden die Stämme in YPD angezogen und auf eine OD_{600nm} von 1,0 eingestellt. Je 5 μ l der Kulturen wurden pro Stamm auf die Mitte einer halbfesten YPD-Platte mit 0,3 % Agar getropft und für 5-7 Tage wachsen gelassen. Als Wildtypkontrolle diente YHUM0464, als *FLO11*-Deletionsstamm diente YHUM2829. Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus zwei Messungen à zwei biologischen Replikaten.

Als Kontrollen diente auch hier ein Wildtyp-Stamm und ein *FLO11*-Deletionsstamm. Starke phänotypische Unterschiede zwischen den Stämmen konnten vor allem bei geringer Kohlenstoffversorgung beobachtet werden. Diese decken sich allerdings nicht vollständig mit den bisherigen Beobachtungen bezüglich der Agaradhäsion. Während der Wildtyp unter niedriger Kohlenstoffkonzentration eine starke Strukturierung und ungleichmäßige Ränder im Wachstum zeigte, waren diese Charakteristika von Biofilmen im *CDC1^{low*}* Hintergrund sehr viel schwächer zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte der *TEDI*-Deletionsstamm eine mit dem Wildtyp vergleichbare Biofilmbildung.

Der stärkste phänotypische Unterschied im Gegensatz zur Adhäsionsanalyse war bei der Biofilmbildung im *cwh43Δ*-Stammhintergrund zu beobachten. Stämme ohne Cwh43 zeigten keine Biofilmbildung und daher starke Ähnlichkeit zum *flo11Δ*-Stamm. Interessanterweise zeigten die Mehrfachdeletionsstämme mit *cwh43Δ*-Hintergrund nicht das gleiche Verhalten wie der Einzeldelentionsstamm. So zeigte der *ted1Δ, cwh43Δ*-Stamm einen sehr stark strukturierten Biofilm mit ausufernden Rändern. Während im *CDC1^{low*}, cwh43Δ*-Stammhintergrund eine phänotypische Zwischenform aus Wildtyp und *FLO11*-Deletionsstamm zu beobachten war, zeigte der *CDC1^{low*}, ted1Δ*-Stamm kaum Biofilmbildung. Die Trippelmutante *CDC1^{low*}, ted1Δ, cwh43Δ* zeigte kaum Biofilmbildung.

Insgesamt zeigten die hier durchgeführten Flo11-vermittelten Wachstumsanalysen ähnliche Ergebnisse wie bei den Wachstumsanalysen unter den Zellwandstressoren Trypanblau und Kongorot. Demnach konnte vor allem Adhäsionsdefizite in Abhängigkeit von *CDC1* beobachtet werden. Interessanterweise konnte allerdings die Biofilmbildung von *CDC1^{low*}* durch die gleichzeitige Deletion von *CWH43* verbessert werden. Dies trifft auch für *TED1* und *CWH43* zu und könnte ein Hinweis auf eine genetische Interaktion sein.

2.3 Einfluss von *CDC1* und *TED1* auf das Zellwandproteom unter Zellwandstress

Mit den bisher generierten Daten ist es möglich, erste Rückschlüsse über das enzymatische GPI-Biosynthesenetzwerk von Cdc1, Ted1 und Cwh43 zu ziehen. Allerdings geben diese Daten keinen Aufschluss über spezifische Substrate der beiden Metallophosphoesterasen. Daher wurde ausgehend von den durchgeführten Wachstumsanalysen durch eine Zellwandproteomanalyse näher beleuchtet, ob Cdc1 und Ted1 spezifische Substrate erkennen. Für diese Untersuchung wurden der *CDC1^{low*}*-Stamm und der *TED1*-Deletionsstamm ausgewählt, um die genaue Zusammensetzung des Zellwandproteoms bei geringerer Cdc1-Menge bzw. bei Abwesenheit von Ted1 mit einem Wildtypstamm zu vergleichen. Ferner wurde das Zellwandproteom der ausgewählten Stämme unter Wachstum mit einem der beiden Stressoren Caspofungin und Zink²⁺ detektiert. Diese Stressoren wurden für die Zellwandproteomanalyse ausgewählt, da Caspofungin bei beiden Stämmen zu einem reduzierten Wachstum führte und da Zinkionen ein Ted1-spezifisches Wachstumsdefizit auslöste. Zur Analyse wurden Zellen in Vollmedium mit oder ohne Stressoren für 24 Stunden inkubiert und anschließend eine distinkte Zellzahl der Ansätze geerntet. Anschließend wurden die Zellwände der Zellen extrahiert und ihr Zellwandproteom massenspektrometrisch analysiert.

Für die semi-quantitative Auswertung der massenspektrometrischen Daten wurde der *Score Sequest* der identifizierten Proteine herangezogen. SEQUEST ist eine Datenbank zur Identifikation von massenspektrometrischen Peptiden eines Proteins. Der *Score Sequest* ist dabei ein Maß für die Korrelation des gegebenen Massenspektrums im Vergleich zum theoretischen Massenspektrum und gibt Aufschluss über die Qualität und Menge eines Proteins in einer Probe (Martínez-Bartolomé *et al.* 2008). Proteine, die massenspektrometrisch detektiert wurden, wurden erst ab der Ausschlussgröße des *Score Sequests* $> 40,0$ in die weiteren Analysen einbezogen. Es wurden insgesamt 33 Proteine identifiziert (S.Tab. 1). Zur Auswertung der Daten wurden die *Scores* aller in signifikanten Mengen vertretenen Proteine einer Probe addiert (*Score Sequest*^{Gesamt}). Anschließend wurde die relative Menge jedes einzelnen Proteins anteilig am *Score Sequest*^{Gesamt} bestimmt. Die relativen Proteinmengen wurden außerdem über den Proben-spezifischen Größenfaktor normalisiert. Der Größenfaktor vergleicht die *Sequest Scores*^{Gesamt}-Werte der verschiedenen Proben und ermöglicht so, die relativen Proteinanteile bezogen auf eine distinkte Proteinmenge zu betrachten. Die 33 Proteine wurden dann je nach Anteil am Gesamtzellwandproteom in zwei Kategorien unterteilt. Identifizierte Proteine der Kategorie 1 wiesen einen Anteil von mindestens 5 % am Zellwandproteom eines Stammes unter einer Bedingung auf. Alle identifizierten Proteine mit einem geringeren Anteil in allen Proben wurden der Kategorie 2 zugeteilt. Von den insgesamt 33 Proteinen wurden 12 Kategorie 1 Proteine gefunden: Cdc19, Cis3, Crh1, Cwp1, Ecm33, Gas1, Gas3, Gas5, Hsp150, Pir1, Pma1 und Scw4 (Abb. 17). In Kategorie 2 wurden 21 Proteine identifiziert (Bar1, Bgl2, Ccw14, Crh2, Eno2, Exg2, Fks1, Gsc2, Hxt6, Mkc7, Pir3, Pir5, Pst1, Rl13B, Scw10, Ssa1, Ssa2, Tdh3, Toh1, Tos1 und Yps7), welche zu „Sonstige“ zusammengefasst wurden und im Folgenden nicht weiter behandelt werden, da sie nur einen sehr geringen, unter den getesteten Bedingungen unveränderlichen Anteil an den Zellwandproteomen besaßen.

Der Zellwandstress Caspofungin bewirkte für fünf verschiedene Proteine (Cwp1, Crh1, Gas1, Gas5, und Pma1) eine signifikante Änderung der relativen Menge verglichen mit dem entsprechenden Stamm bei Wachstum ohne Stress. So führte das Wachstum unter Zugabe von Caspofungin Stamm unabhängig zur einer etwa zweieinhalbfachen Erhöhung des Anteils von Cwp1 in der Zellwand von durchschnittlich 9,4 % auf 24,1 %. Die Zellwandproteine Crh1, Gas1 und Gas5 zeigten unter Caspofungin-Stress im Vergleich zur Kontrollbedingung (YPD) eine signifikante Änderungen in ihrem Anteil am Zellwandproteom exklusiv in Abwesenheit von Ted1. So stieg der Anteil von Crh1, welches bei Zellwandstress vermehrt produziert wird (Bermejo *et al.* 2008), von 5,5 % auf 15,5 % um knapp das dreifache. Die Anteile von Gas1 (von 3,8 % auf 10,7 %) und Gas5 (von 2,1 % auf 4,4 %)

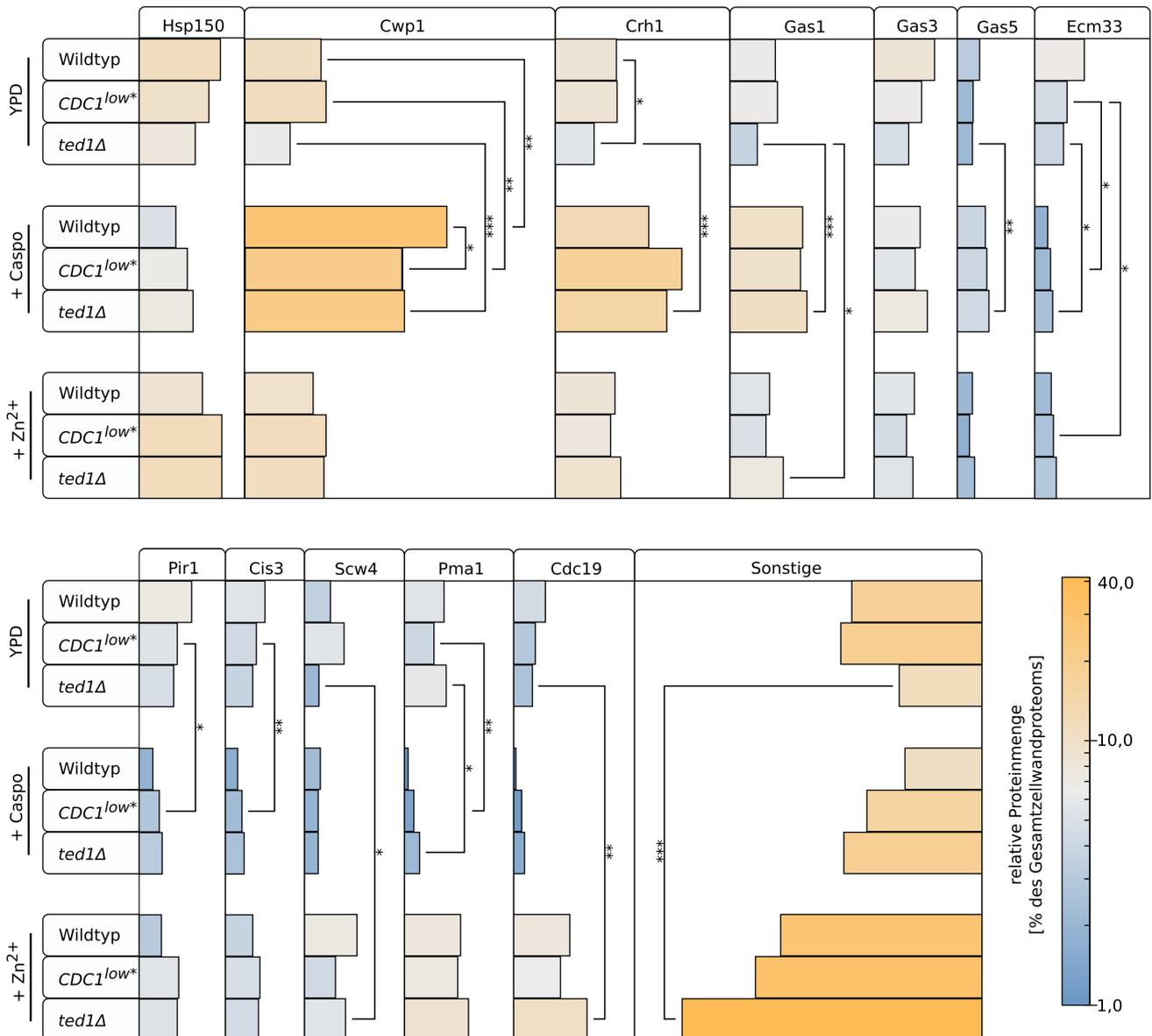


Abb. 17: Zellwandproteomanalyse von *CDC1^{low*}* und *ted1Δ* unter verschiedenen Zellwandstressen

Die Zellen wurden für 24 h unter den geeigneten Stressbedingungen inkubiert oder in YPD wachsen gelassen. Anschließend folgte die Extraktion der Zellwände und massenspektrometrische Analyse. Der Score SEQUEST von 33 identifizierten Proteinen wurde addiert und der Anteil jedes Proteins am *Score Sequest^{Gesamt}* bestimmt. Anschließend wurden die pro Replikat ermittelten *Score Sequest^{Gesamt}*-Werte ins Verhältnis zum *Score Sequest^{Gesamt}*-Wert des Wildtyps unter der entsprechenden Bedingung gesetzt. Die Proteinanteile wurden zur Normalisierung durch den Kehrwert des prozentualen *Score Sequest^{Gesamt}*-Wert geteilt. Die erhaltenen Werte zeigen zwischen den getesteten Bedingungen und Stämmen vergleichbare relative Proteinanteile des Gesamtproteoms des jeweiligen Stamms. Die Länge der Balken korreliert linear zu diesen Proteinanteilen, die Farbe der Balken korreliert logarithmisch zur Proteinmenge. Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt (* = 0,5%, ** = 0,1%, *** = 0,01%). Es wurden pro Bedingung mindestens 4 technische Replikate gemessen.

stiegen in diesem Stamm auf das zwei- bis zweieinhalbfache. Diese Proteine sind unter Wachstumsbedingungen ohne Stress im *ted1Δ*-Zellwandproteom leicht unterrepräsentiert, können aber bei Stress im gleichen Ausmaß in die Zellwand transportiert werden wie im Wildtyp. Das Zellwandpro-

tein Cis3, welches zur Familie der Pir-Proteine zählt (Moukadiri *et al.* 1999), und das essentielle Plasmamembranprotein Pma1 zeigten *CDC1^{low*}*-spezifische Effekte unter Caspofunginstress. So sinkt im *CDC1^{low*}*-Stamm der Anteil von Cis3 von 4,3 % unter Wachstum ohne Stress auf 2,3 % und der Anteil von Pma1 von 4,3 % auf 1,3 %.

Es konnten insgesamt nur wenige hoch signifikante Zink²⁺-spezifische Änderungen der Zellwandproteome ermittelt werden. Diese sind allerdings exklusiv im *ted1Δ*-Zellwandproteom zu finden. So stieg unter Zink²⁺-Stress der Anteil der Pyruvat Kinase Cdc19 (Sprague 1977) von 2,6 % auf etwa 10,2 % um das Vierfache. Außerdem war der Anteil an Zellwandproteinen der Kategorie 2 im *TE-DI*-Deletionsstamm im Vergleich zu Wachstum ohne Zink²⁺ etwa vier mal so hoch. Den größten Anteil an Proteinen der Kategorie 2 in diesem Stamm unter Zink²⁺-Stress haben Fks1 (4,5 %), Pir3 (4,5%), Tdh3 (3,9 %), Eno2 (3,8 %), Ssa2 (3,7 %) und Saa1 (3,5 %) (S.Tab. 1). Die Anteile dieser identifizierten Proteine sind unter Zink²⁺-Stress allerdings in allen Stämmen leicht erhöht und unterschieden sich im Einzelnen betrachtet nicht signifikant von den Mengen in Stämmen unter normalen Wachstumsbedingungen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das Zellwandproteom sich Stress-spezifisch sehr stark veränderte. Bezogen auf signifikante Änderungen (** und ***) waren Stamm-spezifische Unterschiede innerhalb einer Wachstumsbedingung allerdings nicht erkennbar. Knapp die Hälfte der identifizierten Proteine aus Kategorie 1 zeigten für alle gemessenen Bedingungen keine hochsignifikante Veränderung in ihrem relativen Anteil am Zellwandproteom. Zu diesen Proteinen gehören Hsp150, Gas3, Ecm33, Pir1 und Scw4.

2.4 Rekombinante Produktion von Cdc1 und Ted1 aus *S. cerevisiae* und *C. thermophilum*

Die Lösung der Tertiärstruktur von Proteinen ist ein essentieller Beitrag zum Verständnis enzymatischer Prozesse und zur Identifizierung regulativer Bereiche eines Proteins (Meyers 2002; Worsfold *et al.* 2010). Durch die Co-Kristallisation von Proteinen mit Substraten können neue Erkenntnisse über das katalytische Zentrum von Proteinen und deren essentielle Reste gewonnen werden (Reynolds 2014). So sollte im nächsten Schritt die Lösung der Struktur von Cdc1 und Ted1 einen Beitrag zum Verständnis über die genaue Substraterkennung und Bindung der beiden Proteine liefern, da zudem zu diesem Zeitpunkt keine AlphaFold Modelle verfügbar waren.

2.4.1 *In silico* Analyse der MPE-Domänen von Cdc1 und Ted1

Um die Struktur von Cdc1 und Ted1 zu lösen, wurden neben den beiden Genen aus *S. cerevisiae* mittels einer bioinformatischen BLAST-Analyse jeweils ein mutmaßliches Ortholog aus dem thermophilen Pilz *Chaetomium thermophilum* identifiziert. *C. thermophilum* ist systematisch in die Ascomycota in Sordariomycetes einzuordnen (Amlacher *et al.* 2011). Die beiden *C. thermophilum* Orthologe CtCdc1 und CtTed1 wurden ausgewählt, da sie durch den Lebensraum des Extremophilen mutmaßlich stabiler und somit gut geeignet für die rekombinante Proteinproduktion seien (Amlacher *et al.* 2011).

Die vier Proteine wurden zunächst *in silico* mithilfe des PSIPRED Algorithmus auf die Grenzen möglicher Transmembranhelices und ungeordnete Bereiche an den Termini der MPE-Proteindomänen untersucht (Jones 1999; Jones & Cozzetto 2015; Buchan & Jones 2019).

Tab. 1: ausgewählte Proteine zur biochemischen Analyse mit ermittelten MPE-Domänengrenzen

	Uniprot ID	Länge [AA]	Festgelegte Domänengrenzen	Molekulargewicht [kDa]
ScCdc1	P40986	492	K72- D388	36,6
CtCdc1	G0SCJ2	688	E108- Y530	47,7
ScTed1	P40533	473	H31- F451	48,4
CtTed1	G0SI65	612	S35- C538	56,7

Die MPE-Domänen wurden derart begrenzt, dass keine α -Helices, ungeordneten Bereiche oder hydrophoben Reste an deren Termini lokalisiert sind, um die Produktion und Reinigung durch eine erhöhte Löslichkeit und Stabilität zu erleichtern. Entsprechend der *in silico* annotierten Transmembrandomänen und der genannten Kriterien wurden die Domänengrenzen für die Produktion der Proteine wie folgt festgelegt: für ScCdc1 wurde der Bereich von K72 bis D388 ausgewählt und analog CtCdc1 von E108 bis Y530. Für ScTed1 wurden die Aminosäuren H31 bis F451 bestimmt und für CtTed1 der Bereich von S35 bis hin zu C538.

2.4.2 Optimierung der rekombinanten Produktion von Cdc1 und Ted1 in *E. coli*

Die heterologe Expression von Genen in *E. coli* für biochemische Ansätze unterliegt einer Vielzahl von Möglichkeiten der Anpassung und Feinjustierung. Neben einer großen Anzahl verschiedener *E. coli* Stämme mit unterschiedlichen Vorzügen in Bezug auf Proteinfaltung, -stabilität und -ausbeute spielen die Zeit, Temperatur und das Puffersystem der Proteinproduktion eine Rolle für die

Löslichkeit des Zielproteins. Für die heterologe Produktion der Cdc1 und Ted1 MPE-Domänen wurden für *E. coli* Codon-optimierte Versionen im pET-Expressionssystem (Studier & Moffatt 1986) verwendet.

Für die Reinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie wurden alle verwendeten Domänen mit einem 6His-Tag versehen. Zudem wurden alle Proteine zusätzlich mit den Löslichkeitstags GST und NusA fusioniert, welche zu einer erhöhten Stabilität und Löslichkeit der Zielproteine führen sollten (Smith & Johnson 1988; Davis *et al.* 1999; Nallamsetty & Waugh 2006; Malhotra 2009). In einem ersten Screen wurden die Fusionsproteine in verschiedenen *E. coli* Stämmen im analytischen Maßstab produziert und auf ihre Löslichkeit überprüft (Abb. 18). Es wurden zudem unterschiedliche Produktionstemperaturen und Zeiten verwendet.

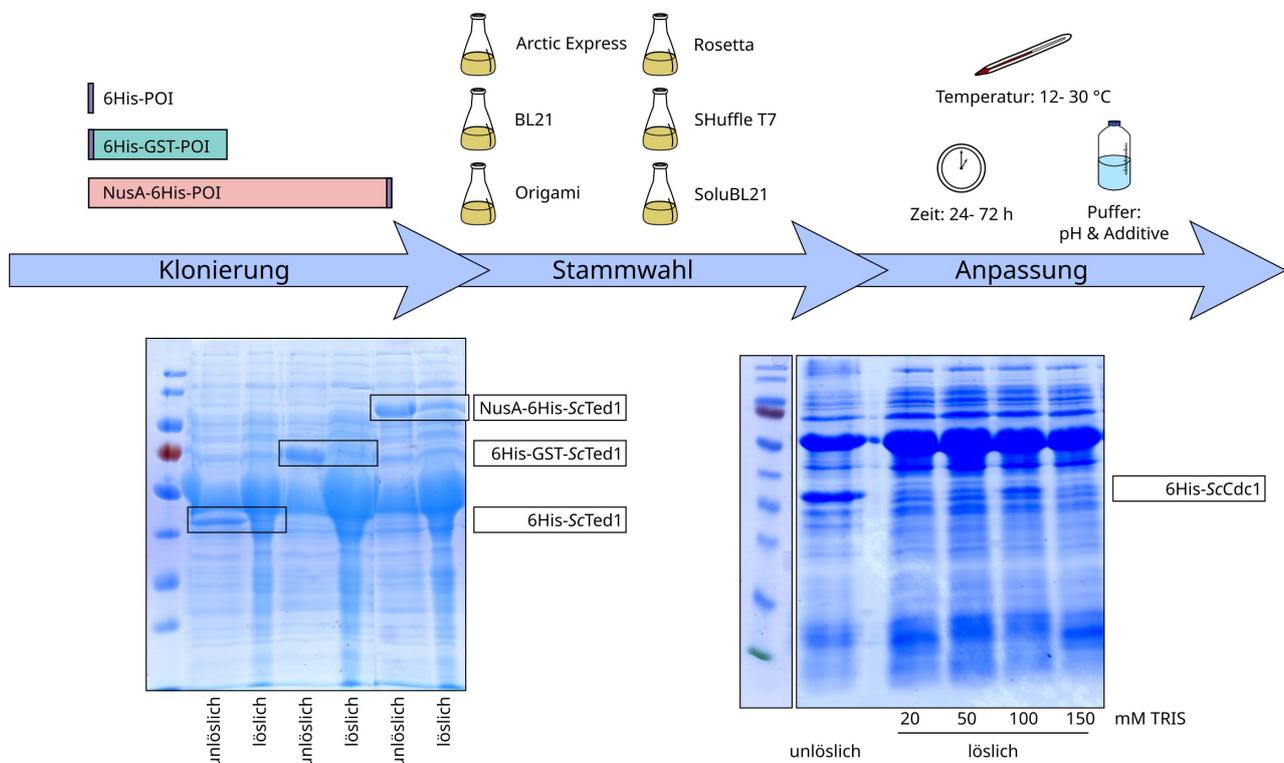


Abb. 18: Flussschema zur Identifizierung geeigneter Parameter für die rekombinante Synthese von Cdc1 und Ted1

Oben: Die MPE-Domänen *ScCdc1*, *CtCdc1*, *ScTed1* und *CtTed1* wurden mit verschiedenen Tags fusioniert. Anschließend erfolgte die rekombinante Proteinproduktion im analytischen Maßstab in verschiedenen *E. coli* Expressionsstämmen unter Standardbedingungen: 12 h bei 30 °C, 48 h bei 18 °C und 72 h bei 12 °C. Zur Anpassung der Pufferbedingungen wurden die Proteine vorrangig für 72 h bei 12 °C in *Arctic Express* produziert.

Unten: Exemplarische SDS PAGE Proteingele. Nach der Proteinsynthese wurden die *E. coli* Zellen mechanisch mittels eines Homogenisators (rechts: in verschiedenen Puffern) aufgebrochen. Zelltrümmer und missgefaltete Proteine (unlösliche Fraktion) wurden mittels Zentrifugation von den löslichen Proteinen getrennt.

Grundsätzlich konnten unter keiner der getesteten Bedingungen große Mengen der MPE-Domänen produziert werden. Die Gesamtausbeute stieg zwar deutlich mit Erhöhung der Produktionstemperatur, erzielte aber lediglich missgefaltete Proteine, sodass für alle Proteine die Synthese für 72 h bei 12 °C angestrebt wurde. Da trotz dieser niedrigen Produktionstemperatur noch immer missgefaltete und unlösliche Proteine für alle vier MPE-Domänen erzielt wurden, wurde im Weiteren für die Identifizierung geeigneter Parameter vorrangig der *E. coli* Stamm *Arctic Express* verwendet. Dieser ist für die heterologe Produktion von Proteinen unter niedrigen Temperaturen designet und enthält zudem die beiden Chaperonine Cpn10 und Cpn60, welche die korrekte Faltung der Zielproteine erleichtern sollen. Zudem konnte anhand einiger Beispiele gezeigt werden, dass die Proteinausbeute in *Arctic Express* deutlich höher ist als bei anderen *E. coli* Stämmen zur rekombinanten Proteinproduktion (Hartinger *et al.* 2010; Morão *et al.* 2022).

Nichtsdestotrotz konnten für *CtCdc1* und *CtTed1* keine Bedingungen ermittelt werden, unter denen lösliches Protein in *E. coli* produziert wird. Dagegen führte für *ScTed1* die Fusion mit dem Löslichkeitstag NusA zur Produktion von löslichem Protein im *Arctic Express* Stammhintergrund. Die *ScCdc1* MPE-Domäne konnte in diesem Stammhintergrund ohne zusätzlichen Löslichkeitstag produziert werden. Zudem führte die Zugabe von 100 mM TRIS zum Puffer-System, zu einer erhöhten Löslichkeit der MPE-Domäne.

2.4.3 Rekombinante Produktion und Reinigung von *ScCdc1* und *ScTed1*

Für die Lösung der Proteinstruktur und weitere *in vitro* Studien wurden *ScCdc1* und *ScTed1* im nächsten Schritt im präparativen Maßstab hergestellt und gereinigt. Die Reinigung der MPE-Domänen erfolgte zunächst mittels immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) (Abb. 19).

Nach der Reinigung der MPE-Domänen von *ScCdc1* und *ScTed1* verblieben starke Verunreinigungen in den Proben. Die beiden MPE-Domänen wurden daher zur Validierung mittels Western Blot Analyse und massenspektrometrischer Analyse verifiziert. Beide Analysen zeigten, dass *ScCdc1* in zwei distinkten Banden im Proteingel zu finden ist. *ScTed1* konnte im NusA-6His-*ScTed1* Fusionskonstrukt mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Die *ScTed1* MPE-Domäne wurde mittels TEV-Protease vom Rest des Fusionskonstrukts getrennt und konnte genau wie NusA-6His-*ScTed1* ebenfalls massenspektrometrisch nachgewiesen werden.

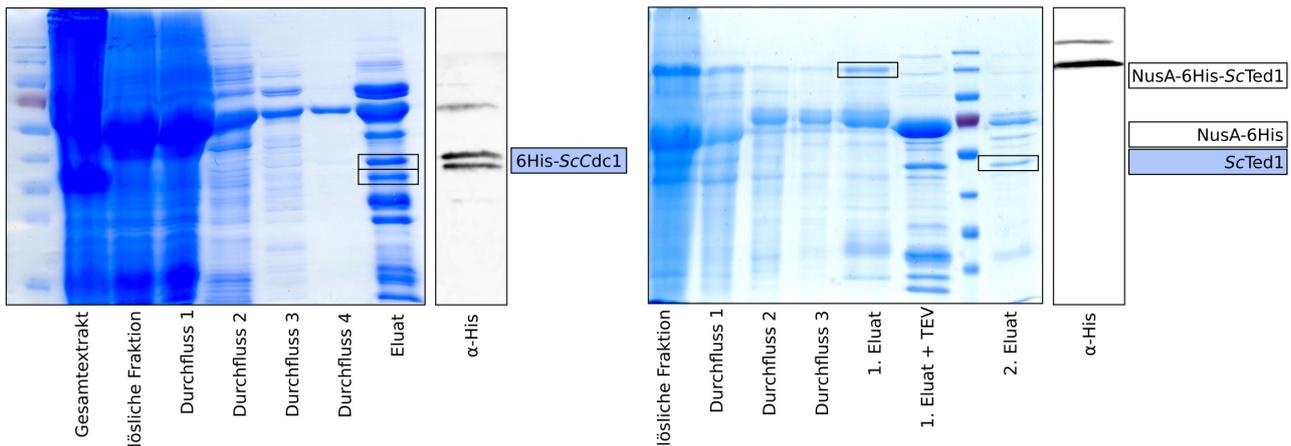


Abb. 19: Produktion und Reinigung von ScCdc1 und ScTed1 im präparativen Maßstab

Coomassie gefärbte SDS PAGE Proteingele mit Reinigungsschritten des synthetisierten 6His-ScCdc1 (38,9 kDa) und NusA-6His-ScTed1(105,7 kDa). Ein *Arctic Express* Zellpellet aus 8 l Flüssigkultur wurde mechanisch mittels French Press Zelle aufgebrochen (Gesamtextrakt) und missgefaltete Proteine und Zelltrümmer durch Zentrifugation eliminiert. Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde zur Bindung der Zielproteine auf eine Ni-NTA-Agarosesäule aufgetragen und der Durchfluss (Durchfluss 1) auf Bindung der Proteine überprüft. Es folgten Waschschritte mit Puffer (Durchfluss 2), Puffer +10 mM Imidazol (Durchfluss 3) und optional Puffer +2 M Urea (Durchfluss 4) Die Elution erfolgte in 5 ml Puffer +250 mM Imidazol. NusA-6His-ScTed1 wurde anschließend ü. N. mit 6His-TEV-Protease dialysiert. Danach wurde das dialysierte Proteingemisch erneut auf eine Ni-NTA-Agarosesäule aufgetragen und der Durchfluss mit ScTed1 (48,7 kDa) aufgefangen. Die 6His-getaggeten Varianten wurden mittels Western Blot mit einem primären MausAntiPolyHistidin-Antikörper und einem sekundären Peroxidase-gelabelten ZiegeAntiMaus-Antikörper nachgewiesen. Eingerahmte Banden wurden aus dem Gel geschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

Es ist bekannt, dass das Chaperonin Cpn60 aus dem verwendeten *Arctic Express* Stamm zur starken Verunreinigung des Zielproteins führen kann (Belval *et al.* 2015). Daher wurden verschiedene Schritte unternommen, um die MPE-Domänen zu reinigen und von weiteren Kontaminationen zu trennen. So wurde beispielsweise ein zusätzlicher Reinigungsschritt mit 2 M Urea eingeführt (Durchfluss 4), welcher die Cpn60-Kontamination eliminieren sollte (Belval *et al.* 2015). Dieser zusätzliche Schritt führte allerdings zu keiner Verbesserung. Auch die Zugabe von 10 mM ATP oder geringen Mengen Imidazol im Proteinpuffer führte nicht zur Trennung der MPE-Domänen von den Kontaminanten.

Im Folgenden sollte daher eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt werden. Hierzu wurden die Proteinproben über eine Gelfiltration aufgetrennt und fraktioniert. Die Größenausschlusschromatographie der verunreinigten Proben zeigte, dass die MPE-Domänen als Komplex mit verschiedenen anderen Protein wie beispielsweise dem mutmaßlichen Cpn60 nicht voneinander trennbar waren (Abb. 20).

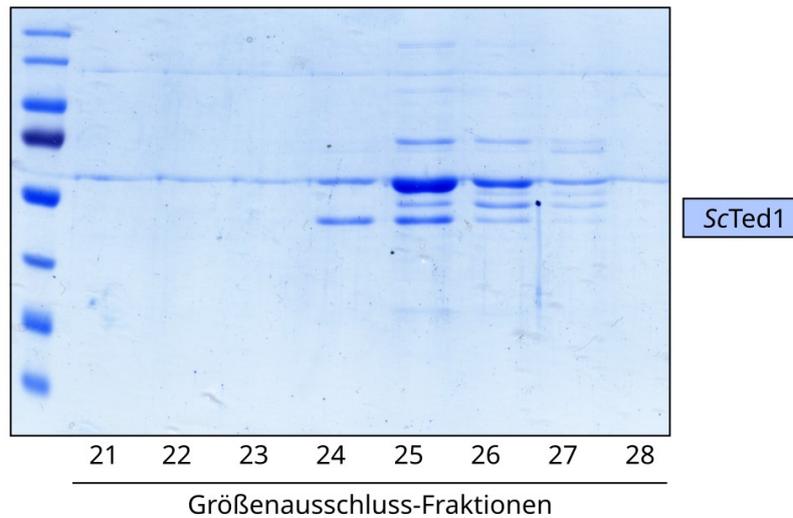


Abb. 20: Größenausschlusschromatographie von *ScTed1*

Das mittels IMAC und mit TEV-Protease geschnittene *ScTed1* wurde mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt und fraktioniert. Fraktionen mit Protein wurden aufgefangen und je 8 μ l auf ein SDS PAGE Proteingel aufgetragen.

Insgesamt konnten zwar Bedingungen identifiziert werden, welche die rekombinante Produktion von *ScCdc1* und *ScTed1* ermöglichten, allerdings war eine Reinigung der Proteine unter diesen Bedingungen nicht möglich.

2.5 Strukturbasierte funktionelle Analyse von *Cdc1*, *Ted1* und *Dcr2*

2.5.1 Auswahl von Aminosäureresten zur Analyse

Die Zuordnung von Funktionen zu spezifischen Resten eines Proteins ist ein zentraler Bestandteil für das biochemische Verständnis enzymatischer Prozesse. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit vieler Metallophosphoesterasen ist nur wenig darüber bekannt, welche Reste dieser Proteine tatsächlich Einfluss auf Substraterkennung, Substratbindung und katalytische Funktion nehmen. So ist auch für *Cdc1*, *Ted1* und *Dcr2* bislang nicht geklärt, wo Struktur-spezifische Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Funktion der drei Proteine liegen. Zur vergleichenden funktionellen Kartierung wurden 79 Aminosäuren von *Cdc1*, *Ted1* und *Dcr2* zur binären Wachstumsanalyse basierend auf den Proteinstrukturen der AlphaFold Datenbank ausgewählt (Varadi *et al.* 2022), welcher möglicherweise eine Funktion besitzen könnten. Für jedes der drei Proteine wurden acht Reste ausgewählt, welche Teil des hoch konservierten MPE-Signaturmotifs sind. Diese sind zum Großteil mutmaßlich für

die Komplexierung der zwei divalenten Kationen als Co-Faktor verantwortlich (Goldberg *et al.* 1995; Lindqvist *et al.* 1999; Eguez *et al.* 2004; Losev *et al.* 2008; Matange *et al.* 2015) (Abb. 21).

Die Reste befinden sich bei allen drei Proteinen auf *Loops* oberhalb der zentralen β -Faltblatt-Sandwich Struktur (MPE-Zentrum). Die ausgewählten Cdc1-spezifischen MPE-Reste Q97, D144 und H316 sowie die strukturell analogen Ted1-spezifischen Reste Q89, D133 und H381 und die Dcr2-spezifischen Reste H257, D302 und H500 sind mutmaßlich essentiell für die Komplexierung des ersten Kations. Die Komplexierung des zweiten Kations erfolgt unter anderem durch die für Cdc1 ausgewählten Reste D144, H259 und H314 (Ted1: D133, H315 und H379; Dcr2: D302, H444 und H498). Zudem wurden bei Cdc1 die konservierten MPE-Reste H184 und D185 und bei Ted1 und Dcr2 strukturell analoge Reste ausgewählt. Auch der Cdc1-spezifische Rest D315 (Ted1: D380 und Dcr2: D499) wurde ausgewählt, da er als variabler Teil der MPE-Signatur gilt, aber konserviert zwischen den drei Proteinen ist.

Im Umfeld dieser Reste wurden für Cdc1 17 weitere Reste identifiziert, welche für die Bindung des Substrats EtNP-1 verantwortlich sein könnten. Diese befinden sich in im Bereich von α -Helix 1 unterhalb des MPE-Zentrums (M99, D100, E101, S103 und N345) und in zwei Bereichen oberhalb dieses Zentrums auf einem variablen Loop (R264, R275, P280, F281, P282, H323 und Q284, H287, Q288, Y289, Q290, T291). Für Ted1 wurden fünf und für Dcr2 wurden jeweils drei strukturell analoge Reste zur mutmaßlichen Substratbindung von EtNP-2 identifiziert und ausgewählt.

In der Struktur von Cdc1 und Ted1 konnten zudem zwei mutmaßliche Disulfidbrücken entdeckt werden, welche einerseits den N- und C-Terminus der MPE-Domäne verbinden (Cdc1: C73 und C383; Ted1 C35 und C445) und andererseits innerhalb der MPE Domäne den langen, variablen Loop 14 (Cdc1) bzw. Loop 18 (Ted1) und β -Faltblatt 8 verbinden (Cdc1: C271 und C319; Ted1: C325 und C384). Dcr2 weist keine strukturell analogen Disulfidbrücken auf, besitzt allerdings zwei N-terminale Bereiche (R80, F81, Y82 und R118, R119, W120), welche mutmaßlich in der Golgi-Membran lokalisiert sind und dort als Membrananker fungieren könnten. Des Weiteren konnte für Cdc1 eine mögliche Salzbrücke zwischen D317 und K280 gefunden werden. Ted1 und Dcr2 weisen analoge Reste zu D317 auf (Ted1: E382 und Dcr2: N502), welche ebenfalls in die Analyse einbezogen wurden.

Einer Reihe konservierter Reste in Cdc1 konnte keine genaue Funktion zugeordnet werden (D147, R150, W157, S227, E279, H318 und S357). Sie wurden dennoch in die Analyse einbezogen, da sie einerseits mindestens moderat konserviert waren und andererseits strukturell interessante Lokalisa-

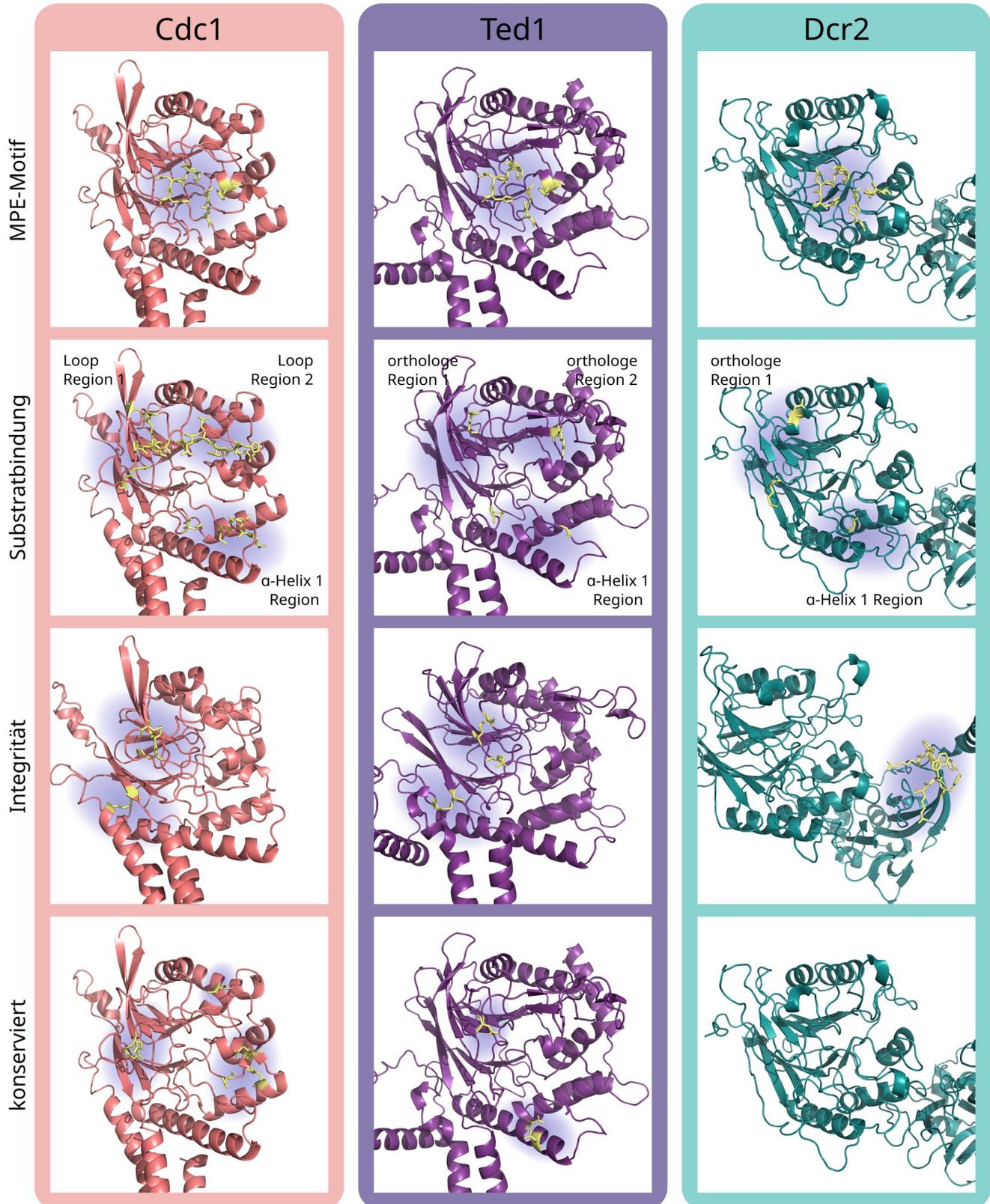


Abb. 21: Funktionelle Sets der 66 ausgewählten Cdc1-, Ted1- und Dcr2-Mutanten

Modelle von Cdc1, Ted1 und Dcr2 der AlphaFold Datenbank (Varadi et al. 2022). Reste zur funktionellen Analyse der drei Proteine sind gelb markiert und in vier Kategorien eingeordnet. Diese umfassen Reste des MPE-Signaturmotifs, der mutmaßlichen Substratbindung sowie Reste zum Erhalt der strukturellen Integrität wie Disulfid- und Salzbrücken. Die letzte Kategorie umfasst konservierte Reste unbekannter Funktion.

tionen aufwiesen wie beispielsweise H318. Dieser Rest liegt allein auf einer kleinen Vertiefung der Proteinoberfläche. Auch für Ted1 wurden zwei konservierte Aspartate in α -Helix 1 mit unbekannter Funktion (D104, D109) zur funktionellen Kartierung gewählt.

2.5.2 Identifizierung essentieller Aminosäurereste

Die Etablierung eines *Plasmid Shuffling* Systems für Cdc1, Ted1 und Dcr2 zur binären Identifizierung essentieller Reste erfolgte mithilfe der *CDC1^{low*}* und *TEDI^{low*}* Stämme. Für die folgenden Analysen wurden weitere Plasmide mit mutierten Versionen eines der drei Gene (*CDC1^{mutiert}*, *TEDI^{mutiert}* oder *DCR2^{mutiert}*) auf einem *CEN*-Plasmid mit *LEU2*-Selektionsmarker in die *CDC1^{low*}* und *TE- DI^{low*}*-Stammhintergründe eingebracht. Die mutierten Versionen dieser Gene enthielten gezielte Aminosäureaustausche, in denen die ausgewählten Reste zu Alanin (Funktionsverlust) oder zu einem gegensätzlichen Rest (Eigenschaftsumkehr) ausgetauscht wurden. Die hergestellten *CDC1^{mutiert}*-Plasmide wurden in den *CDC1^{low*}*-Stamm und die *TEDI^{mutiert}*- und *DCR2^{mutiert}*-Plasmide wurden in den *TEDI^{low*}*-Stamm eingebracht. Anschließend wurden die Zellen Wachstumsanalysen auf 5-Fluorotsäure (5-FOA)-haltigen Medien unterzogen (Abb. 22).

Das *URA3* Gen, welches Teil der *Rescue*-Plasmide ist, codiert für die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, welche 5-FOA in das toxische 5-Fluorouracil umsetzt (Boeke *et al.* 1984). Dies führt zur Gegenselektion der *Rescue*-Plasmide, um den 5-Fluorouracil induzierten Zelltod zu verhindern. Andererseits verbleiben auf diese Weise nur die mutierten Gen-Versionen in den Stämmen. Nur wenn diese funktional sind, können sie den letalen *cdc1Δ* bzw. *dcr2Δ*, *ted1Δ* Genotyp komplementieren und das Überleben und Wachstum gewährleisten. Bei Proteinvarianten, welche zum letalen Wachstumsphänotypen auf 5-FOA führen, ist davon auszugehen, dass die eingefügte Mutation zu einem Funktionsverlust der Proteine führt. Als essentielle Aminosäure werden in diesem Zusammenhang Reste definiert, die zu einem Funktionsverlust des Proteins auf 5-FOA führen. Teile dieser Ergebnisse und Vorarbeiten dieses Abschnitts wurden im Rahmen der Bachelorabschlussarbeiten von Lara Hollmann (Klonierung und Analyse von 14 Cdc1-Mutanten) und Clara Schilling (Klonierung von 7 Ted1-Mutanten) generiert.

Es konnte gezeigt werden, dass nahezu alle Proteinvarianten von Cdc1, Ted1 und Dcr2 mit Mutation im MPE-Signaturmotif zum letalen Wachstumsphänotyp der entsprechenden Stämme auf 5-FOA führten. Die einzigen Ausnahmen dieser Kategorie bildeten die Mutationen des variablen Rests aus MPE-Block V Cdc1^{D315A} und Ted1^{D380A}, welche im Gegensatz zum strukturell analogen Protein Dcr2^{D499A} keinen sichtbaren Einfluss auf das Zellwachstum auf 5-FOA aufwiesen.

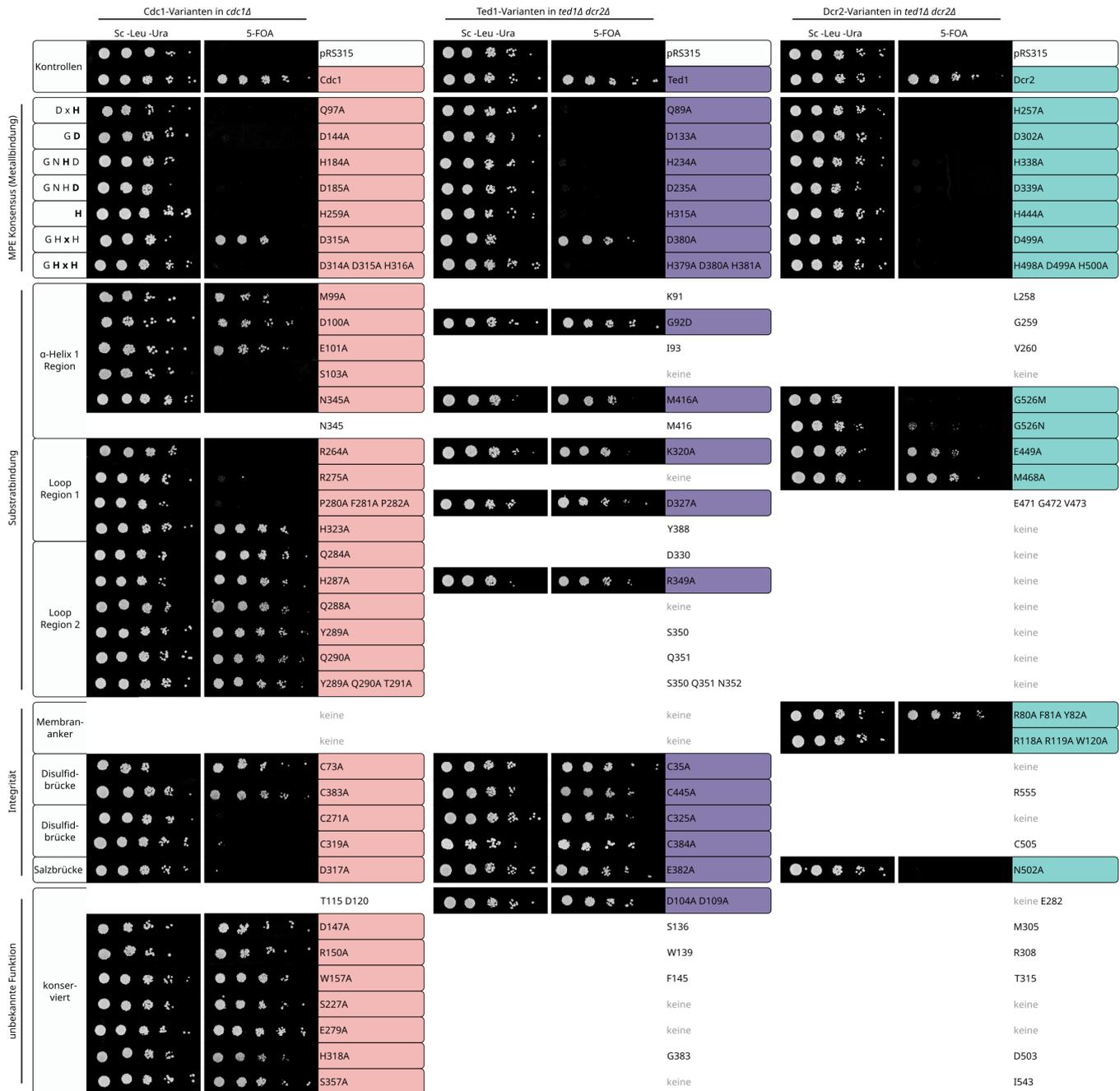


Abb. 22: Komplementationsanalyse der 66 Cdc1, Ted1 und Dcr2-Mutanten durch Plasmid Shuffling
 Die Cdc1-Varianten (rosa) wurden im *cdc1Δ*-Stamm und die Ted1- (violett) und Dcr2-Varianten (türkis) im *ted1Δ dcr2Δ*-Stamm in Flüssigkultur angezogen und auf eine OD_{600nm} von 0,5 eingestellt. Es wurden serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:5 angefertigt und auf eine Kontrollplatte ohne Leucin und ohne Uracil und auf eine 5-FOA-Selektionsplatte aufgetropft. Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus mindestens drei biologischen Replikaten. Als Kontrolle dienten Stämme mit leerem *LEU2*-Plasmidvektor (pRS315) und Stämme mit Wildtypvariante des Gens in pRS315. Nicht alle getesteten Varianten stammen von einer Platte, zeigten aber vergleichbares Wachstum der Kontrollen auf allen Platten.

Ein Drittel der Cdc1 Mutanten, welche einen mutmaßlichen Einfluss auf die Substratbindung besitzen, führten zum Funktionsverlust im *CDC1*-Deletionsstamm. Bei diesen essentiellen Resten han-

delt es sich um zwei Reste, welche nahe der α -Helix 1 lokalisiert sind (S103A und N345A) und alle Reste, die in Region 1 von Loop 14 mutiert wurden (R264A, R275A und der Dreifachaustausch P280A-F281A-P282A). Für S103 gibt es keine strukturell analogen Reste in Ted1 oder in Dcr2. Für die zu Cdc1^{P280AF281AP282A} strukturell analoge Mutante Ted1^{D327} konnte kein Funktionsverlust festgestellt werden. Für die Cdc1-spezifisch essentiellen Reste R264, R275 und N345 konnten ebenfalls analoge Reste in Ted1 und Dcr2 identifiziert werden. Bei Ted1 zeigte jedoch keine der eingeführten Mutationen (K320A oder M416A) einen Funktionsverlust. Dcr2 weist als strukturellen analogen Rest zu Cdc1^{N345A} und Ted1^{M416A} lediglich ein Glycin auf. Daher wurden die zwei Austausche Dcr2^{G526N} und Dcr2^{G526M} funktionell analysiert. Während der Austausch durch das Ted1-spezifische Methionin zum vollständigen Funktionsverlust führte, konnte bei einem Austausch zu Asparagin sehr schwaches Wachstum detektiert werden. Die anderen strukturell analogen Reste aus Dcr2 E449 und M468 besaßen keine essentielle Rolle für die Proteinfunktion. Alle Cdc1-Varianten mit Mutationen in der Region 2 von Loop 14 (Q284A, H287A, Q288A, Y289A, Q290A und Y289A-Q290A-T291A) zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Cdc1-Funktion. Auch Cdc1^{H323A} zeigte keinen Funktionsverlust bei Wachstum auf 5-FOA. Auch die Variante Ted1^{R349A}, welche analog zu Cdc1^{H287A} ist, zeigte normales Wachstum auf 5-FOA.

Von den beiden Dcr2-Varianten mit Mutationen im mutmaßlichen Membrananker Dcr2^{R80A, F81A, Y82A} und Dcr2^{R118A, R119A, W120A} führte lediglich der Dreifachaustausch R118A-R119A-W120A zum Funktionsverlust der Dcr2-Funktion. Hinsichtlich der beiden mutmaßlichen Disulfidbrücken konnte für Cdc1 gezeigt werden, dass die Austausche C271A und C319A zum Verlust der Cdc1-Funktion führten, während die Mutationen C73A und C383A keinen Einfluss auf die Funktion aufwiesen. Im Gegensatz dazu konnte hinsichtlich der Disulfidbrücken für Ted1 gezeigt werden, dass keine der Varianten C35A, C445A, C325A oder C384A zum Verlust der Ted1-Funktion führten. Die Zerstörung der Salzbrücke zwischen D317 und K280 bei Cdc1 führte bei der Variante Cdc1^{D317A} zum Funktionsverlust. Die strukturell analoge Mutante Dcr2^{N502A} zeigte ebenfalls den letalen Wachstumsphänotypen auf 5-FOA, wohingegen der Austausch E382A bei Ted1 keinen Einfluss auf die Funktion aufwies. Von allen Cdc1-Varianten mit Mutationen konservierter Reste ohne gemutmaßte Funktion (D147A, R150A, W157A, S227A, E279A, H318A und S357A) konnte kein Funktionsverlust gezeigt werden. Das gleiche gilt für die Ted1-Variante D104A-D109A.

Abgesehen von den MPE-Signaturmotif-Mutanten waren insgesamt 8 von 27 Resten (~30 %) mit mutmaßlicher Funktion in Cdc1 essentiell. Für Dcr2 führten 3 von 7 Mutationen (~43 %) zum

Funktionsverlust und für Ted1 konnte abgesehen von Mutationen innerhalb der MPE-Signatur keine einzige Mutation zum Funktionsverlust des Proteins führen.

2.5.3 Identifizierung von Aminosäureresten mit Stress-spezifischer Funktion

Das für Cdc1, Ted1 und Dcr2 etablierte *Plasmid Shuffling* System ermöglichte eine erste Funktionsanalyse von 66 verschiedenen Mutanten. Etwas mehr als die Hälfte der eingeführten Mutationen führte nicht zum letalen 5-FOA Phänotyp und somit nicht zu einem völligen Funktionsverlust der Mutanten. Daher wurden nachfolgend alle 36 nicht letalen Mutanten von Cdc1, Ted1 und Dcr2 in Hinblick auf ihre Funktion phänotypisch charakterisiert werden. Hierzu wurden die Mutanten auf ihr Wachstum unter den drei Zellwandstressoren Calcofluorweiß, Kongorot und Caspofungin untersucht.

Ein Fünftel der 20 nicht letalen Cdc1-Varianten zeigte kein Wachstum unter allen drei getesteten Stressbedingungen (Abb. 23). Bei den insgesamt vier Resten mit Wachstumsdefizit auf allen getesteten Zellwandstressoren handelt es sich um D315, welcher Teil der MPE-Signatur ist sowie um die Reste D100, Q290 und die Mutante Y289A-Q290A-T291A mit mutmaßlicher Funktion im Hinblick auf die Substratbindung. Die Mutation des konservierten D147 mit unbekannter Funktion führte zu Wachstumsdefiziten auf Kongorot und Caspofungin. Zu Zellwandstress-spezifischen Wachstumsdefiziten führten die Mutationen der Reste M99 und C383 bei Wachstum auf Kongorot und Q284 mit einem leichten Wachstumsdefizit unter Caspofungin Stress. Die übrigen 12 Cdc1-Varianten E101A, H323A, Q284A, H287A, Q288A, Y289A, C73A, R150A, W157A, S227A, E279A, H318A und S357A zeigten keine Phänotypen unter den getesteten Bedingungen.

Analog zu den phänotypisch analysierten Cdc1-Varianten wurden auch die zwölf nicht letalen Ted1-Mutanten durch Wachstumsanalysen mit den gleichen Zellwandstressoren charakterisiert. Von den zwölf getesteten Ted1-Varianten zeigten drei Mutanten starke und zwei Mutanten leichte Wachstumsdefizite auf mindestens einem der getesteten Zellwandstressoren (Abb. 24).

Lediglich der Austausch des konservierten D327 mit mutmaßlicher Rolle in der Substratbindung durch Alanin führte zu Wachstumsdefekten unter allen drei Zellwandstressoren. Die Mutation der Disulfidbrücke aus C35 und C445 führte zu Wachstumsdefiziten auf Calcofluorweiß. Das Wachstum der Ted1^{C445A}-Variante ist allerdings deutlich schwächer als Ted1^{C35A}. Unter Kongorot-Stress zeigte nur die Mutation von C445 einen Effekt auf die Vitalität der Zellen. Die Mutation von G92D führte

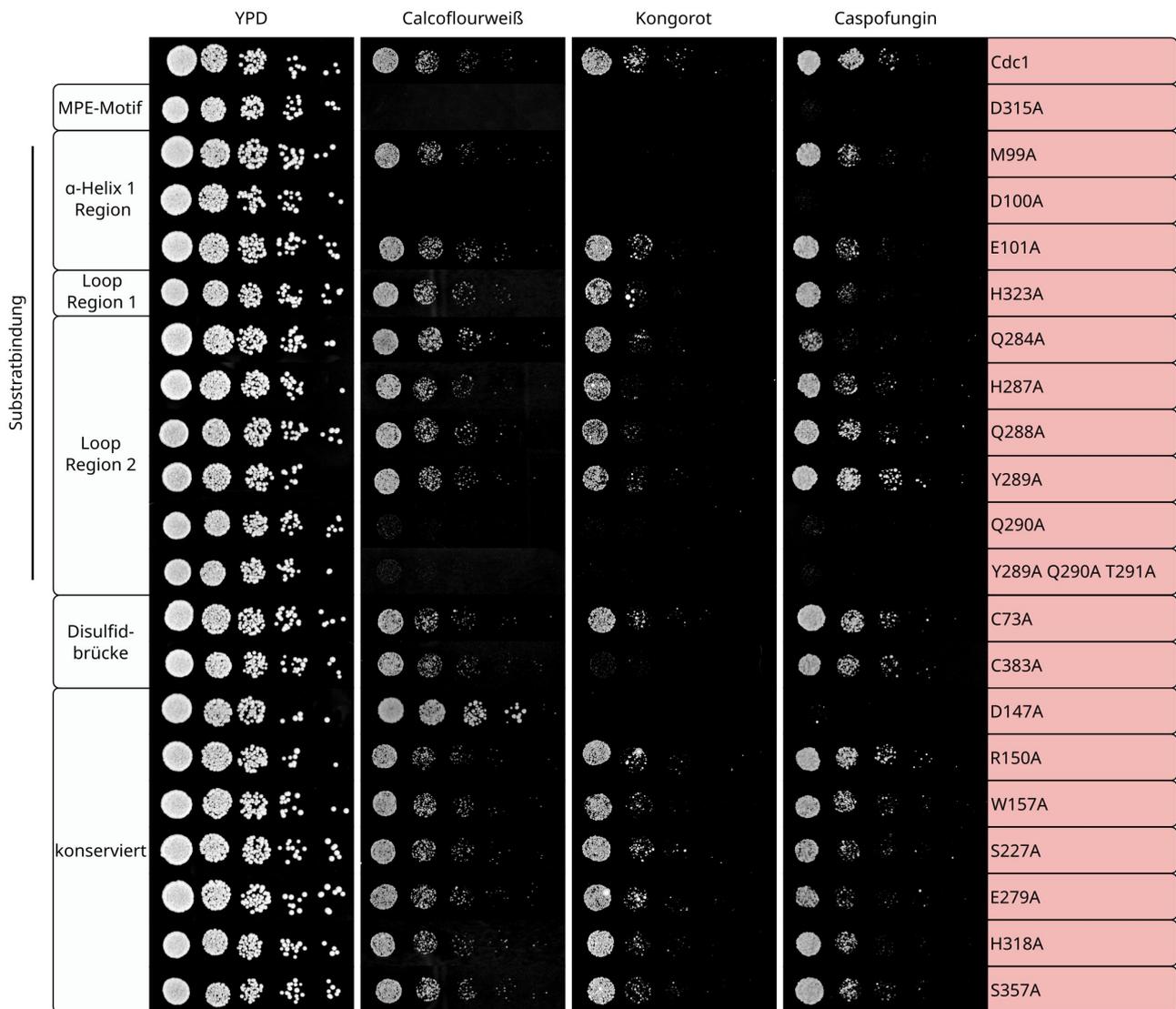


Abb. 23: Phänotypische Wachstumsanalyse der Cdc1-Varianten auf verschiedenen Zellwandstressen

Übernachtulturen der Stämme mit Cdc1-Varianten im *cdc1Δ*-Hintergrund wurden auf eine OD600nm von 0,2 eingestellt und anschließend seriell im Verhältnis 1:5 verdünnt und auf YPD-Festmedium mit und ohne verschiedene Zellwandstresse aufgetropft. Die Stressoren wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: Calcofluorweiß 0,1 %, Kongorot 400 µg/ml und Caspofungin 4,8 µg/ml. Die Inkubation erfolgte auf YPD ohne Zusätze und mit Caspofungin für 48 h. Unter Wachstum auf den Stressen Calcofluorweiß und Kongorot erfolgte die Inkubation für 72 h. Als Wildtypkontrolle diente Cdc1 im LEU2-Plasmidvektor. Das Bild zeigt einen repräsentativen Klon aus mindestens drei biologischen Replikaten. Pro Bedingung wurden alle Stämme auf zwei Platten gemessen. Die Messung erfolgte am selben Tag mit vergleichbarem Wachstum der Kontrolle.

bei Ted1 Zellwandstress spezifisch zu einem Wachstumsdefekt unter Calcofluorweiß-Stress. Dies galt auch für die Mutation D380A, welche Teil der MPE-Signatur ist und ein etwa 125-fach schlechteres Wachstum als die Wildtypkontrolle aufwies. Die übrigen 7 Ted1-Varianten zeigten keinen Effekt.

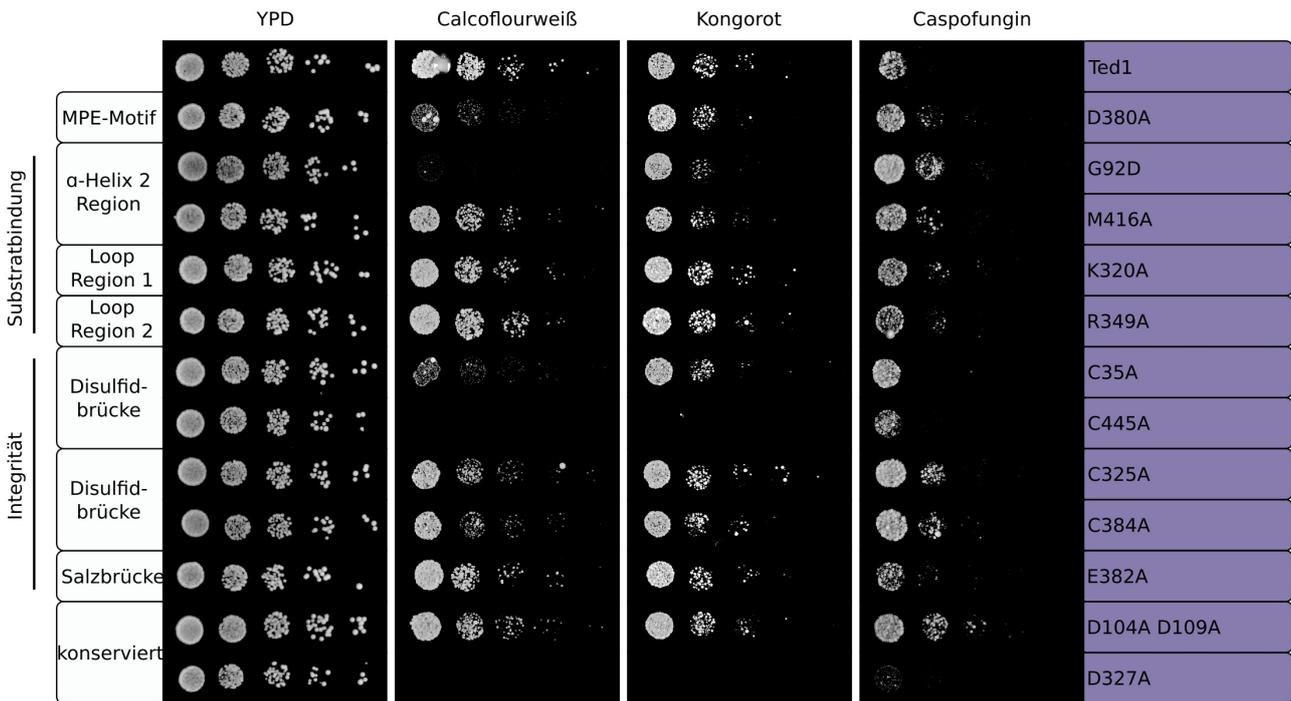


Abb. 24: Phänotypische Wachstumsanalyse der Ted1-Varianten auf verschiedenen Zellwandstressoren

Die Stämme mit Ted1-Varianten im *ted1Δ dcr2Δ*-Stammhintergrund wurden analog zum Cdc1-Variantenset (Abb. 23) behandelt. Die verwendeten Stressor Konzentrationen sind: Calcofluorweiß 0,125 %, Kongorot 600 µg/ml und Caspofungin 4,8 µg/ml. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 30 °C. Als Kontrolle diente Ted1 im *LEU2*-Plasmidvektor. Pro Bedingung wurden alle Stämme auf einer Platte vermessen. Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus mindestens drei biologischen Replikaten.

Für Dcr2 wurden vier nicht letale Mutanten identifiziert. Auch diese Dcr2-Varianten wurden auf ihr Wachstum unter den drei Zellwandstressoren charakterisiert (Abb. 23).

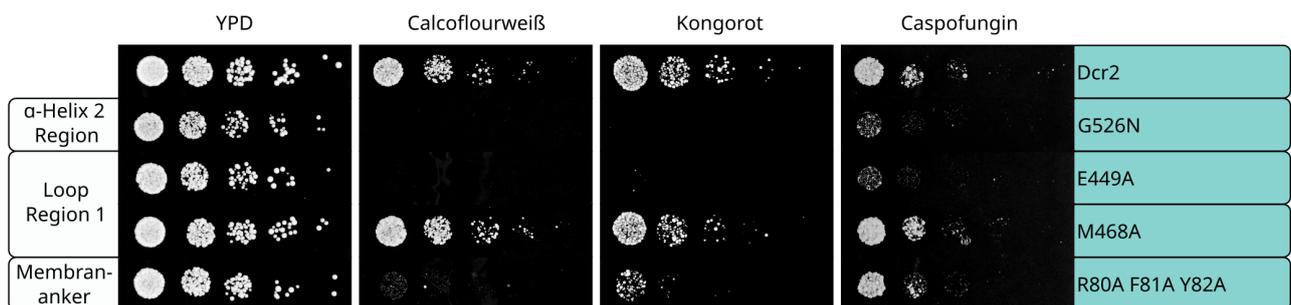


Abb. 25: Phänotypische Wachstumsanalyse der Dcr2-Varianten auf verschiedenen Zellwandstressoren

Die Stämme mit Dcr2-Varianten im *ted1Δ dcr2Δ*-Stammhintergrund wurden analog zum Cdc1-Variantenset (Abb. 23) behandelt. Die verwendeten Stressor Konzentrationen sind: Calcofluorweiß 0,125 %, Kongorot 100 µg/ml und Caspofungin 4,8 µg/ml. Die Inkubation erfolgte für die YPD-Kontrolle, Kongorot und Calcofluorweiß für 48 h bei 30 °C. Als Kontrolle diente Dcr2 im *LEU2*-Plasmidvektor. Pro Bedingung wurden alle Stämme auf einer Platte vermessen. Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus mindestens drei biologischen Replikaten.

Insgesamt zeigten drei der vier nicht letalen Dcr2-Varianten ein Wachstumsdefizit auf mindestens einem der Zellwandstresse. Die Austausch E449A und G526N führten dazu, dass kein Wachstum der Zellen unter allen drei Stressoren erkennbar war. Der mutmaßliche Membrananker aus R80-F81-Y82 führte bei dreifachem Austausch zu Alanin zu einem verminderten Wachstum auf Kongorot und keinem Wachstum unter Calcofluorweiß-Stress. Die Mutation hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen unter Caspofungin-Stress. Einzig der Rest M468 hatte keinen Einfluss auf die Funktion von Dcr2 unter den getesteten Bedingungen.

2.6 Reziproker Austausch der MPE-Domänenfunktion von Cdc1, Ted1 und Dcr2

In den bisherigen Untersuchungen konnten durch strukturbasierte Analysen Reste von Cdc1, Ted1 und Dcr2 ermittelt werden, welche essentiell für Funktion des Proteins sind oder eine essentielle Rolle unter verschiedenen Stressbedingungen spielen. Neben der generellen Funktion der Proteine und ihrem Platz im GPI-Biosynthese Netzwerk ist allerdings nichts darüber bekannt, wie diese Proteine Spezifität im Hinblick auf die Erkennung von EtNP-1/ EtNP-2 und in Hinblick auf spezifische GPI-verankerte Proteine vermitteln. Für Proteine mit MPE-Domäne konnte anhand einiger Beispiele in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Substratspezifität anhand spezifischer Bereiche innerhalb der MPE-Domäne oder durch zusätzliche Proteindomänen vermittelt werden kann (Knöfel & Sträter 2001; Montemayor *et al.* 2014; Matange *et al.* 2015). Im nächsten Schritt sollte daher die Frage geklärt werden, ob die Substratspezifität von Cdc1 (EtNP-1) und Ted1/ Dcr2 (EtNP-2) von einer distinkten Domäne der Proteine vermittelt wird und übertragbar ist. Hierzu wurde zunächst die Proteinsequenzidentität der Proteine über die gesamte Proteinelänge und über die MPE-Domäne verglichen (Tab. 2).

Tab. 2: Proteinsequenzidentität zwischen Cdc1, Ted1 und Dcr2 basierend auf ClustalOmega Sequenzalignment (Thompson *et al.* 1994; Sievers *et al.* 2011; Madeira *et al.* 2019)

Sequenzidentität gesamtes Protein [%]				Sequenzidentität MPE-Domäne [%]			
	Cdc1	Ted1	Dcr2		Cdc1	Ted1	Dcr2
Cdc1	100	21,2	13,3	Cdc1	100	21,6	20,7
Ted1	21,2	100	16,7	Ted1	21,6	100	15,4
Dcr2	13,3	16,7	100	Dcr2	20,7	15,4	100

Die Proteinsequenzidentität der gesamten Proteine liegt zwischen Cdc1 und Ted1 bei 21,2 %. Interessanterweise ist die Sequenzidentität zwischen Ted1 und Dcr2 niedriger und liegt bei lediglich 16,7 %. Am wenigsten ähnlich sind Cdc1 und Dcr2 mit einer Sequenzidentität von 13,3 %. Auch der Vergleich der MPE-Domänen zeigt, dass die Proteine sequenziell keine starke Identität besitzen. So liegt die Sequenzidentität zwischen der MPE-Domäne von Cdc1 und Ted1/ Dcr2 bei etwa 20 %. Obwohl Ted1 und Dcr2 das gleiche Substrat erkennen, sind ihre MPE-Domänen mit 15,4 % Sequenzidentität am verschiedensten.

Die Herstellung von Proteinchimären aus Cdc1, Ted1 und Dcr2 mit anschließender Komplementationanalyse sollte Rückschlüsse darüber ermöglichen, ob die Substratspezifität durch Austauschen der MPE-Domäne übertragen werden kann und welche Domänen der Proteine Substratspezifität vermitteln. Insgesamt wurden sechs Plasmid-basierte MPE-Chimärenkonstrukte hergestellt, bei denen lediglich die MPE-Domäne durch jeweils eine der anderen MPE-Domänen ersetzt wurde. Die MPE-Chimären wurden im *Plasmid Shuffling* System sowohl im *cdc1Δ* als auch im *ted1Δ dcr2Δ* Stammhintergrund auf Wachstum auf 5-FOA untersucht (Abb. 26).

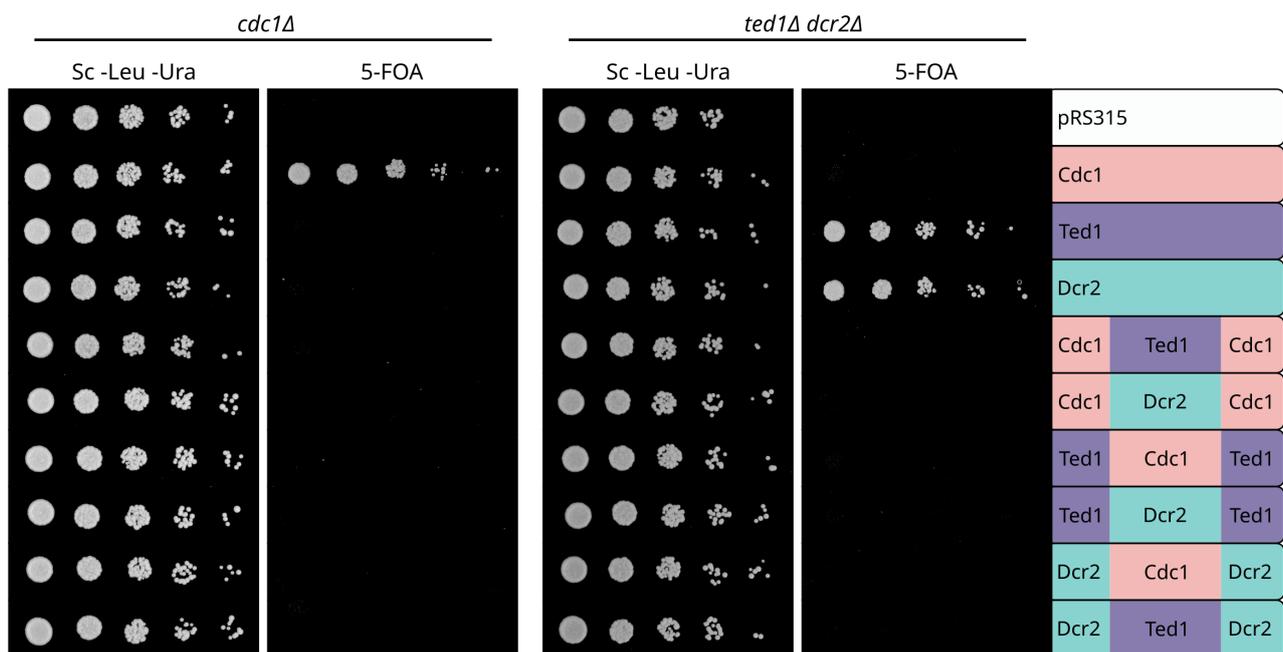


Abb. 26: Komeplementationsanalyse von MPE-Chimären aus Cdc1, Ted1 und Dcr2

Alle Chimären wurden im *cdc1Δ*- und *ted1Δ dcr2Δ*-Stammhintergrund vermessen. Übernachtskulturen der Stämme wurden in Sc-Medium angezogen und auf eine OD_{600nm} von 0,5 eingestellt. Es wurden serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:5 angefertigt und auf eine Sc-Kontrollplatte und eine 5-FOA-haltige Platte aufgetropft. Die Stämme wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrollen diente ein leerer *LEU2*-Plasmidvektor pRS315 und die Wildtypvarianten der Proteine in pRS315. Pro Stammhintergrund und Bedingung wurde die gleiche Platte verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus drei Messungen.

Keine der hergestellten Chimären war dazu in der Lage, eine Cdc1- oder eine Ted1-/Dcr2-spezifische Funktion zu übernehmen. Es ist denkbar, dass die Lokalisation der generierten Chimären eine Rolle für deren Funktion spielen könnte oder dass die ausgetauschten MPE-Domänen funktionell inkompatibel mit den gewählten N- und C-terminalen Regionen sind.

2.7 Funktionelle Analyse der Cdc1- und Ted1-Orthologe aus dem filamentösen Pilz *C. thermophilum*

Um nächste Erkenntnisse über die Konservierung der spezifischen Metallophoesterasefunktion von Cdc1 und Ted1 zu gewinnen, wurde eine Komplementationsanalyse mit den mutmaßlichen Orthologen der beiden Proteine (*CtCdc1* und *CtTed1*) aus *C. thermophilum* durchgeführt. Die Proteine aus *C. thermophilum* wurden für die Komplementationsanalyse ausgewählt, da der Pilz taxonomisch zwar zu den Ascomyceten zählt, aber als Teil der Sordariomyceten weiter entfernt von *S. cerevisiae* ist als beispielsweise die humanpathogene *Candida species* (Amlacher *et al.* 2011). Zudem weisen *CtCdc1* und *CtTed1* in ihrer Domänenstruktur diverse Unterschiede zu den beiden Proteinen aus *S. cerevisiae* auf.

Insgesamt liegt die Proteinsequenzidentität, welche mithilfe eines *ClustalOmega* Alignments ermittelt wurde (Sievers *et al.* 2011), zwischen Ted1 und *CtTed1* bei 34,8 % und zwischen Cdc1 und *CtCdc1* bei 36,1 %. Bezogen auf die MPE-Domäne der Proteine liegt die Sequenzidentität von Ted1 und *CtTed1* bei 36,2 % und für Cdc1 und *CtCdc1* sogar bei 45,0 %. Neben der allgemeinen Sequenzidentität der Proteine spielt jedoch auch ihre Domänenstruktur und Faltung eine entscheidende Rolle bei der Frage, ob die Funktion von Cdc1 und Ted1 bis zu den *Sordariomyceten* konserviert ist (Abb. 27).

Während die MPE-Domäne zwischen Cdc1 und *CtCdc1* sowie zwischen beiden Ted1 Orthologen sehr ähnlich strukturiert ist, weisen die Proteine vor allem außerhalb des katalytischen MPE-Zentrums strukturelle und sequenzielle Unterschiede auf. So weist *CtTed1* beispielsweise eine deutlich längere α -Helix 1 als Ted1 auf. Oberhalb des katalytischen MPE-Zentrums besitzt *CtTed1* drei zusätzliche α -Helices. Für die Komplementationsanalyse zwischen Ted1 und *CtTed1* wurde eine Proteinchimäre aus beiden Proteinen hergestellt. Diese besitzt die native N- und C-terminale Proteinregion von Ted1 und die MPE-Domäne von *CtTed1* (S35 bis H544). Die Chimäre unterliegt dem nativen *TEDI* Promotor und Terminator.

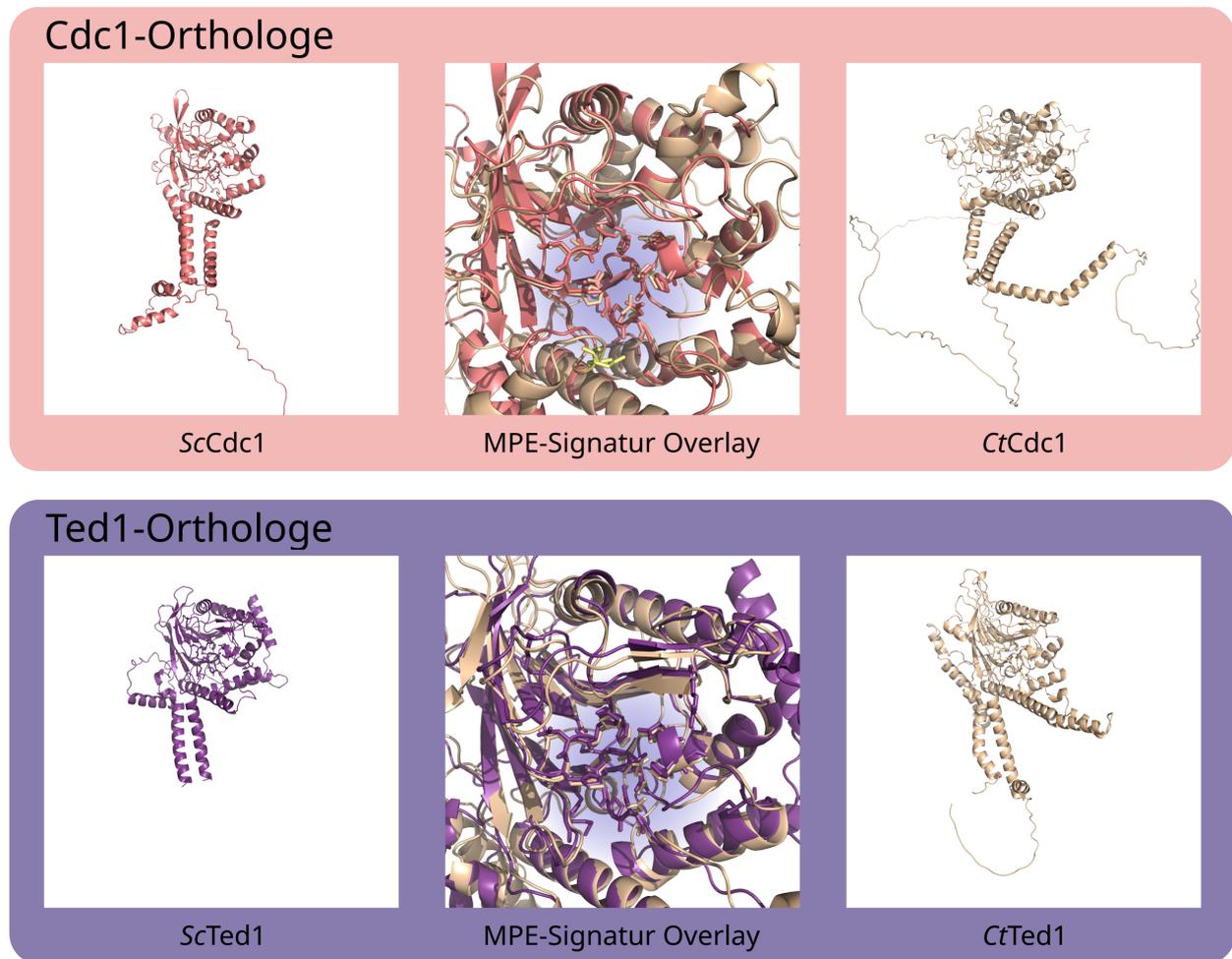


Abb. 27: Strukturmodelle von Cdc1 und Ted1 aus *S. cerevisiae* und *C. thermophilum* im Vergleich

Die gezeigten Modelle sind aus der AlphaFold Datenbank (Varadi *et al.* 2022). Cdc1 ist rosa, Ted1 violett und die entsprechenden Orthologe aus *C. thermophilum* jeweils in beige dargestellt. Die Reste des MPE-Signaturmotifs sind in ihrer Struktur hervorgehoben. Die Reste N345 aus *ScCdc1* und A489 aus *CtCdc1* sind gelb markiert.

Im Vergleich der beiden Cdc1 Orthologe sind ebenfalls vor allem außerhalb des MPE-Zentrums Unterschiede zu verzeichnen. *CtCdc1* weist im Gegensatz zu Cdc1 lediglich zwei anstelle von drei mutmaßlichen Transmembrandomänen auf. Zudem besitzt das Protein einen etwa 100 Peptide langen, ungeordneten Bereich, der sich im Modell schlaufenartig um das Protein legt. Die Konfidenz dieses strukturellen Abschnitts ist allerdings sehr gering. Interessanterweise entspricht der für Cdc1 essentielle Rest N345, welcher sich nah am MPE-Zentrum befindet, bei *CtCdc1* dem Rest A489. Es ist allerdings unklar, ob dieser Rest im *CtCdc1*-Umfeld für die Funktion von Cdc1 in *S. cerevisiae* ebenfalls essentiell ist. Daher wurde für die Komplementationsanalyse von *CtCdc1* die native MPE-Domäne von *CtCdc1* und eine mutierte Variante *CtCdc1*^{A489N} eingesetzt. Da es keine Informationen über die Sekretion von *CtCdc1* gibt und Cdc1 in *S. cerevisiae* Golgi lokalisiert ist, wurden die bei-

den *CtCdc1* Varianten in jeweils zwei verschiedenen Konstrukten untersucht. Einerseits wurde analog zu *CtTed1* eine Proteinchimäre aus *CtCdc1* und *Cdc1* hergestellt, welche unter der Expression des *CDC1* Promotors und Terminators liegt und lediglich einen Austausch der MPE-Domäne (*Cdc1* Y61 bis A391 ausgetauscht durch *CtCdc1* G107 bis M529) aufweist, um zu analysieren, ob die Kernfunktion des Proteins übertragbar ist. Zudem wurde auch das gesamte *CtCdc1* Protein unter der Expression des nativen *CDC1* Promotors und Terminators analysiert.

Die insgesamt vier *CtCdc1* Konstrukte sowie die *CtTed1*-Chimäre wurden in einen *LEU2*-basierten Plasmidvektor kloniert und anschließend im *Plasmid Shuffling* System im *cdc1Δ* bzw. im *ted1Δ dcr2Δ* Stammhintergrund auf Komplementation hin analysiert (Abb. 28). Vorarbeiten und Teile dieses Abschnitts sind im Rahmen der Bachelorarbeiten von Amon Nemeth (Klonierung *Ted1-CtTed1-Ted1*) und Lara Hollmann (Klonierung *CtCdc1* und *Cdc1-CtCdc1-Cdc1*) entstanden.

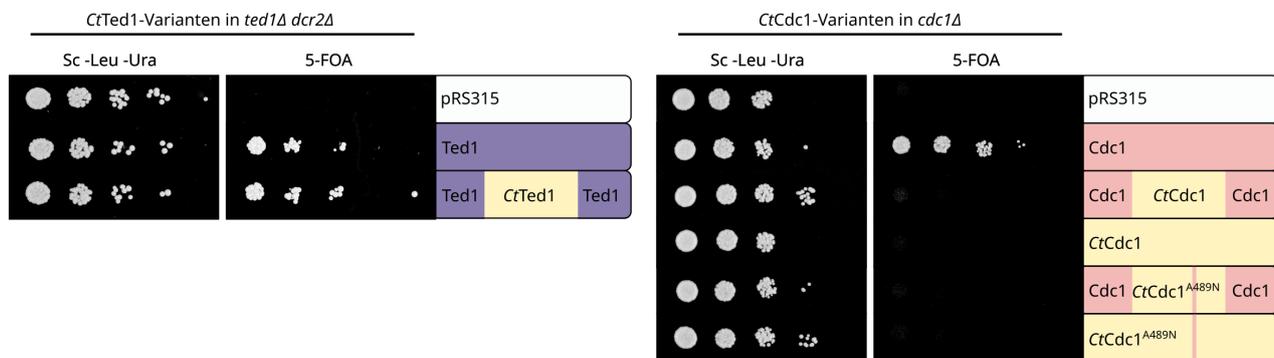


Abb. 28: Komplementationsanalyse mit *Cdc1* und *Ted1* Orthologen mit *Chaetomium thermophilum*

Alle getesteten *Ted1*-Varianten wurden im *ted1Δ dcr2Δ*-Stammhintergrund und alle getesteten *Cdc1*-Varianten im *cdc1Δ*-Hintergrund vermessen. Übernachtskulturen der Stämme wurden in Sc-Medium angezogen und auf eine OD_{600nm} von 0,5 eingestellt. Es wurden serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:5 angefertigt und auf eine Sc-Kontrollplatte und eine 5-FOA-haltige Platte aufgetropft. Die Stämme wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Als Kontrollen diente ein leerer *LEU2*-Plasmidvektor pRS315 und die Wildtypvarianten der Proteine in pRS315. Pro Stamm und Bedingung wurde die gleiche Platte verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus drei Messungen.

Von allen getesteten Proteinvarianten aus *C. thermophilum* war lediglich *Ted1-CtTed1-Ted1* dazu in der Lage, den letalen Wachstumsphänotypen der Deletionsstämme auf 5-FOA zu komplementieren. Dagegen kann keine der *CtCdc1* Varianten die *Cdc1*-spezifische Funktion in *S. cerevisiae* übernehmen. Dies könnte insgesamt ein Hinweis darauf sein, dass die *Ted1*-Funktion grundsätzlich stärker konserviert oder weniger spezifisch als die *Cdc1*-Funktion ist.

2.8 Veränderung der Funktion von Cdc1 mittels *in vitro* Evolution

2.8.1 Isolierung einer *CDC1*-Variante mit *TED1*-spezifischem, Zink²⁺-resistenten Phänotyp

Die bisherigen Untersuchungen deuten daraufhin, dass die spezifische Funktion von Cdc1 und Ted1 nicht durch den reziproken Austausch größerer Bereiche der Proteine übertragen werden kann. Einerseits muss hierbei das korrekte Substrat (EtNP-1 vs. EtNP-2) durch spezifische Reste erkannt werden, andererseits ist bislang nicht geklärt, ob Cdc1 und Ted1 zudem andere Bereiche des GPI-Ankers oder des GPI-verankerten Proteins erkennen müssen. Die mannigfaltige Anzahl an Möglichkeiten zur Substraterkennung und dafür zuständigen Resten der Proteine legt nahe, dass durch eine zufällige Mutagenese mögliche Kandidaten zur Spezifitätsvermittlung identifiziert werden könnten. Durch einen *in vitro* Evolutionsansatz wurden daher Mutationen in Cdc1 angereichert, welche zur Komplementation eines *ted1Δ*-spezifischen Phänotyps führen (Abb. 29).

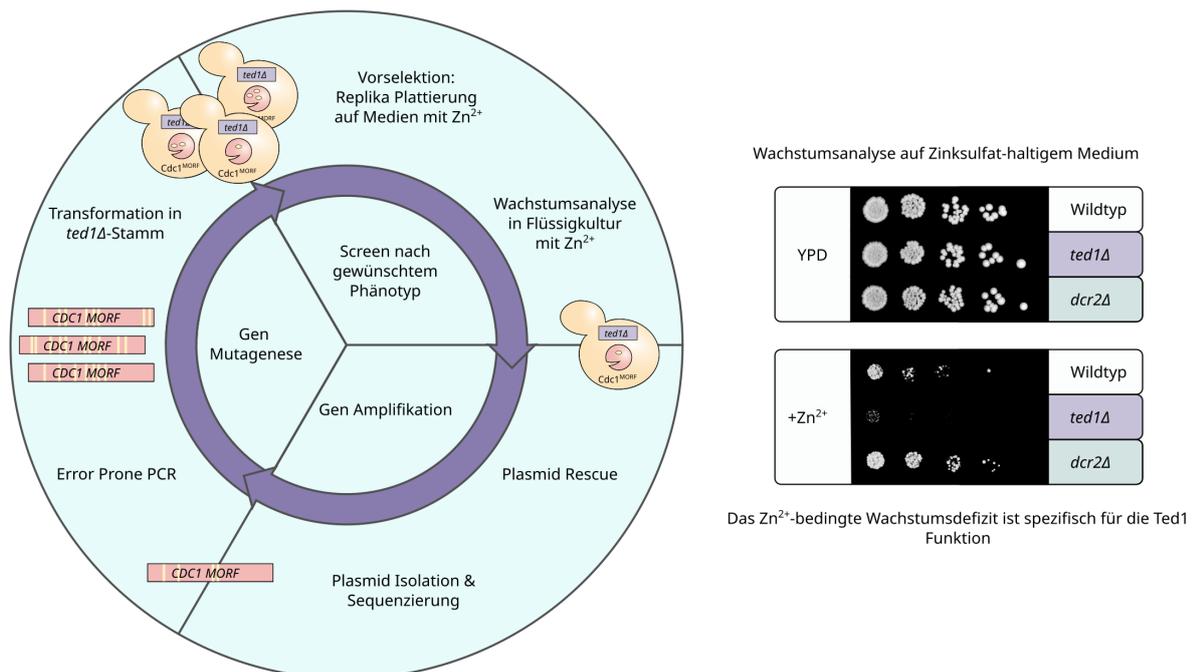


Abb. 29: Flussschema zur Herstellung einer Cdc1^{MORF} Variante mittels *in vitro* Evolution

Links: Flussschema zur Herstellung einer Cdc1-Variante mit Ted1-Substratspezifität durch *in vitro* Evolution. Die Anpassung an Zink²⁺-Stress erfolgte durch Zinksulfat mit der Konzentration 6 mM in Zyklus 1 bis 9,5 mM in Zyklus 6.

Rechts: Wachstumsdefizit unter Zink²⁺-Stress ist ein Ted1-spezifischer Phänotyp. Übernachtkulturen der Stämme wurden in YPD angezogen und auf eine OD_{600nm} von 0,2 eingestellt. Es wurden serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:5 angefertigt und auf YPD Festmedium ohne und mit 12 mM Zink aufgetropft. Die Stämme wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Als Wildtypkontrolle diente YHUM0464. Pro Bedingung wurde für alle Stämme die gleiche Platte verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus drei Messungen.

Als Phänotyp wurde in diesem Fall das Wachstumsdefizit von *TEDI*-Deletionsstämmen auf Zink-sulfat-haltigen Medien gewählt, da dieser Phänotyp nicht in *dcr2Δ*-Stammhintergründen und nur sehr schwach im *CDC1^{low*}*-Stammhintergrund auftritt, ergo spezifisch in Abwesenheit von Ted1 auftritt. Dieser Phänotyp hat zudem gegenüber Komplementationsanalysen wie dem *Plasmid Shuffling* den Vorteil, dass die Konzentration des Stressors nach Bedarf angepasst werden kann.

Für die *in vitro* Evolution von Cdc1 wurden Mutationen im *CDC1* ORF mithilfe einer *Error Prone* PCR angereichert und anschließend Plasmid-basiert in einen *ted1Δ*-Stamm eingebracht. Der Pool generierter Cdc1 Mutanten wurde Wachstumsanalysen unter Zink²⁺-Stress unterzogen. Vielversprechende Klone wurden für weitere Zyklen verwendet. Nach insgesamt sechs durchlaufenen Zyklen wurde eine einzige Variante Cdc1^{MORF} (*Mutated Open Reading Frame*) gefunden, welche das Zink²⁺-Stress bedingte Wachstumsdefizit des *TEDI*-Deletionsstamms komplementieren konnte.

Um Cdc1^{MORF} weitergehend zu charakterisieren, wurde das Protein verschiedenen Wachstumsanalysen im *ted1Δ*-Stammhintergrund unterzogen (Abb. 30).

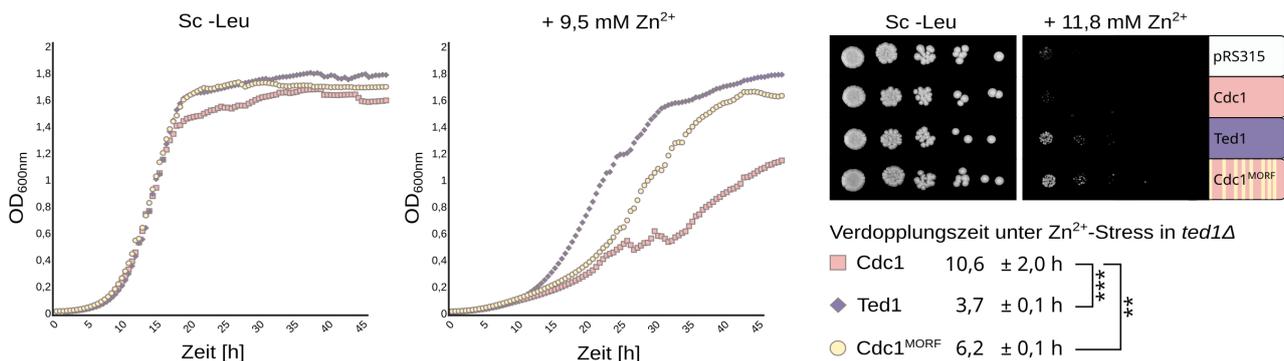


Abb. 30: Komplementationsanalyse von Cdc1^{MORF} unter Zink²⁺-Stress

Links: Übernachtskulturen der Stämme im *ted1Δ*-Stammhintergrund wurden in Sc-Medium angezogen und auf eine OD_{600nm} von 0,05 eingestellt. Davon wurden je 200 µl in Triplikaten in eine 96-Wellplatte überführt. Die Wachstumsanalyse erfolgte mittels Fluorimeter in Sc-Medium mit und ohne 9,5 mM Zinksulfat für 48 h unter schnellem Schütteln. Die OD_{600nm} der Kulturen wurde alle 30 min bestimmt. Als Kontrolle dienen der Cdc1 Wildtyp und der Ted1 Wildtyp. Die Kurven zeigen Mittelwerte aus vier Messungen à zwei biologischen Replikaten. Alle Plasmide wurden vor der Analyse frisch in den *ted1Δ*-Stamm transformiert. Die Verdopplungszeit beschreibt die Zellteilungsgeschwindigkeit in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} 0,2 bis 0,8) und zeigt einen Mittelwert der vier Messungen und deren Standardabweichung.

Rechts: Übernachtskulturen der gleichen Stämme wurden in Sc-Medium angezogen und auf eine OD_{600nm} von 0,2 eingestellt. Es wurden serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:5 angefertigt und auf Sc-Festmedium ohne und mit 11,8 mM Zink aufgetropft. Die Stämme wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert.

Durch Zugabe von 9,5 mM Zinksulfat in Flüssigmedium und 11,8 mM Zinksulfat verbesserte Cdc1^{MORF} das Wachstumsdefizit des *ted1Δ*-Stammhintergrunds im Gegensatz zum Cdc1 Wildtyp signifikant. Unter normalen Wachstumsbedingungen zeigten *TEDI*-Deletionsstämmen unabhängig vom enthaltenen Plasmid kein Wachstumsdefizit. Sowohl Stämme mit Cdc1, Ted1 als auch Cd-

$c1^{MORF}$ wiesen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase die gleiche Verdopplungszeit von etwa 2 h auf. Bei Anwesenheit von 9,5 mM Zinksulfat zeigte der Kontrollstamm (Cdc1) ein deutliches Wachstumsdefizit mit einer Verdopplungszeit von ca. 10,6 h in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Kontrollstamm mit Ted1 zeigte dagegen eine Verdopplungszeit von etwa 3,7 h. $Cdc1^{MORF}$ führte in *TEDI*-Deletionsstämmen unter $Zink^{2+}$ -Stress zu einer signifikanten (**) Wachstumsverbesserung im Vergleich zum Cdc1 Wildtyp. Die Verdopplungszeit für Stämme mit $Cdc1^{MORF}$ betrug 6,2 h. Das Wachstum war damit mit $Cdc1^{MORF}$ etwa 70 % schneller als mit dem Cdc1 Wildtyp. Auf festem Medium zeigten *ted1Δ*-Stämme mit $Cdc1^{MORF}$ ein etwa fünf mal stärkeres Wachstum als mit der Cdc1 Wildtyp Variante. Die Sequenz von $Cdc1^{MORF}$ weist im Gegensatz zu Cdc1 insgesamt 33 mutierte Reste auf (Abb. 31.)

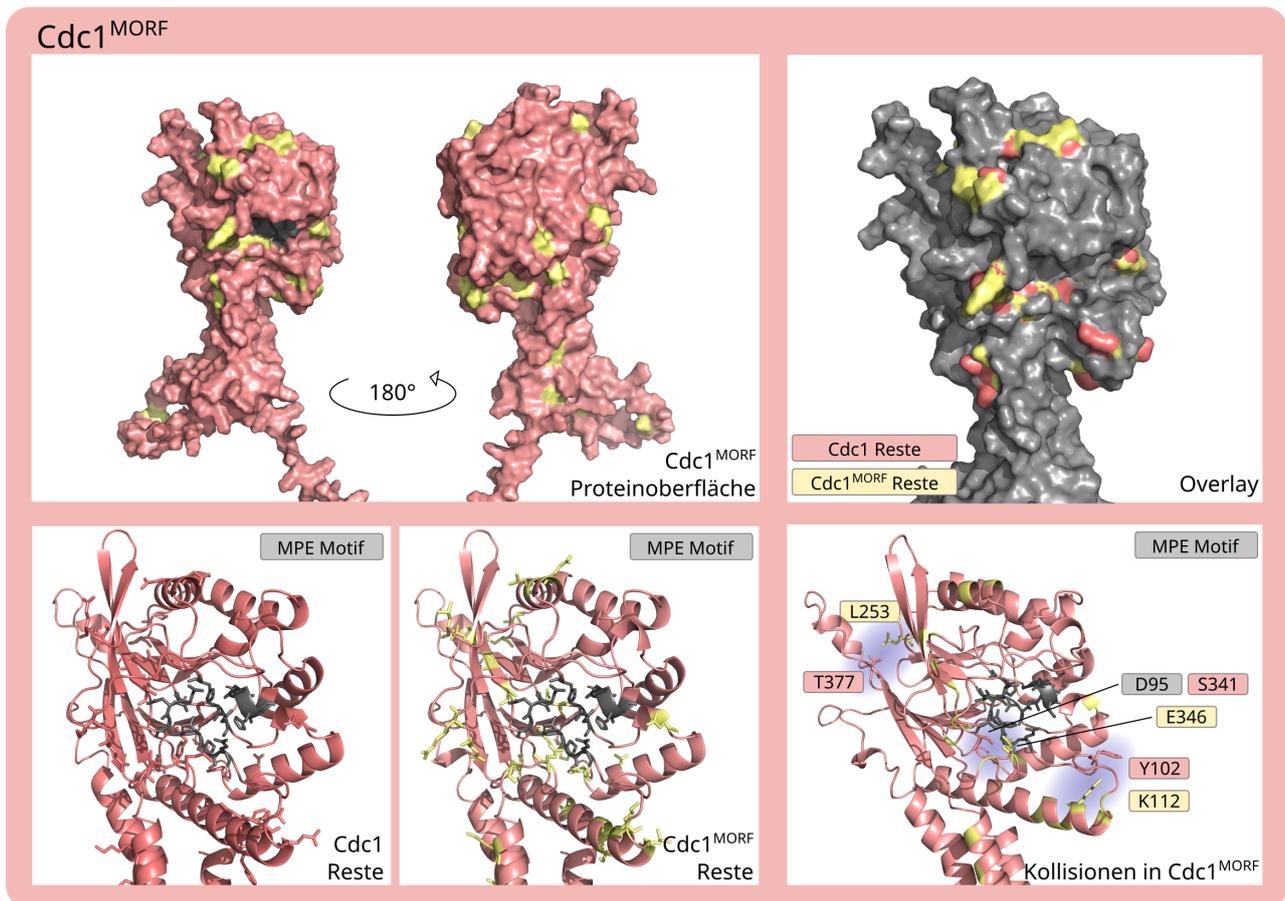


Abb. 31: Modell von $Cdc1^{MORF}$

$Cdc1^{MORF}$ wurde mithilfe der Rotamer Funktion von Chimera auf Basis des Cdc1 Strukturmodells der AlphaFold Datenbank (Varadi *et al.* 2022) modelliert. $Cdc1^{MORF}$ -spezifische Reste sind gelb markiert. Cdc1-Wildtyp-spezifische Reste sind rosa markiert.

Oben rechts: Overlay von Cdc1 und $Cdc1^{MORF}$. Gleiche Reste sind grau eingefärbt.

Unten: Cdc1 Modell und $Cdc1^{MORF}$ Modell mit hervorgehobenen abweichenden Resten sowie strukturelle Kollisionen in $Cdc1^{MORF}$ durch abweichende Reste. Die Reste der MPE-Signatur sind grau, $Cdc1^{MORF}$ spezifische Reste gelb markiert. Die Kollisionen wurden mithilfe der *Find clashes*-Funktion in Chimera identifiziert.

Zwei Mutationen (H23P und I42V) befinden sich in der N-terminalen Domäne von Cdc1^{MORF}. In der C-terminalen Domäne von Cdc1^{MORF} befinden sich 4 mutierte Reste, von denen ein Austausch in Transmembrandomäne 2 (M394V) und ein Austausch in Transmembrandomäne 3 (S479P) liegt. Die Mutation K390E wird entsprechend der in diesem Experiment gesetzten MPE-Domänengrenzen zur MPE-Domäne gezählt. Die große Mehrheit aus 26 von 33 der eingeführten Mutationen befinden sich innerhalb der MPE-Domäne (F93S – I348S). Von den 26 Mutationen befinden sich 21 auf der Proteinoberfläche. Es befinden sich keine Mutationen direkt im MPE-Signaturmotif. Die Modellierung von Cdc1^{MORF} führte zur Kollision mehrerer Reste innerhalb des Proteins. So bewirkte der Austausch N112K in α -Helix 1 zu einer Kollision mit Y102. P253 wurde in Cdc1^{MORF} zu Leucin ersetzt. Dies führt zu einer Kollision mit dem benachbarten T377 distal vom MPE-Zentrum. Der Austausch M346E führt zu Kollisionen mit D95 und S41 nahe dem MPE-Zentrum. Insgesamt kann keine Prognose darüber getroffen werden, welche der Mutationen einen Einfluss auf die Komplementation des Zink²⁺-abhängigen *ted1Δ*-Wachstumsdefizits von Cdc1^{MORF} besitzt. Es ist möglich, dass durch die strukturellen Kollisionen die Bindetasche räumlich verändert ist, oder dass spezifische Reste strukturunabhängig zu einer anderen Funktion führen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um Cdc1^{MORF} näher zu charakterisieren.

2.8.2 Zuordnung der in Cdc1^{MORF} mutierten Reste zur Cdc1- und Ted1/Dcr2-spezifischen Funktion

Um aus dem Pool dieser 33 Mutationen diejenigen Reste zu ermitteln, welche zu besserem Wachstum unter Zink²⁺-Stress führen, wurde zunächst eine funktionelle Kartierung der Domänen und eine anschließende Feinkartierung einzelner Mutationen durchgeführt. Ziel der Domänen austausche war es auch in diesem Fall, spezifische Domänen zu identifizieren, welche den Zink²⁺-Phänotypen vermitteln. Hierzu wurden ausgehend von Cdc1^{MORF} drei verschiedene Chimären hergestellt. Die erste weist nur in der N- und C-terminale Proteinregion Mutationen auf (Cdc1^{MORF}-Cdc1-Cdc1^{MORF}), die zweite weist nur innerhalb der MPE-Domäne Mutationen und die Mutation K390E auf (Cdc1-Cdc1^{MORF}-Cdc1) und die dritte Chimäre besteht aus der N- und C-terminalen Region von Ted1 mit der Cdc1^{MORF} MPE-Domäne (Ted1(M1-F60)-Cdc1^{MORF}(Y61-A391)-Ted1(V462-V473)). Um den gleichen Übergang zwischen den Proteindomänen in Hinblick auf die Tertiärstruktur zu gewährleisten, wurde die Mutation K390E für dieses Konstrukt eliminiert. Die letzte Chimäre steht zudem unter der Kontrolle des *TEDI* Promotors und Terminators. Eine analoge Chimäre wurde mit dem nativen Cdc1 hergestellt. Alle Chimären wurden Plasmid-basiert im *ted1Δ*-Stamm auf ihr Wachstum unter

Zink²⁺-Stress überprüft. Zudem wurde ihr Wachstum unter Caspofungin-Stress analysiert, da Caspofungin zu stärkeren Wachstumsdefiziten in *TEDI*-Deletionsstämmen führt als die Zugabe von Zinksulfat. Außerdem wurden alle Chimären auch im *Plasmid Shuffling* System im *cdc1Δ* und auch im *ted1Δ dcr2Δ*-Stammhintergrund auf Komplementation von letalen Wachstumsphänotypen analysiert (Abb. 32). Die Klonierung von zwei Plasmiden und die Wachstumsanalyse im *cdc1Δ*- und *ted1Δ*-Stammhintergrund wurden im Rahmen der Masterarbeit von Isabella Reitmeier durchgeführt.

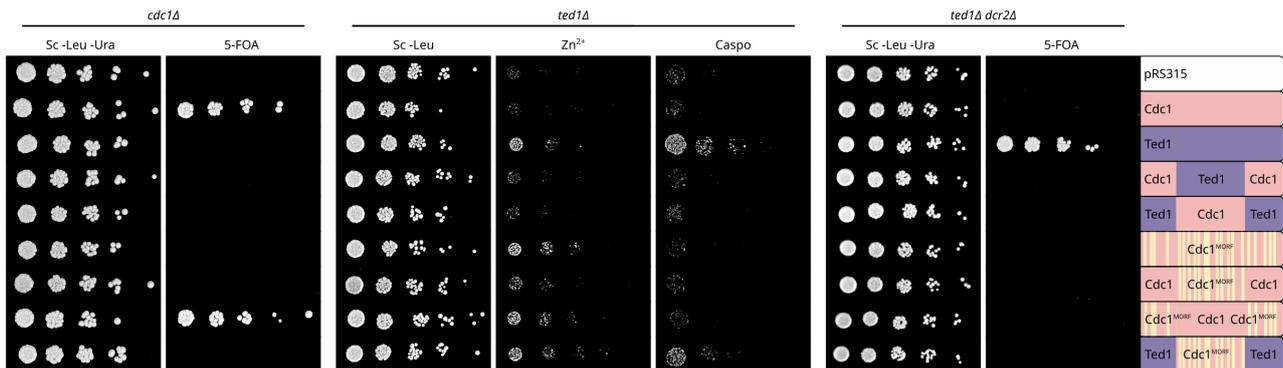


Abb. 32: Domänenkartierung von Cdc1^{MORF} Varianten in verschiedenen Stammhintergründen

Das Set aus Domänen-spezifischen Chimären wurde im *cdc1Δ*-Stamm, im *ted1Δ*-Stamm und im *ted1Δ dcr2Δ*-Stamm vermessen. Als Kontrollen dienen Stämme mit leerem *LEU2*-Plasmidvektor (pRS315) und Stämme mit Wildtypvariante des Gens in pRS315. Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus mindestens drei biologischen Replikaten. Für die Analyse im *ted1Δ*-Stammhintergrund wurden die Stämme in Sc-Medium angezogen und auf eine OD_{600nm} von 0,2 eingestellt. Es wurden serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:5 angefertigt. Die Zellen wurden auf Sc-Festmedium ohne Leucin sowie auf YPD-Festmedium mit 11,8 mM Zinksulfat und 4,8 µg/ml Caspofungin aufgetropft. Die Platten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Pro Bedingung stammen alle Stämme von einer Platte. Für die Analyse im *cdc1Δ*- und *ted1Δ dcr2Δ*-Stammhintergrund wurden die Stämme in Sc-Medium angezogen und auf eine OD_{600nm} von 0,5 eingestellt. Es wurden serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:5 angefertigt. Die Zellen wurden auf Sc-Festmedium ohne Leucin und ohne Uracil sowie auf 5-FOA haltiges Selektionsfestmedium aufgetropft. Die Platten wurden für 48 h bei 30 °C inkubiert. Pro Bedingung stammen alle Stämme von einer Platte.

Die Komplementationsanalyse im *cdc1Δ*-Stammhintergrund zeigte, dass Cdc1^{MORF} und auch Cdc1-Cdc1^{MORF}-Cdc1 nicht den letalen Wachstumsphänotypen des *cdc1Δ*-Stammes auf 5-FOA komplementieren konnten und somit keine Cdc1-spezifische Funktion besitzen. Dagegen zeigte Cdc1^{MORF}-Cdc1-Cdc1^{MORF} in diesem Stammhintergrund Wachstum auf 5-FOA. Im *TEDI*-Einzeldelentionsstamm komplementierten Cdc1^{MORF} sowie Cdc1^{MORF}-Cdc1-Cdc1^{MORF} und Ted1-Cdc1^{MORF}-Ted1 das Wachstumsdefizit unter Zink²⁺-Stress vollständig. Cdc1-Cdc1^{MORF}-Cdc1 zeigte besseres Wachstum als der Cdc1 Wildtyp, jedoch keine vollständige Komplementation. Bei der Wachstumsanalyse auf dem Zellwandstress Caspofungin zeigte lediglich Ted1-Cdc1^{MORF}-Ted1 ein höheres Wachstum als die Cdc1 Wildtyp Kontrolle. Nichtsdestotrotz zeigte keine der Cdc1^{MORF} Varianten eine Komplementation des letalen Phänotypen des *ted1Δ dcr2Δ*-Stammhintergrunds auf 5-FOA.

Insgesamt konnte durch dieses Experiment also gezeigt werden, dass Cdc1^{MORF} vermutlich nicht an der Eliminierung von EtNP-2 beteiligt ist und dass sowohl die Cdc1^{MORF}-spezifischen Mutationen in der N- und C-terminalen Region als auch die Mutationen innerhalb der MPE-Domäne einen Einfluss auf die Komplementation des Zink²⁺-abhängigen Wachstumsdefizits von TED1-Deletionstämmen besitzen.

Die funktionelle Analyse einzelner Cdc1^{MORF} Mutationen innerhalb der MPE-Domäne durch *Plasmid Shuffling* sollte in einer näheren Charakterisierung Aufschluss darüber geben, welche der eingeführten Mutationen zu einem Funktionsverlust der Cdc1-spezifischen Funktion führen und ob diese Mutationen auch zu einem Verlust der Ted1/Dcr2-Funktion führen. Für die Analyse wurden 24 von 26 der mutierten Aminosäuren der MPE-Domäne aus Cdc1^{MORF} in 12 verschiedene Sets unterteilt und diese Sets einzeln in den *CDC1^{MORF}-CDC1-CDC1^{MORF}* ORF eingebracht (Cdc1^{MORF}-Cdc1^{Set1-12}-Cdc1^{MORF}). Zudem wurde eine Variante mit der Mutation K390E hergestellt Cdc1^{MORF}-Cdc1^{Set13}-Cdc1^{MORF}. Die zwei Mutationen R124K und S322T wurden nicht in die Analyse einbezogen, da sie weit entfernt vom katalytischen Zentrum liegen und durch ähnliche Reste ersetzt wurden. Zudem wurden für manche Sets einzelne Reste im nativen *CDC1* Konstrukt durch Alanin ausgetauscht (Cdc1^{Set1-13A}). Die Vergleichbarkeit von Mutationen im Kontext von Cdc1^{MORF}-Cdc1-Cdc1^{MORF} und dem nativen Cdc1 ist gewährleistet, da sich die Proteine lediglich durch 6 Mutationen auf Aminosäureniveau unterscheiden. Diese Mutationen liegen außerhalb der katalytischen MPE-Domäne und haben keinen Einfluss auf das Wachstum von *cdc1Δ*-Zellen auf 5-FOA. Somit besitzen diese Mutationen mutmaßlich keinen signifikanten Einfluss auf die Cdc1-Funktion. Im Folgenden wird davon ausgegangen, dass es der binären Wachstumsanalyse nicht zu akkumulativen Effekten kommt. Für letale Varianten von Cdc1^{MORF}-Cdc1^{Set1-13}-Cdc1^{MORF} wurden strukturell analoge Reste in Ted1 und Dcr2 identifiziert und diese entweder durch Alanin oder den entsprechenden Cdc1^{MORF}-spezifischen Rest ersetzt. Diese Varianten wurden im *Plasmid Shuffling* System mit *ted1Δ dcr2Δ*-Stammhintergrund auf ihre Funktion überprüft (Abb. 33).

Vorarbeiten und Teile dieser Ergebnisse wurden in den Bachelor- und Masterabschlussarbeiten von Clara Schilling (Klonierung von 6 Ted1 Mutanten), Lara Hollmann (Klonierung einer Cdc1 Mutante) und Isabella Reitmeier (Klonierung von 13 Cdc1-Mutanten und Analyse dieser im *cdc1Δ*-Stamm) durchgeführt. Insgesamt war die große Mehrheit (9 von 13) der Cdc1^{MORF}-Cdc1^{Set1-13}-Cdc1^{MORF}-Varianten letal für die Cdc1-Funktion. Lediglich Set3 (D135E), Set8 (Q268L), Set10 (D296E, Q299L) und Set13 (K390E) hatten keinen Einfluss auf die Cdc1-Funktion.

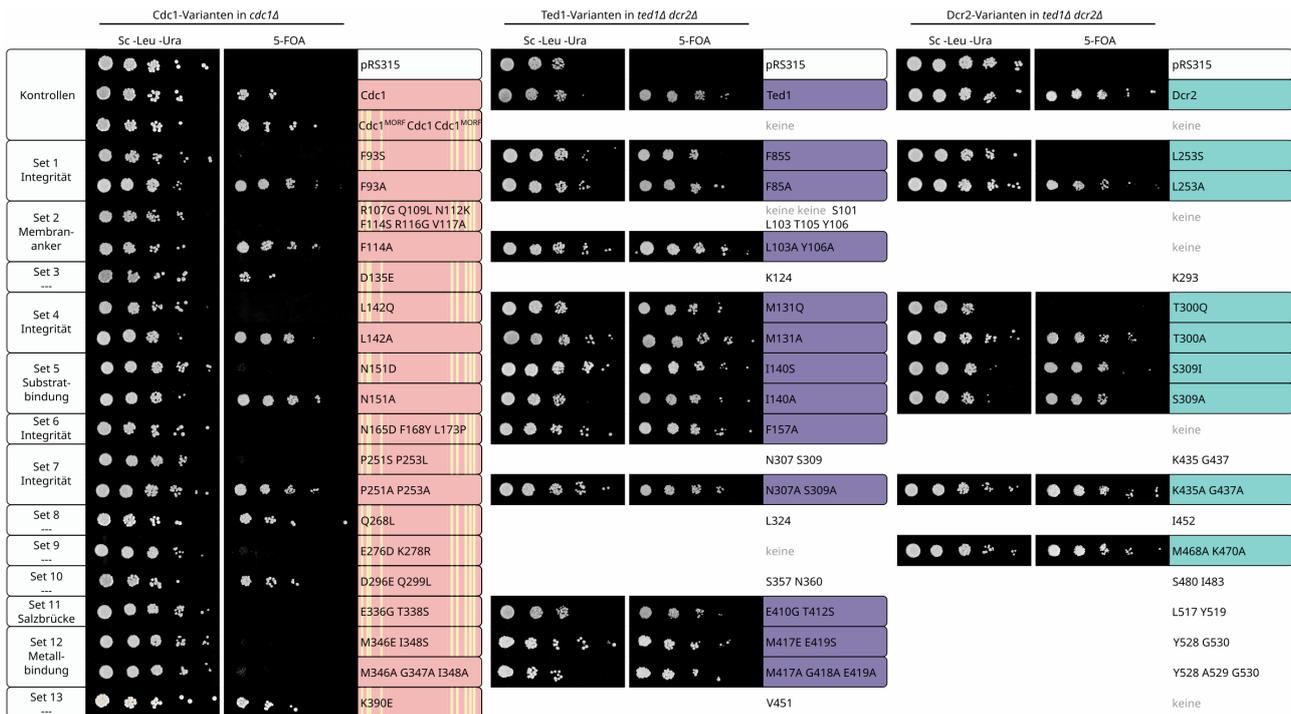


Abb. 33: Fine Mapping der MPE-lokaliserten Mutationen aus *Cdc1^{MORF}*

Die *Cdc1*-Varianten (rosa) wurden im *cdc1Δ*-Stamm und die *Ted1*- (violett) und *Dcr2*-Varianten (türkis) im *ted1Δ dcr2Δ*-Stamm in Flüssigkultur angezogen und auf eine OD_{600nm} von 0,5 eingestellt. Es wurden serielle Verdünnungen im Verhältnis 1:5 angefertigt und auf eine Kontrollplatte ohne Leucin und ohne Uracil und auf eine 5-FOA-Selektionsplatte aufgetropft. Gezeigt ist ein repräsentativer Klon aus mindestens drei biologischen Replikaten. Als Kontrolle dienten Stämme mit leerem *LEU2*-Plasmidvektor (pRS315) und Stämme mit Wildtypvariante des Gens in pRS315. Die gelb gestreiften *Cdc1*-Varianten zeigen an, dass diese Mutationen im *Cdc1^{MORF}-Cdc1-Cdc1^{MORF}*-Hintergrund vermessen wurden. Nicht alle getesteten Varianten stammen von einer Platte, zeigten aber vergleichbares Wachstum der Kontrollen auf allen Platten.

Für einige der letalen Sets konnte eine mutmaßliche Funktion der Reste in *Cdc1* vorhergesagt werden. So handele es sich bei den *Cdc1^{MORF}-Cdc1^{Set1-13}-Cdc1^{MORF}*-Varianten mit Set1 (F93S), Set4 (L142Q), Set6 (N165D, F168Y, L173P) sowie Set7 (P251S, P253L) um Reste, welche zur Erhaltung der Proteinstruktur und Integrität essentiell sein könnten. Da F93 und L142 zudem in der Nähe des MPE-Zentrums von *Cdc1* lokalisiert sind, wurden diese Reste und auch die Reste aus Set7 zusätzlich im nativen *Cdc1* durch Alanin ersetzt, um zu klären, ob ein reiner Funktionsverlust der Reste ebenfalls zu einem letalen Phänotypen führt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Varianten *Cdc^{Set1A}* und *Cdc1^{Set4A}* den letalen *cdc1Δ*-Phänotypen auf 5-FOA komplementieren können. Auch der Doppelaustausch von P251A-P253A führte zu keiner sichtbaren funktionellen Beeinträchtigung bei Wachstum auf 5-FOA. In *Ted1* und *Dcr2* wurden strukturell analoge Reste identifiziert und diese ebenfalls durch Serin bzw. Glutamin und durch Alanin ersetzt. Die Mutationen in *Dcr2* zeigten die gleichen Phänotypen wie bei *Cdc1*. So waren die Mutationen L253S und T300Q letal für die *Dcr2*-Funktion. Die Mutationen L253A und T300A zeigten allerdings keinen Einfluss auf das

Wachstum von *ted1Δ dcr2Δ*-Zellen auf 5-FOA. Interessanterweise führte keiner der strukturell analogen Austausche in Ted1 (F85S/A oder M131Q/A) zu einem Funktionsverlust von Ted1. Die zu Cdc1^{P251A P253A} analogen Mutanten Ted1^{N307A S309A} und Dcr2^{M468A K470A} zeigen ebenfalls keine sichtbare funktionelle Beeinträchtigung bei Wachstum auf 5-FOA.

Die letalen in Cdc1^{MORF}-Cdc1^{Set2}-Cdc1^{MORF} eingeführten Mutationen (R107G, Q109L, N112K, F114S, R116G V117A) sind an der Spitze der amphipatischen α -Helix 1 lokalisiert. F114 wurde in Cdc1 als mutmaßlicher Membran-Anker einzeln analysiert. Dieser Einzelaustausch führte allerdings nicht zu einem Funktionsverlust von Cdc1. Für Ted1 wurden zwei Mutationen an der Spitze der α -Helix 1 (L103A, Y106A) eingeführt, welche ebenfalls keinen Einfluss auf das Wachstum der *ted1Δ dcr2Δ*-Zellen auf 5-FOA hatten.

N151 aus Cdc1^{MORF}-Cdc1^{Set5}-Cdc1^{MORF} liegt in der Nähe der mutmaßlichen Substratbindetasche. Doch während N151D zum letalen *cdc1Δ*-Phänotypen führte, hatte die Mutation N151A keinen Einfluss auf das Wachstum auf 5-FOA. Der in Ted1 strukturell analoge Rest I140 wurde durch Alanin (Funktionsverlust) und Serin (Eigenschaftsumkehr) ersetzt. Keiner der Austausche führte zum Verlust der Ted1-Funktion. Auch bei Dcr2 führten die Austausche S309I und S309A nicht zu letalen Phänotypen. Die letalen Mutationen aus Cdc1^{MORF}-Cdc1^{Set9}-Cdc1^{MORF} (E276D, K278R) befinden sich in einem Loop auf der Substratbindungsseite. Bei Ted1 ist dieser Loop deutlich kürzer und daher gibt es keine strukturell analogen Reste in diesem Protein. Bei Dcr2 führte der Austausch der analogen Reste M468A-K470A nicht zu einem Funktionsverlust.

Insgesamt war die große Mehrheit der Cdc1^{MORF}-spezifischen Reste letal für die Cdc1-Funktion, wohingegen Mutationen der entsprechenden Reste zu Alanin eher tolerierbar für die Funktion waren. Bei Dcr2 führten lediglich zwei Cdc1^{MORF}-spezifische Reste zum Funktionsverlust und für Ted1 konnte keine letale Mutationen identifiziert werden. Dies könnte ein Anzeichen für die Robustheit der Ted1-Funktion sein und dafür sprechen, dass Cdc1^{MORF} möglicherweise eine andere MPE-spezifische Funktion übernimmt.

3. Diskussion

3.1 Zellwandstresse weisen auf unterschiedliche Substratspektren von Cdc1 und Ted1/ Dcr2 hin

Die Eliminierung von EtNP-1 und EtNP-2 durch die Metallophosphoesterasen Cdc1, Ted1 und Dcr2 während der Prozessierung GPI-verankerter Proteine ist essentiell für deren Sortierung und effizienten Einbau in die Zellwand. Im Zuge der ausführlichen phänotypischen Analyse von Cdc1, Ted1 und Dcr2 wurden drei Stammsets hergestellt, in denen *CDC1*, *TED1* und *DCR2* auf Plasmiden verschiedener Kopienzahl exprimiert wurden. Dieses Stammset wurde zur Analyse der drei Metallophosphoesterasen in Abhängigkeit verschiedener Genkopien Anzahlen unter spezifischen Zellwandstressen verwendet. Im Fall von Ted1 und Dcr2 ermöglichte es zudem phänotypische Analysen in Abwesenheit des anderen Proteins durchzuführen. Im Rahmen dieser Diskussion wird im Weiteren angenommen, dass eine erhöhte Kopienzahl im Vergleich zu den verwendeten *CEN*-Plasmiden tatsächlich zu einer größeren Proteinmenge führt. Eine ergänzende Western Blot Analyse ist allerdings notwendig, um eine Aussage über die tatsächliche Proteinmenge der Metallophosphoesterasen treffen zu können.

Alle drei Proteine zeigten unter den Zellwandstressen Kongorot, Calcofluorweiß und Caspofungin unterschiedliche Mengen abhängige Effekte (Abb. 34). Grundsätzlich zeigte sich die Tendenz, dass eine veränderte Menge von Cdc1 vor allem zu Sensitivität gegenüber den beiden Farbstoffen führte, während veränderte Mengen von Ted1 oder Dcr2 vor allem zu Wachstumsdefiziten auf Caspofungin führten. Sogar die *TED1*- und *DCR2*- Einzeldelentionsstämme zeigten ein leichtes Wachstumsdefizit unter Caspofungin-Stress. Es ist überraschend, dass Cdc1 und Ted1/ Dcr2 in dieser Analyse verschiedene Phänotypen zeigten. Für gleiche Substrate von Cdc1 und Ted1/Dcr2 wäre zu erwarten, dass alle Stammsets bei zu geringer MPE-Funktion grundsätzlich ähnliche Phänotypen in Bezug auf Sensitivität zeigen. In diesem Fall ist es denkbar, dass die phänotypischen Unterschiede zwischen den drei Stammsets zu Stande kommen, da unter verschiedenen Zellwandstressen unterschiedliche GPI-verankerte Substrate überwiegend prozessiert werden müssen. So ist es beispielsweise denkbar, dass unter Caspofunginstress nicht nur GPI-verankerte Zellwand- sondern auch Plasmamembranproteine vermehrt prozessiert werden, die bei der Instandhaltung und Stabilisierung der Zellwand helfen. Die GPI-Anker von Plasmamembranproteinen sind allerdings exklusives Substrat von Ted1

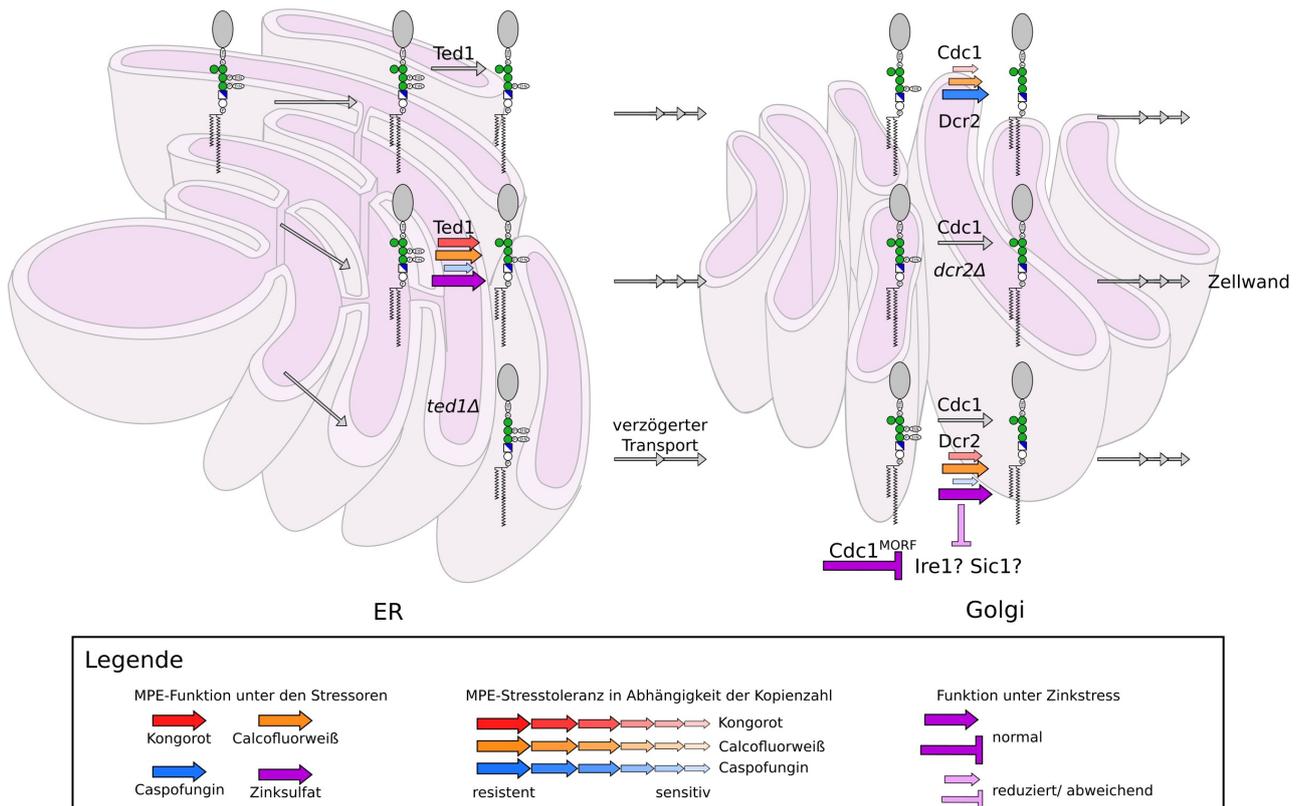


Abb. 34: Zusammenfassung des Stress-spezifischen Transports GPI-verankerter Zellwandproteine
 Die Fähigkeit der *CDC1*, *TEDI* und *DCR2* Stammsets mit verschiedenen Plasmid-basierten Kopienzahlen der Gene, Zellwandstress zu kompensieren wurde zusammengefasst und farblich hinterlegt. Helle Farben deuten darauf hin, dass für das Protein Gendosis abhängige Wachstumsdefizite gemessen wurden.

und Dcr2. Das spezifische Wachstumsdefizit der *TEDI*- und *DCR2*-Stämme könnte also damit erklärt werden, dass diese ein größeres Substratspektrum als Cdc1 besitzen.

Die durchgeführte Zellwandproteomanalyse zeigte, dass unter Caspofungin-Stress vor allem ein höherer Anteil von Cwp1 und Crh1 auf der Zelloberfläche zu finden ist. Zudem konnte ein leichter Anstieg von Gas1 und Gas5 gezeigt werden, welcher allerdings nicht in allen Stämmen signifikant war. Es liegen keine genauen Daten über das Zellwandproteom von *S. cerevisiae* Zellen unter Kongorot- oder Calcofluorweiß-Stress vor. Vergangene Studien zeigten allerdings, dass unter anderem die Expression der Gene *AFB1*, *CRH2*, *DFG5*, *DSE2*, *NFG1*, *TIR2*, *TOH1*, *TOS6* und *YPS1* für GPI-verankerte Proteine unter Kongorot-Stress induziert wird (García *et al.* 2004). Dagegen konnte ebenfalls in der Vergangenheit gezeigt werden, dass Calcofluorweiß unter anderem zur Induktion von *CWP2* führt (Boorsma *et al.* 2004). Die bevorzugte Prozessierung verschiedener GPI-verankerter Zellwandproteine von Cdc1 und Ted1/Dcr2 könnte daher eine andere Erklärungsmöglichkeit für die entdeckten Phänotypen sein.

Bezogen auf Cdc1, Ted1 und Dcr2 wäre es möglich, dass bestimmte GPI-verankerte Substrate mit höherer Affinität gebunden oder mit höherer Effizienz prozessiert werden können. Werden diese Substrate unter einem spezifischen Stress in größeren Mengen gefordert, kommt es zum Rückstau der GPI-verankerten Proteine wenn nicht ausreichend Metallophosphoesterase Aktivität gewährleistet ist. In Zukunft könnte mittels Western Blot ermittelt werden, ob eine niedrige Ted1 Menge unter Caspofunginstress zur Akkumulation unterschiedlicher Mengen GPI-verankerter Zellwandproteine im ER führt.

Eine andere Erklärung für diese spezifischen Wachstumsdefekte könnte die Sensitivität anderer Proteine der GPI-Anker Biosynthese gegenüber einem oder mehreren der getesteten Stressoren sein. Es konnte beispielsweise für den CWI oder den *Mating*-Signalweg gezeigt werden, dass Kongorot und Caspofungin sich auf ganz verschiedene Proteine dieses Signalweges auswirken (García *et al.* 2015). Im Zusammenhang mit Proteinen, deren Funktion sich direkt auf die Cdc1- bzw. Ted1- und Dcr2-Funktion auswirkt, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die die EtNP-1 Transferase Mcd4 sensitiv gegenüber Calcofluorweiß ist (Packer *et al.* 1999; Sanz *et al.* 2022) und dass die reduzierte Expression von *MCD4* in *S. cerevisiae* ebenfalls zur Sensitivität gegenüber dem Stressor führt. Auch für die EtNP-2 Transferase Gpi7 wurde bereits gezeigt, dass sie sensitiv gegenüber Calcofluorweiß und Kongorot ist (Lesage *et al.* 2005; Krause *et al.* 2008; García *et al.* 2015). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass verringerte Funktionalität der beiden EtNP Transferasen einen Einfluss auf die identifizierten Phänotypen hat. Insgesamt lassen die durchgeführten durchgeführten Analysen nur Mutmaßungen darüber zu, inwieweit die Sensitivität anderer Proteine der komplexen GPI-Anker Biosynthese- und Prozessierungsmaschinerie sich auf die Funktion von Cdc1, Ted1 und Dcr2 auswirkt. Ein großflächig angelegter systematischer *Screen* basierend auf den hier verwendeten Stammsets mit zusätzlichen Deletionen könnte diese Frage klären.

Bemerkenswert war in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass die Stämme mit stark erhöhter Kopienzahl von *CDC1*, *TED1* und *DCR2* zwar in den meisten Fällen das Wachstum unter Zellwandstress kompensieren konnten, in manchen Fällen sich die erhöhte Kopienzahl allerdings auch negativ auf das Wachstum auswirkte. Diesen Effekte zeigten vor allem *CDC1^{high}* bei Wachstum unter Kongorot-Stress und *TED1^{high}* und *DCR2^{high}* bei Wachstum auf Caspofungin-haltigen Medien. *TED1^{high}* zeigte auf Caspofungin sogar schlechteres Wachstum als *TED1^{low}*. Das bedeutet, dass insbesondere für Ted1 eine erhöhte Proteinmenge negative Auswirkungen auf die Funktion haben kann. Es ist denkbar, dass ein Ted1-Überschuss kritisch ist, da sich infolgedessen auch der absolute

Anteil der unspezifischen Ted1-Funktion erhöht. Dessen Folge wäre der Export von GPI-verankerten Proteinen mit unfertigen GPI-Ankern. Es ist denkbar, dass auch für Cdc1 und Dcr2 ein Proteinüberschuss zur unspezifischen Funktion führen könnte. Diese unspezifische Funktion könnte allerdings weniger große Auswirkungen auf die GPI-Anker Prozessierung besitzen als bei Ted1, da Cdc1 und Dcr2 erst später in der GPI-Anker Prozessierung aktiv werden. Für die Verwendung von Plasmiden mit hoher Kopienzahl darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass diese selbst Stress für *S. cerevisiae* bedeuten und sogar die Lebensspanne der Zellen verkürzen (Falcón & Aris 2003). Ein alternatives System, in dem die Gene auf *CEN*-Plasmiden unter verschiedenen Promotoren exprimiert würden, könnte diese Fehlerquelle eindämmen.

In Bezug auf Ted1 und Dcr2 konnte weiterhin die Beobachtung gemacht werden, dass Stämme die lediglich *TEDI* exprimieren grundsätzlich robuster gegen die Zellwandstressoren reagierten als Zellen nur mit *DCR2*. Eine zeitliche Komponente könnte in diesem Fall eine Rolle spielen. In Abwesenheit von Ted1 kommt es in *S. cerevisiae* zum verzögerten Export GPI-verankerter Proteine aus dem ER (Yoko-O *et al.* 2018) und somit zu einem zeitlichen Verzug, der sich unter Zellwandstress-Bedingungen bemerkbar machen könnte. Dennoch kann an dieser Stelle ebenfalls die Frage nach einer möglichen unterschiedlichen Effizienz von Ted1 und Dcr2 in Bezug auf die Eliminierung von EtNP-2 gestellt werden. Die durchgeführten Experimente können nicht ausschließen, dass die stärkeren Wachstumsdefizite im *DCR2*-Stammset dadurch bedingt sind, dass Ted1 und Dcr2 unterschiedlich effizient EtNP-2 eliminieren. In vergangenen Studien wurde für die Analyse der beiden Metallophosphoesterasen eine ER-lokalisierte Variante von Dcr2 hergestellt (Chen *et al.* 2021). Mithilfe dieser Variante könnte die Frage geklärt werden, ob Ted1 und Dcr2 bei Lokalisation im gleichen Kompartiment die gleichen Phänotypen unter den getesteten Bedingungen zeigen.

Cdc1 und Ted1 wurden im Zusammenhang mit der Keramid Remodelase Cwh43 ebenfalls systematisch phänotypisch charakterisiert. Die durchgeführten Analysen zeigten, dass Cwh43 nicht sensitiv gegenüber den getesteten Zellwandstressoren ist. Da für Cwh43 lediglich GPI-verankerte Plasmamembranproteine als Substrat gelten (Yoko-O *et al.* 2018), ist dies naheliegend. Die Analyse weist für die alle getesteten Zellwandstresse darauf hin, dass die Cwh43-Funktion nicht von Cdc1 und Ted1 abhängt. Die Cdc1- und Ted1-spezifischen Phänotypen decken sich außerdem mit dem aktuellen Modell, in dem Cdc1 erst nach der Ted1-Aktivität GPI-Anker prozessiert (Yang & Banfield 2020).

Das Deletionsstammset zur Charakterisierung von Cdc1 und Ted1 im Zusammenhang mit der Lipid Remodelase Cwh43 wurde auch auf Flo11-spezifische Phänotypen untersucht. Flo11 weist Orthologe in einer Vielzahl von humanpathogenen Vertretern der *Saccharomycetales* auf, welche für die Adhäsion und die Besiedlung der Hefen an menschlichen Schleimhautepithelien verantwortlich sind (Cormack *et al.* 1999; Li & Palecek 2003; Fu *et al.* 2008). Möglichkeiten der Unterbindung des Adhäsionsverhaltens in *S. cerevisiae* können daher einen wertvollen Beitrag zur Entwicklung neuer Therapien gegen Mykosen liefern. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass vor allem Cdc1 einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von *S. cerevisiae* besitzt. Da Cdc1 kein bekanntes Ortholog im Menschen besitzt, könnte dies ein künftiger Anhaltspunkt für die Entwicklung eines Antimykotikums sein. Auch die Bildung von Biofilmen ist vor allem im medizinischen Kontext ein relevanter Phänotyp, da diese Wachstumsverbände als resistenter gegen Antimykotika und Desinfektionsmittel gelten (Martinez & Fries 2010; Kernien *et al.* 2017). Im *cwh43Δ*-Stammhintergrund konnte die Flo11-vermittelte Adhäsion an Agar, aber kaum Biofilmbildung beobachtet werden. Die Ausbildung von Biofilmen ist im Gegensatz zur Adhäsion an Agaroberflächen nicht nur durch Expression verschiedener Flokkuline wie Flo11 bedingt. Sie beinhaltet neben der Vermittlung von Adhäsion die komplex regulierte Expression weiterer Gene zum Wachstum im Zellverband wie beispielsweise zum Nährstofftransport oder der Ausbildung einer extrazellulären Matrix (Blankenship & Mitchell 2006; Brückner & Mösch 2012; Maršíková *et al.* 2017). Es ist möglich, dass die Cwh43-Funktion mit einem in Biofilmen exprimierten Gen in Zusammenhang steht.

Die durchgeführten Analysen zeigten außerdem, dass das Unvermögen von *CDC1^{low*}*- und *cwh43Δ*-Stämmen Biofilme zu bilden, teilweise im *CDC1^{low*}*- und *cwh43Δ*-Stammhintergrund komplementiert wurde. Dieses Phänomen konnte auch für die Deletionsstämme von *TEDI* und *CWH43* beobachtet werden. Für *TEDI* und *CWH43* konnte bereits in vergangenen Studien gezeigt werden, dass die beiden Gene genetisch interagieren und es so zur phänotypischen Suppression kommen kann (Yoko-O *et al.* 2018). Die hier generierten Daten deuten darauf hin, dass dies auch für *CDC1* und *CWH43* der Fall sein könnte.

3.2 Zink²⁺ könnte die Dcr2 Aktivität beeinflussen

Die Zellwandproteomanalyse hat gezeigt, dass Zink²⁺ keinen Einfluss auf das Zellwandproteom von Wildtypzellen besitzt. Im *TEDI*-Deletionshintergrund konnten unter Zink²⁺-Stress ein signifikant größerer Anteil des Proteins Cdc19 festgestellt werden. Die Pyruvat Kinase wurde bereits in vorigen Studien auf der Zelloberfläche von *S. cerevisiae* gefunden, besitzt allerdings keinen GPI Anker (In-

senser *et al.* 2010; Braconi *et al.* 2011). Auch für die in diesem Stamm unter Zink²⁺-Stress in höherem Maß identifizierte Zellwandproteine der Kategorie 2 (Fks1, Pir3, Tdh3, Eno2, Ssa1 und Ssa2) ist keine Modifikation mit GPI bekannt. Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass die Sensitivität von Stämmen mit *TEDI*-Deletionshintergrund nicht aufgrund ineffizienter Prozessierung GPI-verankerter Proteine zu Stande kommt. Gestützt wird dieses Erkenntnis von der Tatsache, dass neben *TEDI*-Deletionsstämmen keine weiteren GPI-bezogenen Deletionsstämme eine ähnliche oder höhere Sensitivität gegenüber Zink²⁺-Stress zeigen (Ruotolo *et al.* 2008).

Dies wirft allerdings auch die Frage auf, wie die *ted1Δ*-spezifische Sensitivität gegenüber Zinkionen erklärt werden kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Zink²⁺-abhängige Wachstumsdefekt der *ted1Δ*-Zellen durch verschiedene, artifiziell generierte MPE-Mutanten wie beispielsweise Cdc1^{MORF} komplementiert werden kann. Es konnte auch gezeigt werden, dass keine dieser MPE-Mutanten dazu in der Lage war, EtNP-1 oder EtNP-2 vom GPI-Kern zu eliminieren. Dies führt zu der möglichen Annahme, dass eine andere, Ted1-abhängige Phosphoesterase-Funktion zum Zink²⁺-Wachstumsdefizit in *TEDI*-Deletionsstämmen führt.

Diese Arbeit zeigte, dass Ted1 Resistenz gegenüber Zink²⁺ vermittelt – auch in Abwesenheit von Dcr2. In Stämmen ohne Ted1 existieren dagegen eine viel größere Anzahl von Substraten in Form GPI-verankerter Proteine, die Dcr2 neben seinen klassischen Substraten prozessiert. Die Dcr2-Funktion ist also abhängig von der Ted1-Funktion. Daher wäre es möglich, dass der Zink²⁺-abhängige Phänotyp von *TEDI*-Deletionsstämmen durch eine veränderte Dcr2-Funktion zu Stande kommt. Möglicherweise verschiebt Zink²⁺ die Substratspezifität oder Aktivität von Dcr2 dahingehend, dass zwar GPI-verankerte Proteine weiterhin prozessiert werden, andere nicht essentielle Substrate unter diesen Bedingungen allerdings nicht mehr oder weniger effizient erkannt werden und dies zum Wachstumsdefizit unter Zink²⁺-Stress führt. Diese These wird gestützt durch die Wirkung von Metallionen auf Zellen im Allgemeinen und im Spezifischen auf Metallophosphoesterasen: Es ist bekannt, dass erhöhte Konzentrationen von Metallionen in die Zelle dringen und dort einerseits zu erhöhtem oxidativen Stress führen und andererseits mit nativen Co-Faktoren konkurrieren (Buchholz & Behringer 2018). Metallophosphoesterasen tolerieren grundsätzlich unterschiedliche Co-Faktoren (Clark *et al.* 2016; Ejaz *et al.* 2019). In spezifischen Fällen konnte allerdings die Präferenz bestimmter Co-Faktoren gezeigt werden wie beispielsweise Eisen- und Zinkionen für Dbr1 (Clark *et al.* 2016). Auch konnte in der Vergangenheit beispielsweise anhand der Alkalischen Kälberdarm-Phosphatase gezeigt werden, dass verschiedene zweiwertige Kationen die Substratspezifität dieser

Metallophosphoesterase verändern können (Igunnu *et al.* 2011). Bezogen auf die Komplementation des *ted1Δ*-spezifischen Zink²⁺-Phänotyps der artifiziellen Cdc1^{MORF} Mutante, wäre es möglich dass Cdc1^{MORF} eine nicht essentielle Dcr2-spezifische Funktion übernimmt und auf diese Weise das Wachstumsdefizit unter Zink²⁺-Stress ausgleichen kann. Die SGD Datenbank zeigte, dass Dcr2 zwei weitere Proteine als Substrate dephosphoryliert: Ire1 und Sic1 (Guo & Polymenis 2006; Pathak *et al.* 2007). Bei Ire1 handelt es sich um den zentralen Schlüsselregulator der UPR (Welihinda & Kaufman 1996). Die UPR führt zur Induzierung einer Vielzahl von Genen, welche zur Wiederherstellung der ER-Homöostase oder, falls dies nicht möglich ist, zum Zelltod führen (Kohno *et al.* 1993; Wu *et al.* 2014). In vergangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Zink²⁺ eine Auswirkung auf den CWI und die UPR besitzt (Babele *et al.* 2018). Dcr2 reguliert Ire1 durch Dephosphorylierung herunter und unterdrückt so die UPR (Guo & Polymenis 2006). Es wäre möglich, dass Cdc1^{MORF} einen Einfluss auf diese Regulation nimmt.

Bei Sic1 handelt es sich um einen Cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitor (Schwob *et al.* 1994; Brocca *et al.* 2011). Sic1 wird durch die Dcr2 vermittelte Dephosphorylierung destabilisiert, abgebaut und ermöglicht folglich den Übergang von der G1 in die S-Phase während der Mitose (Pathak *et al.* 2007). Es ist möglich, dass ein Zink²⁺-abhängiges Wachstumsdefizit auftritt, wenn Dcr2 nicht mehr dazu in der Lage ist, Sic1 effizient zu dephosphorylieren. Cdc1^{MORF} könnte diese Funktion übernehmen. Es bedarf einer ganzen Reihe weiterer Studien, um diese Hypothese zu belegen. Beispielsweise könnte die Interaktion von Cdc1^{MORF} mit Ire1, Sic1 oder anderen möglichen Interaktionspartnern in einem *Yeast-Two-Hybrid* System überprüft werden. Dies wäre allerdings lediglich ein Beweis für die physikalische Interaktion von Cdc1^{MORF} mit diesen Substraten. Es ist außerdem essentiell, in Zukunft auch die enzymatische Aktivität der Mutante zu belegen. Auch Erkenntnisse über die subzelluläre Lokalisation von Cdc1^{MORF} könnte die möglichen Funktionen des Proteins eingrenzen. DeepLoc-1.0, ein *Deep Learning* Algorithmus zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen (Almagro Armenteros *et al.* 2017), ergab, dass die Wahrscheinlichkeit für Cdc1, im Golgi lokalisiert zu sein, bei 73,4 % liegt. Für Cdc1^{MORF} liegt die Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Golgi bei 68,7 %. Dies deutet daraufhin, dass keine der 33 Mutationen *in silico* einen signifikanten Einfluss auf die Lokalisation von Cdc1^{MORF} zu besitzen scheint und somit bei der Suche nach Interaktionspartnern vorrangig Golgi lokalisierte Proteine in Betracht kämen.

Ted1-Cdc1^{MORF}-Ted1 führte neben der Komplementation des Zink²⁺-Phänotyps zudem zu etwa fünf-fach besserem Wachstum von *TEDI*-Deletionstämmen auf Caspofungin. Obwohl Caspofungin

durch Hemmung der β 1-3 Glukansynthase primär die Zellwand von *S. cerevisiae* schwächt, können weitreichende, indirekte Effekte von Caspofungin auf grundlegende zelluläre Mechanismen der Zelle nicht gänzlich ausgeschlossen werden. So wurde beispielsweise im humanpathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus* ein Zusammenhang zwischen Genen der UPR und Sensitivität gegenüber Caspofungin ermittelt (Richie *et al.* 2009). In *S. cerevisiae* konnten 20 Gene identifiziert werden, deren Deletion zu starker Sensitivität gegenüber Caspofungin führten. Bei elf davon handelte es sich um Gene im Zusammenhang mit Zellwandspezifischen Prozessen. Die übrigen neun Gene hingegen allerdings mit Transportfunktionen und der Transkriptionskontrolle zusammen (Markovich *et al.* 2004). Das komplexe Zusammenwirken zellulärer Prozesse liefert keine Anhaltspunkte für die Aufklärung des Phänotyps von Ted1-Cdc1^{MORF}-Ted1. Erster Anhaltspunkt zur Erklärung des Phänotyps könnte auch hier eine Lokalisierungsanalyse der Chimäre sein.

3.3 Die Spezifität von Cdc1, Ted1 und Dcr2 kann mit den hergestellten MPE-Chimären nicht übertragen werden

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Proteinchimären von Cdc1, Ted1 und Dcr2 mit ausgetauschter MPE-Domäne hergestellt und funktionell charakterisiert. Keine der Chimären war funktionell. Besonders überraschend ist dieses Ergebnis für die Chimären aus Ted1 und Dcr2, da die Proteine die gleiche Funktion erfüllen und bekannt ist, dass Dcr2 bei Lokalisation im ER dort *ted1Δ*-spezifische Phänotypen komplementieren kann (Chen *et al.* 2021). Das erhaltene Ergebnis deutet daraufhin, dass Cdc1, Ted1 und Dcr2 nicht modular aufgebaut sind. Zudem scheint für die Phosphoesterasefunktion und Substratspezifität nicht eine einzelne Domäne verantwortlich zu sein. Vielmehr scheint es, dass die richtige Kombination aus katalytischer Domäne und N- und C-terminaler Region für die Substraterkennung und Eliminierung von EtNP-1/ EtNP-2 benötigt wird.

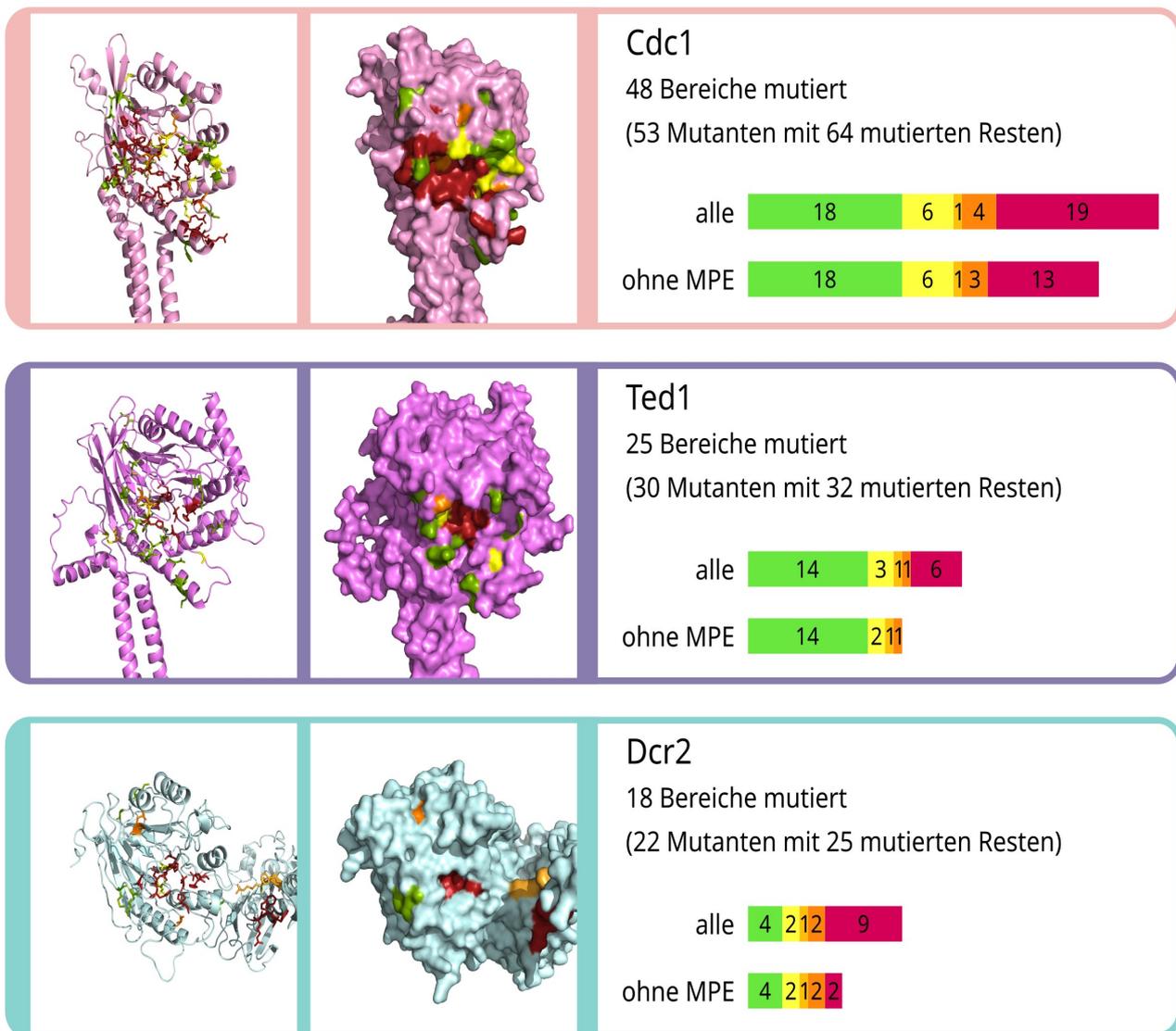
Auch spannend war in diesem Zusammenhang der Vergleich der Sequenzidentität zwischen den drei MPE-Domänen. Die geringe Sequenzidentität zwischen der Ted1- und Dcr2 MPE-Domäne von 15,4 % zeigt, dass die Sequenzidentität der MPE-Domäne nicht zwangsläufig mit der Funktion und Spezifität dieser Proteine korreliert. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die generierten Chimären aufgrund von Faltungs- oder Expressionsproblemen nicht funktionell waren. Eine Western Blot Analyse zum Nachweis der Proteinproduktion und Stabilität ist notwendig, um weitere Aussagen treffen zu können. Zudem wäre sinnvoll, die subzelluläre Lokalisierung der hergestellten Chimären zu überprüfen.

Neben Cdc1^{MORF} waren die Proteinchimären Cdc1^{MORF}-Cdc1-Cdc1^{MORF} und Ted1-Cdc1^{MORF}-Ted1 dazu in der Lage, den Zink²⁺-spezifischen Wachstumsdefekt im *TEDI*-Deletionsstamm zu komplementieren. Da sowohl Ted1-Cdc1-Ted1 als auch Cdc1-Cdc1^{MORF}-Cdc1 nicht bzw. nicht in vollem Umfang dazu in der Lage waren, den Zink²⁺-Phänotyp zu komplementieren, kann dies ein Hinweis darauf sein, dass in diesem Beispiel die MPE- und die N- sowie C-terminale Domäne wichtig für die Funktion bezüglich der phänotypischen Komplementation des Zink²⁺-spezifischen Wachstumsdefektes sind. Auch die Tatsache, dass alle Proteine, die zur Komplementation führten keine in allen drei Proteinen vertretene Domäne besitzen, kann ein weiterer Hinweis sein, dass die entsprechende MPE-Domäne kompatibel mit N- und C-terminaler Region sein muss, um ein funktionelles Protein zu generieren.

3.4 Strukturelle Grundlage der spezifischen Funktion von Cdc1, Ted1 und Dcr2

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden insgesamt 105 gezielte Austauschvarianten von Cdc1, Ted1 und Dcr2 hergestellt und charakterisiert. Bei der Hälfte dieser Varianten handelt es sich um Cdc1 Mutanten, die eine direkte funktionelle Kartierung von etwa 20 % aller Reste der MPE-Domäne zulassen. Um eine Funktionsbewertung der analysierten Reste durchzuführen, wurde eine fünfstufige Bewertungsskala (0 ersetzlich, 4 essentiell) eingeführt. Essentiellen Resten wurden 4 Punkte zugeteilt. Existierten mehrere Mutationen eines Rests mit verschiedenen binären Phänotypen aus dem *Plasmid Shuffling* (beispielsweise die letale Variante Dcr2^{G526M} und die lebende Variante Dcr2^{G526N}), wurde 1 Punkt vergeben. Für jeden Stress-spezifischen Phänotyp nicht essentieller Reste wurde jeweils 1 Punkt vergeben. Ein Rest mit verschiedenen binären Phänotypen konnte maximal einen Wert von 3 erreichen, um die Unterscheidung von essentiellen Resten zu ermöglichen. Die charakterisierten Reste von Cdc1, Ted1 und Dcr2 wurden dieser Funktionsbewertung unterzogen (Abb. 35).

Bezüglich der sieben charakterisierten MPE-Mutanten konnte für ein Rest ein Unterschied zwischen den drei Proteinen festgestellt werden. Während alle getesteten Reste mit mutmaßlicher Co-Faktor Komplexierungsfunktion sowie alle konservierten Reste essentiell waren, zeigte der variable MPE-Motif Rest GHxH in Block V eine unterschiedliche Relevanz für die Proteinfunktion von Cdc1, Ted1 und Dcr2. Der Dcr2 Rest D499 hat eine Funktionsbewertung von 4. Dagegen weist der entsprechende Aspartat-Rest bei Cdc1 eine Funktionsbewertung von 3 und bei Ted1 lediglich eine Funktionsbewertung von 1 auf. Das Sequence Logo aus Abb. 6 zeigte, dass in *Saccharomyces cerevisiae*



Funktionsbewertung
 ersetzlich 0 1 2 3 4 essentiell

Abb. 35: Zusammenfassung aller funktionell charakterisierten Reste von Cdc1, Ted1 und Dcr2

Die funktionell charakterisierten Reste von Cdc1, Ted1 und Dcr2 wurden funktionell von 0 (ersetzlich) bis 4 (essentiell) kategorisiert und in den AlphaFold Strukturmodellen (Varadi *et al.* 2022) markiert. Die Anzahl aller mutierten Bereiche wurde statistisch kategorisiert und in Balkendiagrammen dargestellt.

Aspartat der am häufigsten aufgetretene Rest an dieser Position ist, obwohl keine eindeutige Präferenz für diese Position erkennbar ist. Für Metallophosphoesterasen anderer Organismen existieren an dieser Position ebenfalls eine Vielzahl verschiedener Reste (Matange *et al.* 2015; Haapalainen *et al.* 2021). Das zu Ted1 menschliche Ortholog Pgap5 weist beispielsweise an dieser Stelle ein Threonin auf. Die Diversität an Resten an dieser Position legt nahe, dass der Rest eine spezifische Funkti-

on haben könnte. Das Aspartat in Cdc1, Ted1 und Dcr2 könnte aus sterischen Gründen wichtig für die Komplexierung der beiden divalenten Kationen sein. Da Metallophosphoesterasen strukturell sehr verschieden aufgebaut sind, ist es naheliegend, dass auch die Komplexierung des Co-Faktors durch verschiedene Reste unterstützt werden könnte.

Ausgenommen der MPE-Reste konnten bei Cdc1 und Dcr2 ein ungefähr gleiches Verhältnis aus essentiellen und ersetzlichen Resten festgestellt werden. Bei Ted1 hat kein einziger weiterer Rest eine Funktionsbewertung von 4. Somit konnten keine weiteren essentiellen Reste identifiziert werden. Zwar wurden im Gegensatz zu Cdc1 nur halb so viele Ted1-spezifische Reste funktional charakterisiert, jedoch waren diese zum Großteil strukturell analog zu den analysierten Cdc1-Resten und lassen daher eine generelle Aussage über die Funktion der beiden Proteine bezüglich der getesteten Reste zu. So führten eine ganze Reihe von Mutationen mit mutmaßlichen Stabilitätseinflüssen bei Cdc1 und Dcr2 zum Funktionsverlust, die keine Auswirkung auf die Ted1-Funktion hatten, wie beispielsweise letale Mutationen die zur Zerstörung des hydrophoben Kerns des Proteins führten: Cdc1^{F93S} und Dcr2^{L253S} und im Gegensatz dazu die funktionelle Variante Ted1^{F85S} sowie die letalen Varianten Cdc1^{L142Q} und Dcr2^{T300Q} im Gegensatz zur funktionellen Variante Ted1^{M131Q}. Auch bezüglich der mutmaßlichen Salz- und Disulfidbrücken zeigte Ted1 eine deutlich höhere Toleranz gegenüber Mutationen als Cdc1. So weist Cdc1 eine Disulfidbrücke mit Funktionsbewertung 4 und eine Disulfidbrücke mit Bewertung 0 auf, während die entsprechenden Brücken bei Ted1 eine Bewertung von 0 und 1 bzw. 2 besitzen. Diese Ergebnisse leiten zu der Annahme, dass Ted1 strukturell robuster als Dcr2 und Cdc1 ist. Zudem ist denkbar, dass die Struktur an den getesteten Bereichen eine weniger große Rolle für die katalytische Aktivität von Ted1 spielen könnte, beispielsweise weil andere Bereiche das Protein stabilisieren.

Unterschiede zwischen Ted1 und Cdc1 konnten auch bezüglich Resten zur Substrat- oder Metallbindung ermittelt werden. So erreichten die Cdc1-spezifischen Metallbindungsreste M346-G347-I348 (Metallbindung) eine Funktionsbewertung von 4, während die strukturell analog Ted1-Reste M417-G418-E419 eine Funktionsbewertung von 0 besitzen. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die Metallbindung in beiden Proteinen von verschiedenen Resten unterstützt wird, oder dass dieser unterstützende Bereich bei Ted1 nicht notwendig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 16 Cdc1 Mutanten, 4 Ted1 Mutanten und 4 Dcr2 Mutanten mit möglicher Substratbindungsfunktion analysiert (Abb. 36). Die Substratbindungsreste der Cdc1 Loop Region 1 R264, R275 und P280-F281-P282 besitzen alle eine Funktionsbewertung von 4. Während

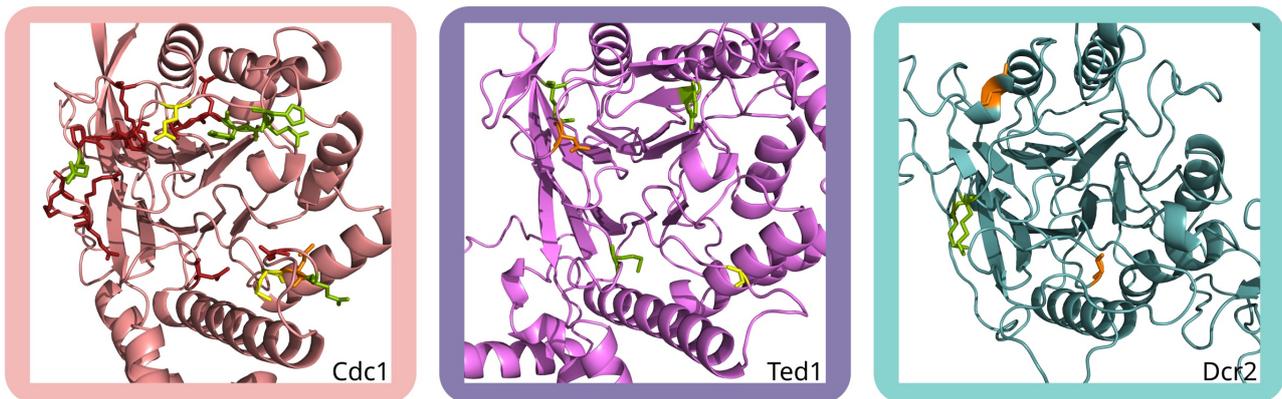


Abb. 36: Detailaufnahme aller getesteten Reste mit mutmaßlicher Substratbindefunktion

Die funktionell charakterisierten Reste von Cdc1, Ted1 und Dcr2 mit mutmaßlichem Einfluss auf die Substratbindung wurden funktionell von 0 (ersetzlich) bis 4 (essentiell) kategorisiert und in den AlphaFold Strukturmodellen (Varadi *et al.* 2022) markiert.

der zu R264 strukturell analoge Ted1 Rest K320 keine Funktion besitzt, weist der strukturell analoge Dcr2 Rest E449 eine Funktionsbewertung von 3 auf. Dagegen ist der zu R275 strukturell analoge Dcr2-Rest M468 nicht funktionell. Der Ted1-Rest, der sich strukturell teilweise mit dem essentiellen P80-F81-P82 deckt, weist eine Funktionsbewertung von 3 auf und ist der einzige nicht MPE-Rest von Ted1 mit einer Funktionsbewertung von mindestens 3. Die starken sequenziellen und strukturellen Unterschiede trotz Funktion dieses Loops für die Proteine legen nahe, dass dieser in die spezifische Substraterkennung von Cdc1, Ted1 und Dcr2 involviert sein könnte. Nichts desto trotz sind die Generierung und Analyse weiterer Ted1 und Dcr2 Mutanten erforderlich, um diese Vermutung zu verifizieren. Weitere Mutanten in der Loop Region 1 von Ted1 und Dcr2 sind ein guter Anhaltspunkt für neue Mutanten.

Der essentielle Cdc1 Rest S103 aus der α -Helix 1 Region ist in einem strukturell einzigartigen Bereich von Cdc1. Es ist denkbar, dass er ebenfalls eine spezifische Rolle in der Erkennung von Substraten spielt. Auch der Cdc1 Rest N345 besitzt eine Funktionsbewertung von 4, während der strukturell analoge Ted1 Rest M416 nicht funktionell unter den getesteten Bedingungen war. Der zu Cdc1 N345 und Ted1 M416 strukturell analoge Rest mit mutmaßlicher Substratbindungsfunktion ist bei Dcr2 G526. Der Austausch von G526 zum Ted1-spezifischen Methionin ist letal. Da Ted1 und Dcr2 sich an dieser Stelle im Protein strukturell stark durch verschieden lange, unstrukturierte Loops unterscheiden, ist das nicht überraschend. G526 befindet sich zudem in einem sequenziell besonderen Bereich von Dcr2 ($^{519}\text{YGGGGGEGGYAGYGG}^{533}$), der zu einem Drittel aus Glycin besteht und einen unstrukturierten Loop nah am MPE-Zentrum bildet. Es konnte in der Vergangenheit

bereits für ein Protein aus *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass eine Glycin/Phenylalanin-reiche Region die Spezifität des Proteins vermittelt (Yan & Craig 1999). Da der zu G526 strukturell analoge Cdc1 Rest N345 auch mutmaßlich an der spezifischen Substraterkennung beteiligt ist, legt dies nahe, dass der Bereich ebenfalls bei Dcr2 eine Rolle für die Substraterkennung spielen könnte. Das würde zusammen mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen allerdings für Ted1 und Dcr2 bedeuten, dass diese Proteine das gleiche Substrat EtNP-2 womöglich nicht ausschließlich über die gleichen Reste und Bereiche erkennen. Auch interessant ist in diesem Zusammenhang, dass der Austausch von G526 zum Cdc1-spezifischen Asparagin nicht zu einem letalen Phänotypen, aber zu starken Wachstumsdefekten führt. Womöglich kann an dieser Position von Dcr2 ein hydrophiler Rest aus sterischen Gründen eher toleriert werden.

In dieser Arbeit wurde für alle vergleichbaren Substratbindungsreste zwischen Cdc1 und Ted1 gezeigt, dass die Ted1-Reste eine niedrigere Funktionalität aufwiesen. Eine mögliche Erklärung dafür kann sein, dass Ted1 robuster in der Substraterkennung ist als Cdc1, sodass die Mutation eines einzelnen Rests die Substratbindung nicht unterbinden kann. Im biologischen Kontext wird Cdc1 eine Sortierungsfunktion zugesprochen, was die Unterscheidung der eigenen spezifischen Substrate von anderen GPI-verankerten Proteinen erfordert (Vazquez *et al.* 2014; Yang & Banfield 2020). Bei der Ted1-Funktion handelt es sich hingegen um eine Qualitätskontrolle für alle GPI-verankerten Proteine. In diesem Zusammenhang erscheint es also plausibel, dass die Substraterkennung von Cdc1 spezifischer und kritischer für die Funktion ist. Für Ted1 konnte zudem in der Vergangenheit anhand eines Beispiels gezeigt werden, dass die Metallophosphoesterase auch GPI-Anker missgefalteter Proteine prozessiert (Sikorska *et al.* 2016). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Ted1 tatsächlich nur den GPI-Anker des Proteins erkennt und daher eine spezifische Substraterkennung nur im Hinblick auf die Unterscheidung von EtNP-1 und EtNP-2 notwendig ist. Zusammen mit den hier generierten Daten führt dies zudem zu der möglichen Hypothese, dass der effiziente Export GPI-verankerter Proteine durch eine möglichst robuste Ted1-Funktion wichtig für die Zelle, beispielsweise für den Erhalt der ER-Homöostase sein könnte. Weitere Studien mit einer noch präziseren funktionalen Kartierung im Hinblick auf Ted1 können Aufschluss darüber geben, ob die Unterscheidung zwischen EtNP-1 und EtNP-2 durch andere als die hier getesteten Reste vermittelt werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle identifizierten nicht-letalen Varianten von Cdc1, Ted1 und Dcr2 auf ihre Funktion unter Zellwandstress durch Wachstumsanalysen charakterisiert. Während ei-

nige Mutationen in den Proteinen zu einem Funktionsverlust unter allen drei getesteten Stressen führte, konnten für manche Mutationen spezifische Phänotypen identifiziert werden (Tab. 3).

Es stellt sich die Frage, wie die spezifischen Phänotypen dieser Reste erklärbar sind. Beispielsweise ist der Rest M99 in Cdc1 mutmaßlich in die Substratbindung involviert. Es ist bekannt, dass verschiedene Zellwandstresse die Expression unterschiedlicher GPI-verankerter Proteine verschieden stark induziert (Boorsma *et al.* 2004; García *et al.* 2004). Daher wäre es möglich, dass durch die den Austausch von Methionin-99 zu Alanin, die überwiegend unter Kongorot prozessierten GPI-verankerten Proteine weniger effizient erkannt werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Kongorot die Expression und den Transport mancher GPI-verankerter Proteine stärker als die anderen beiden Zellwandstresse induziert und die Funktionalität von Cdc1^{M99A} dann nicht mehr ausreichend ist.

Tab. 3: Zusammenfassung der phänotypischen Analyse unter Zellwandstress

	Kongorot	Calcofluorweiß	Caspofungin	unspezifisch
Cdc1	M99A D147A C383A	-	D147A	D100A D315A Q290A Y289A-Q290A-T291A
Ted1	C445A	G92D C35A C445A	-	D327A
Dcr2	R80A-F81A-Y82A	R80A-F81A-Y82A	-	E449A G526N

Für die einzelnen Cysteine der nicht-essentiellen mutmaßlichen Disulfidbrücken C73-C383 von Cdc1 sowie C35-C445 und C325-C384 von Ted1 konnten für die Einzelmutanten einer Brücke verschiedene Phänotypen identifiziert werden. So zeigte beispielsweise der Austausch C445A einen Funktionsverlust unter Kongorot und Calcofluorweiß-Stress während der Austausch von C35 zu Alanin lediglich eine funktionelle Beeinträchtigung von Ted1 unter Calcofluorweißstress zeigte. Gründe dafür können sein, dass ein Alanin sich besser in die Struktur an Position 35 einpasst und die strukturelle Integrität an Position 445 durch den Austausch stärker gestört wird. Auch mutationsbedingte Expressionsschwankungen können ein Grund für dieses Phänomen sein.

Die Limitierung der in dieser Arbeit generierten Daten liegt darin, dass nicht eindeutig geklärt werden kann, inwieweit die identifizierten essentiellen Reste zur Substratbindung von Cdc1 nicht nur der Unterscheidung von EtNP-1 und EtNP-2 dienen sondern auch der Unterscheidung von GPI-verankerten Plasmamembran- und Zellwandproteinen. Nach dem aktuellen Kenntnisstand unterschei-

den sich die GPI-Anker von Zellwand- und Plasmamembranproteinen zum Zeitpunkt der Cdc1-Funktion lediglich durch ihre Fettsäureketten. Dies spricht grundsätzlich dagegen, dass die identifizierten essentiellen Reste direkt an der Substratunterscheidung von GPI-verankerten Zellwand- und Plasmamembranproteinen beteiligt sind. Es ist allerdings denkbar, dass die Unterscheidung zwischen den verschiedenen GPI-verankerten Proteinen allein oder zusätzlich durch die N- oder C-terminale Domäne von Cdc1 vermittelt wird. Es ist bekannt, dass die Spezifität und viele weitere Funktionen mancher Metallophosphoesterasen durch zusätzliche Domänen vermittelt werden kann (Hopfner *et al.* 2001; Jackson *et al.* 2007; Möckel *et al.* 2012). Es konnte beispielsweise bei einer mycobakteriellen MPE gezeigt werden, dass eine zusätzliche C-terminale Domäne Lokalisation und Expression reguliert (Matange *et al.* 2014). Insbesondere die C-terminale Domäne von Cdc1 wäre ein geeigneter Kandidat zur weiteren Analyse der Spezifitätsvermittlung, da sie zwei Transmembrandomänen und einen cytosolischen Bereich enthält und womöglich das spezifische Lipid des GPI-Ankers erkennen könnte. Eine andere Möglichkeit wäre, dass Cdc1 einen Komplex mit einem oder mehreren weiteren Proteinen bildet und diese die Substratspezifität im Hinblick auf die Unterscheidung von GPI-verankerten Zellwand- oder Plasmamembranproteinen vermitteln.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist zudem nicht geklärt, ob Cdc1 Substrate mit EtNP-1 und EtNP-2 erkennt, oder ob die vorherige Prozessierung GPI-verankerter Proteine von Ted1/ Dcr2 essentiell für die Cdc1-Funktion ist. Die hier generierten Daten liefern erste Anhaltspunkte, dass Cdc1 durch die Vielzahl essentieller Reste mit mutmaßlicher Substratbindungsfunktion in α -Helix 1 und in der Loop Region nahe des zentralen β -Sandwiches durchaus dazu in der Lage ist, zwischen EtNP-1 und EtNP-2 zu unterscheiden. Damit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Cdc1 unabhängig von der Ted1/ Dcr2-Funktion Substrate erkennt.

3.4 Konservierung der Cdc1- und Ted1-Funktion in *C. thermophilum*

Insgesamt ermöglichte die funktionelle Analyse verschiedener Reste vor allem eine spezifische Kartierung von Cdc1. Im Gegensatz zu Ted1 und Dcr2 ist ein deutlicher Bereich mit Resten der Funktionsbewertung 4 mit essentieller Funktion zu erkennen. Die essentiellen Reste befinden sich vor allem im MPE-Motif, in der Nähe von α -Helix 1 und nahe des zentralen β -Sandwiches. Trotz einer Sequenzidentität von 36,1 % und Analogie aller MPE-Reste zwischen Cdc1 und seinem *C. thermophilum* Ortholog *CtCdc1*, war eine Komplementation des letalen *cdc1Δ*-Phänotyp durch *CtCdc1* unter keiner getesteten Bedingung möglich. Da die GPI-Anker Biosynthese und Prozessierung in vie-

len pilzlichen Organismen allerdings ähnlich verläuft (Yadav & Khan 2018), ist davon auszugehen, dass die enzymatische Kernfunktion des Spaltens der Phosphoesterbindung zwischen EtNP und Mannose bei beiden Proteinen identisch ist. Eine mögliche Erklärung dafür, dass *CtCdc1* nicht die *Cdc1*-Funktion komplementieren kann ist, dass *CtCdc1* die entsprechenden Substrate grundsätzlich nicht erkennt, oder unspezifisch wirkt, indem es beispielsweise auch GPI-verankerte Plasmamembranproteine prozessiert. Dies führt zu der Annahme, dass *CtCdc1* zwar theoretisch die *Cdc1*-Kernfunktion übernehmen, nicht aber die spezifische Erkennung von EtNP-1 oder von Teilen des GPI-verankerten Zellwandproteins erfüllen kann. Das legt nahe, dass die spezifische *Cdc1*-Funktion nicht bis hin zu *C. thermophilum* konserviert ist. Im Umkehrschluss können variable Bereiche zwischen beiden Proteinen daher mögliche Rückschlüsse darüber geben, welche Reste für die spezifische *Cdc1*-Funktion in *S. cerevisiae* notwendig sein könnten. Zusammen mit der Funktionsbewertung der identifizierten Reste aus *Cdc1* mit einer mutmaßlichen Substratbindungsfunktion, unbekannter Funktion oder Teilen der MPE-Signatur, kann über den Grad der Variabilität zwischen *Cdc1* und *CtCdc1* an diesen Positionen eine mögliche Prognose die spezifische Substratbindung gemacht werden (Abb. 37 S.Tab. 2).

So konnten mehrere Bereiche identifiziert werden, welche womöglich an der spezifischen Substraterkennung von *Cdc1* beteiligt sind. Die identifizierten Bereiche befinden sich vor allem in der Loop Region 1. Für N345 konnte bereits im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Austausch des *CtCdc1* Rests A489N nicht zum Funktionsgewinn ausreichend ist. Vielmehr scheint es, dass mehrere distinkte Bereiche für die *Cdc1*-Funktion in *S. cerevisiae* notwendig sind. Der Rest S103 und der Sequenzabschnitt ²⁷⁶ESKEPFP²⁸¹ scheinen gute Kandidat für die *Cdc1*-spezifische Funktion von *CtCdc1* zu sein. Zukünftige Analysen können beispielsweise durch chimärische Konstrukte zwischen *Cdc1* und *CtCdc1* zeigen, ob ein Austausch dieser Bereiche in *CtCdc1* tatsächlich ausreichend ist, um Spezifität zu vermitteln, oder ob die Spezifität von *Cdc1* über weitere Reste vermittelt wird. Die Limitation dieser Analyse liegt darin, dass die Kriterien für die Identifikation von Resten der Spezifitätsvermittlung von *Cdc1* lediglich hinreichend sind. Es ist nicht zwingend erforderlich, dass sich alle Bereiche, die Spezifität vermitteln zwischen *CtCdc1* und *Cdc1* unterscheiden. Komplementationsanalysen mit weiteren *Cdc1*-Orthologen beispielsweise aus *Schizosaccharomyces pombe* oder anderen Organismen aus *Saccharomycetales* können helfen, diese hinreichenden Kriterien zu verfeinern.

Im Gegensatz zu *CtCdc1* konnte die *CtTed1*-MPE-Domäne die Funktion des nativen *S. cerevisiae* Ted1 vollständig übernehmen. Auch für das Ted1-Ortholog Pgap5 aus dem Menschen welches an

Cdc1 Spezifitätsbewertung

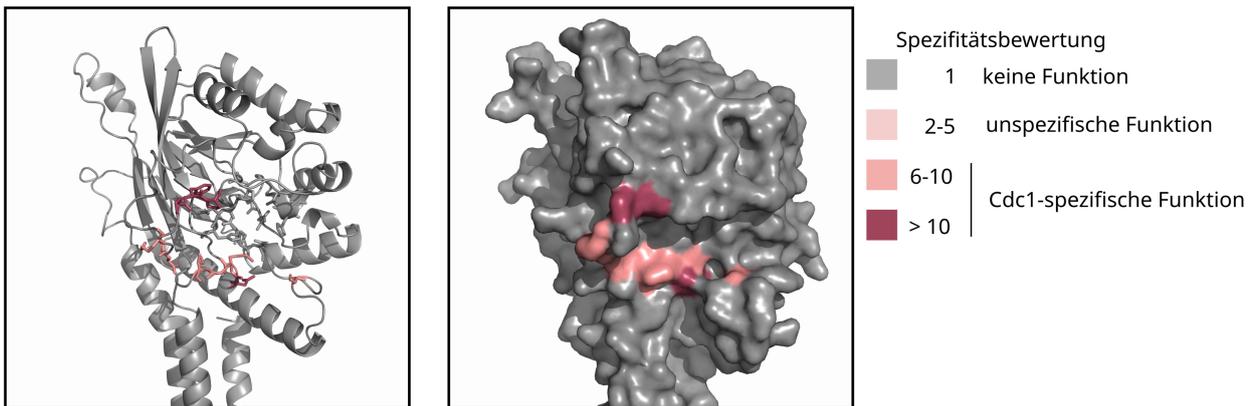
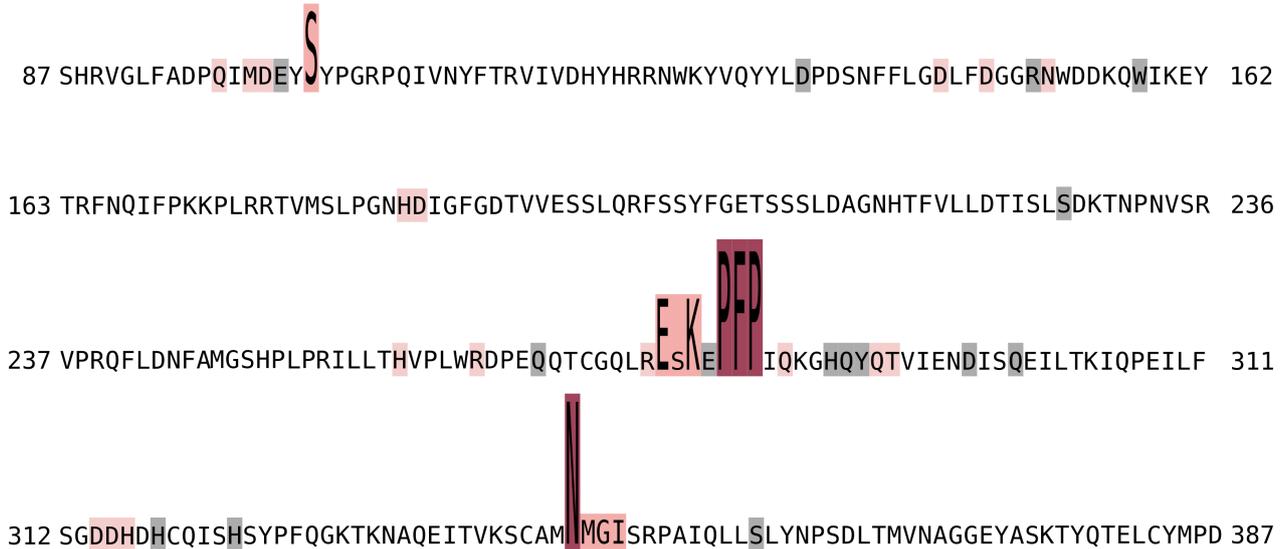


Abb. 37: Spezifitätsbewertung ausgewählter analysierter Reste von Cdc1

Zur Ermittlung einer Spezifitätsbewertung wurde die Funktionsbewertung jedes Restes mit unbekannter oder mutmaßlicher Substratbindungsfunktion sowie aller MPE-Reste mit dem Grad der Konservierung zwischen Cdc1 und *CtCdc1* multipliziert (x1 identische Reste, x2 ähnliche Reste, x3 unterschiedliche Reste) und am Ende 1 Punkt addiert. Die Spezifitätsbewertung wurde kategorisiert in 1: keine Funktion, 2-5: unspezifische Funktion, >6 Cdc1-spezifische Funktion. Die Höhe der Reste in der Aminosäuresequenz von Cdc1 wurde ab einer Spezifitätsbewertung von >6 proportional zu ihrer Bewertung angepasst.

ERES und im *cis*-Golgi EtNP-2 eliminiert konnte gezeigt werden, dass es in *S. cerevisiae* *TED1*-Deletionsstämmen die Akkumulation von GPI-verankerten Proteinen komplementiert (Fujita *et al.* 2009; Manzano-Lopez *et al.* 2015). Ted1 und *CtTed1* besitzen eine Sequenzidentität von 34,8 % und Ted1 und Pgap5 besitzen eine Sequenzidentität von 21,4 %. Strukturell zeigen alle Proteine Unterschiede innerhalb der MPE-Domäne.

Die hier generierten Daten können zusammen mit bereits publizierter Literatur ein Hinweis darauf sein, dass die Ted1-Funktion konservierter ist als die Cdc1-Funktion. Es kann allerdings auch ein weiterer Grund zu der Annahme sein, dass die Ted1-Funktion grundsätzlich weniger Spezifität bedarf. Sicherlich wäre auch in diesem Kontext spannend, möglichst verschiedene Ted1-Orthologe funktionell in *S. cerevisiae* zu charakterisieren.

3.6 Schlusswort und Ausblick

Viele GPI-verankerte Zellwandproteine aus *S. cerevisiae* besitzen ein Ortholog in *C. glabrata*, das massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte (Rasheed *et al.* 2020). Viele GPI-verankerte Zellwandproteine aus *Candida species* gelten als Virulenzfaktoren (Calderone & Fonzi 2001). Die Erforschung des komplexen GPI-Biosynthese Netzwerks kann im Zusammenhang mit steigenden nosokomialen Mykosen ein bedeutender Bestandteil bei der Entwicklung neuer Antimykotika sein. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente und Analysen lieferten erstmals genau Einblicke darüber, wie GPI-spezifische Metallophosphoesterasen ihre Funktion und Spezifität vermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass...

... alle konservierten MPE-Reste von Cdc1, Ted1 und Dcr2 essentiell für ihre Funktion sind.

... ein variabler, dem MPE-Zentrum zugewandter Loop, der sich zwischen Cdc1, Ted1 und Dcr2 stark in Länge und Struktur unterscheidet einen Einfluss auf die Substratspezifität haben könnte.

... Cdc1 eine funktionell so spezifische Metallophosphoesterase ist, dass ihre Funktion nicht von allen anderen Orthologen der Ascomyceten komplementiert werden kann. Es wurden 30 funktionelle Reste von Cdc1 identifiziert. Die Anzahl an Genkopien von *CDC1* spielt vor allem bei den Zellwandstressoren Calcofluorweiß und Kongorot eine Rolle.

... Ted1 eine strukturell robuste Metallophosphoesterase mit hoher Toleranz gegenüber Zellwandstressphänotypen ist. Es konnten 11 funktionelle Reste identifiziert werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Ted1-Funktion über die *Saccharomycetales* hinaus konserviert ist. Eine zu niedrige oder zu große Kopienzahl von *TEDI*-Genen führt vor allem unter Caspofungin zu Wachstumsdefekten, die wahrscheinlich mit der Prozessierung GPI-verankerter Zellwand- und Plasmamembranproteinen zusammenhängen.

... Dcr2 eine Metallophosphoesterase ist, die sich in ihren 14 identifizierten funktionellen Resten gleichermaßen von Cdc1 und Ted1 unterscheidet. Dcr2 zeigte sich vermutlich aufgrund der späteren

Lokalisation während der GPI-Anker Prozessierung grundsätzlich sensitiver gegenüber Zellwandspezifischen Stressen als Ted1. Auch veränderte Kopienzahlen von *DCR2* führten vor allem zu Sensitivität gegenüber Caspofungin. Analog zu Ted1 hängt dies wahrscheinlich ebenfalls mit der Prozessierung GPI-verankerter Zellwand- und Plasmamembranproteinen zusammen.

... Zink²⁺-Stress vermutlich keinen Einfluss auf das Zellwandproteom GPI-verankerter Proteine besitzt, aber einen Einfluss auf die Dcr2 Aktivität haben könnte und somit indirekt direkt auf GPI-Biosynthese wirken könnte. Der *ted1Δ*-spezifische Zink-Phänotyp kann durch eine Cdc1-Variante mit 33 mutierten Aminosäuren und unbekannter Funktion komplementiert werden kann

In zukünftigen Studien wird es vor allem wichtig sein, in Erfahrung zu bringen, welchen genauen Einfluss die N- und C-terminale Domäne von Cdc1, Ted1 und Dcr2 auf die Funktion und Substratspezifität der Proteine haben. Es ist denkbar, einzelne Bereiche dieser Domänen zu deletieren oder erneut gezielte Chimären der drei Proteine mit kleinen ausgetauschten Bereichen zu analysieren. Ein funktioneller Vergleich von Ted1 und Dcr2 bei Lokalisierung im gleichen Kompartiment kann Aufschluss darüber geben, ob die beide Proteine die gleiche Effizienz und Affinität gegenüber Substraten besitzen. Auch gezielte Chimären zwischen Cdc1 und *CtCdc1* können helfen, ein tieferes Verständnis über die spezifische Cdc1-Funktion zu erhalten. Eine phylogenetisch breit angelegte Komplementationsanalyse mit verschiedenen Orthologen von Cdc1, Ted1 und Dcr2 kann helfen, ein tieferes Verständnis für die Funktion und Substratspezifität der GPI-spezifischen Metallophosphoesterasen zu erlangen.

4. Material

4.1 Oligonukleotide

Für die Herstellung von PCR Produkten wurden synthetische Oligonukleotide von *Microsynth GmbH* bezogen. Für die Herstellung von Deletionskassetten nach (Janke *et al.* 2004) wurden folgende Primer verwendet:

Tab. 4: Synthetische Oligos für die Herstellung von Deletionskassetten für *S. cerevisiae*

Nr.	Name	Sequenz
KO Set 1	CDC1-S1 (fw)	CTAATCTGTTGGATACATTAGACAATAAGCTCTAGGAAGTATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
	CDC1-S2 (rv)	AAAGCATTGATCCTGGAAGAGAATAGCAGTAATTCTGTCTAATCGATGAATTCGAGCTCG
KO Set 2	TED1-S1 (fw)	AAAACAACAGCAGCAGCATTGTACCAAGAATCCCAAGATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
	TED1-S2 (rv)	CTATACAGGAGTTTTATCTTCTTTACTCTTTTTTGTITAGATCGATGAATTCGAGCTCG
KO Set 3	CWH43-S1 (fw)	AAGTAACCAGGAATACAGAAGGTATCCACCGCCAGTTATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
	CWH43-S2 (rv)	GTGATTACACTGATTTATAAAACCACCTTACGGCCTCTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
KO Set 4	DCR2_S1 neu	TCTTTTTAGATCGCAGATACCTCTGATACAAGTTTTATACT-TAAGTATCGAAGACCAGCACCGTGGTTAAAAATCTTAAACATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
	DCR2_S2 neu	TTTCACTGATCAAATGATTTCTAAGCATCAAGCAAAGCTGAT-TAAAGCCATACATTATTTTAAATGCTGATATATTGCAATTTAATCGATGAATTCGAGCTCG
KO Set 5	LEU2_S1	TCAGCAATATATATATATATATTTCAAGGATATAACCATTCTAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
	LEU2_S2	TATAAAGTTTATGTACAAATATCATAAAAAAAGAGAATCTTTTTAATCGATGAATTCGAGCTCG

Für die Klonierung mithilfe des pJET1.2 Vektors wurden folgende synthetische Oligos zur Amplifizierung von Genen verwendet:

Tab. 5: Synthetische Oligos für die Amplifizierung und Klonierung in pJET1.2

Nr.	Name	Sequenz
K	PciI_76ScCDC1_fw	acatgt ca AAATGTCAGTGGTCAACCTGGG

Nr.	Name	Sequenz
Set1	XhoI_385ScCDC1_r	ctcgag TTAATCCGGCATATAACACAGTTCTG
K Set 2	NcoI+2_ScTED1_fw	ccatgg at CATCCGGAACAGTGTAGCTGG
	XhoI_ScTED1_rv	ctcgag TTAACACGGACACAGGCTAAAGG
K Set 3	NcoI+2_CtTED1_fw	ccatgg at AGCAATTGTGCATTTCCGCTG
	XhoI_CtTED1_rv	ctcgag TTAACAGGTTGCATATTCTGCTTTCC
K Set 4	PciI_118CtCDC1_f	acatgt ca GAACGTTGGGCATTTTCATAGC
	XhoI_525CtCDC1_r	ctcgag TTAATACATCGGCAGAATACCACC

Die folgenden synthetischen Oligos wurden für die Klonierung mittels *in vivo* Ligation verwendet. Sie weisen einen Überhang von mindestens 30 b und eine bindende Primerregion auf.

Tab. 6: Synthetische Oligos für die Klonierung mittels *in vivo* Ligation

Nr.	Name	Sequenz
HR Set 1	Cdc1-vivolig_res_fw	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGA CTTTTCTTGATCTCATCATCGACC
	Cdc1-vivolig_res_rv	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAAT ATAAGGTGTATTCGCATATATTAATAG
HR Set 2	Paul-Ted1-res_fw	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGAgegcgcAG CGAAACCCCTCTGCTAAC
	Eco91I-Ted1-res_rv	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATGGTGACC TGTGCATCCCTTTAAAACAAAACAAC
HR Set 3	Ct CDC1 FD fw	ATTGTATGGATCTTATGGTTAGGATTAATATCTTATGGTGAAAG ATGG GCTTTTCATT
	Ct CDC1 FD rv	AGCAGAGAATAATAATCCCATAGGTACATTCTGATAATACC ACCATTCTTAACCTTGGC
HR Set 4	Ct CDC1 FL fw	CTGTTGGATACATTAGACAATAAGCTCTAGGAAGTATGGCTA GACCTTATTCTATGTCTAGTTC
	Ct CDC1 FL rv	ATTTTGATCCTGGAAGAGAATAGCAGTAATTCTGTTTAGCCCT TCCAATTCAACCAAAC
HR Set 5	CtTED1_35-544_fw	GTCGCTAATATTTACATCTATACTTATCCATCTTTC agcaactgcgccttccact
	CtTED1_35-544_rv	GGTGACGAGCAGGGACACTTTAGCGAACCACCAAAC gtgtgcgtcccgagc
HR Set 6	Ted-Cdc-Ted_fw	ATTTGACTTTTGTGGACAAAGTGAAGAATTACTTC TATGAATCAGTGGTTGTGAAGAGAG
	Ted-Cdc-Ted_rv	ACAAATAGTAGCGAGGACCAAGTGAATATGGTGAC TGCTTGTAGGGATCTGGC
HR	60Cdc-Ted31_fw	ATTGTATGGATCTTATGGTTAGGATTAATATCTTAT

Nr.	Name	Sequenz
Set 7		CATCCAGAACAGTGTTCATGGAAC
	392Cdc-Ted447_rv	AGCAGAGAATAATAATCCCCATAGGTACATTCTGAT GAATGGGCATAAACTGAAAGTCCAC
HR Set 8	MORF-Cdc1-MORF_fw	ATCTATTGTATGGATCTTATGGTTAGGATTAATATCTTAT TATGAATCAGTGGTTGTGAAGAGAG
	MORF-Cdc1-MORF_rv	AGGCAGCAGAGAATAATAATCCCCATAGGTACACTCTGAT TGCCCTGTAGGGATCTGGC
HR Set 9	Cdc-MORF-Cdc_fw	ATCTATTGTATGGATCTTATGGTTAGGATTAATATCTTAT TATGAATCAGTGGTTGTGAAGAGAG
	Cdc-MORF-Cdc_rv	AGGCAGCAGAGAATAATAATCCCCATAGGTACATTCTGAT TGCCCTCGTAGGGATCAGGC
HR Set 10	DCR2_Res_fw	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGA TATTGTATATAGGACTTGCTCAGTTATATTTT
	DCR2_Res_rv	CGAGGTTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAAT TTA TAGGCTCAAGCTAAAACCTTTG
HR Set 11	Dcr-Cdc-Dcr_f	TGTAGACACAGGAGCTCAACGGCTGCAAGAACTGATGAA AGTCATAGGGTGGGTTTATTTG
	Dcr-Cdc-Dcr_r	ACATAGACTGAAAATCAAAAATCTCTTTTGGACTGCCATT ATCTGGCATATAGCATAGCTCTG
HR Set 12	Dcr-Ted-Dcr_f	TGTAGACACAGGAGCTCAACGGCTGCAAGAACTGATGAA GATGAGGATATTCATATTTTGGCCTTC
	Dcr-Ted-Dcr_r	ACATAGACTGAAAATCAAAAATCTCTTTTGGACTGCCATT AGCGAATGGGCATAAACTGAAAG
HR Set 13	Ted-Cdc-Ted_f	TCGAGAGCAATGGCATGGTAGCCATGCCTCTGCAGGTAAC AGTCATAGGGTGGGTTTATTTG
	Ted-Cdc-Ted_r	CGAGCAGGGACACTTTAGCGAACCACCAAACATGTTGAAT ATCTGGCATATAGCATAGCTCTG
HR Set 14	Ted-Dcr-Ted_f	TCGAGAGCAATGGCATGGTAGCCATGCCTCTGCAGGTAAC GGAAAGTTCAAAATTGTTTCAGTTGG
	Ted-Dcr-Ted_r	CGAGCAGGGACACTTTAGCGAACCACCAAACATGTTGAAT TAATCTTTTCCATGTGTGTATATTGTTCTC
HR Set 15	Cdc-Ted-Cdc_f	CCAATGGTCGACTTGGGAGGATTGGCCTGAAGGCGCTGAA GATGAGGATATTCATATTTTGGCCTTC
	Cdc-Ted-Cdc_r	ATAATAATCCCCATAGGTACATTCTGATTGCCTTGTAGGG AG CGAATGGGCATAAACTGAAAG
HR Set 16	Cdc-Dcr-Cdc_f	CCAATGGTCGACTTGGGAGGATTGGCCTGAAGGCGCTGAA GGAAAGTTCAAAATTGTTTCAGTTGG
	Cdc-Dcr-Cdc_r	ATAATAATCCCCATAGGTACATTCTGATTGCCTTGTAGGG TAATCTTTTCCATGTGTGTATATTGTTCTC

Die folgende Tabelle enthält synthetische Oligos, welche für die Ortsspezifische Mutagenese mittels Quickchange PCR verwendet wurden:

Tab. 7: Synthetische Oligos für Ortsspezifische Mutagenese PCRs

Nr.	Name	Sequenz
QC Set 1	1-Cdc1_D314DH A_fw	AGAAATATTATTTTCCGGG gcg gcg gcg GACCATTGTCAGATATCAC
	1-Cdc1_D314DH A_rv	GTGATATCTGACAATGGTCcgccgccgcCCCGGAAAATAATATTTCT
QC Set 2	2-Cdc1_D144A_fw	GCAATTTTTTTCCTAGGTG cg CTATTTGATGGAGGGAG
	2-Cdc1_D144A_rv	CTCCCTCCATCAAATAGcgCACCTAGGAAAAAATTGC
QC Set 3	3-Cdc1_H287A_fw	TTTCCTATTCAGAAAGGG gcg CAGTACCAGACAGTTATAG
	3-Cdc1_H287A_rv	CTATAACTGTCTGGTACTGcgCCCTTTCTGAATAGGAAA
QC Set 4	4-Cdc1_Q97A_fw	GTTTATTTGCAGACCCA gcg ATAATGGACGAATATTCATATCC
	4-Cdc1_Q97A_rv	GGATATGAATATTCGTCCATTATcgTGGGTCTGCAAATAAAC
QC Set 5	5-Cdc1_N151A_fw	CTATTTGATGGAGGGAGA gcg TGGGATGATAAGCAATGG
	5-Cdc1_N151A_rv	CCATTGCTTATCATCCCAcgTCTCCCTCCATCAAATAG
QC Set 6	6-Cdc1_E279A_fw	GCTACGTGAATCCAAAG cg CCTTTTCTATTTCAGAAAG
	6-Cdc1_E279A_rv	CTTTCTGAATAGGAAAAGGcgCTTTGGATTCACGTAGC
QC Set 7	7-Cdc1_C271A_fw	TCCAGAACAGCAAACG gcg GGTCAGCTACGTGAAT
	7-Cdc1_C271A_rv	ATTCACGTAGCTGACCcgCGTTTGCTGTTCTGGA
QC Set 8	7-Cdc1_C319A_fw	GGGATGATCATGACCAT gcg CAGATATCACACTCATATCC
	7-Cdc1_C319A_rv	GGATATGAGTGTGATATCTGcgATGGTCATGATCATCCC
QC Set 9	8-Cdc1_C73A_fw	GAAGAGAGCAATGAAGAAG gcg CAATGGTCGACTTGGG
	8-Cdc1_C73A_rv	CCCAAGTCGACCATTGcgCTTCTTCATTGCTCTCTTC
QC Set 10	8-Cdc1_C383A_fw	AACTTACCAAACAGAGCTA gcg TATATGCCAGATCCCTAC
	8-Cdc1_C383A_rv	GTAGGGATCTGGCATATAcgTAGCTCTGTTTGGTAAGTT
QC Set 11	9-Cdc1_M346,7,8A_fw	AAGTCATGTGCAATGAAC gcg gcg gcg AGTAGGCCTGCTATTC
	9-Cdc1_M346,7,8A_rv	GAATAGCAGGCCTACTcgccgccgcGTTTCATTGCACATGACTT
QC Set 12	10-Cdc1_D100A_fw	CAGACCCACAAATAATGG cg GAATATTCATATCCTGGGAG
	10-Cdc1_D100A_rv	CTCCCAGGATATGAATATTCcgCCATTATTTGTGGGTCTG
QC Set 13	11-Cdc1_S103A_fw	CACAAATAATGGACGAATAT gcg TATCCTGGGAGGCCT
	11-Cdc1_S103A_rv	AGGCCTCCCAGGATAcgATATTCGTCCATTATTTGTG
QC	12-Cdc1_N345A_fw	GTAAAGTCATGTGCAATG gcg ATGGGGATCAGTAGGC

Nr.	Name	Sequenz
Set 14	12-Cdc1_N345A_rv	GCCTACTGATCCCCATcgCATTGACATGACTTTAC
QC Set 15	14-Cdc1_D317A_fw	CCGGGGATGATCATG cg CATTGTCAGATATCACACTC
	14-Cdc1_D317A_rv	GAGTGTGATATCTGACAATGcgCATGATCATCCCCGG
QC Set 16	15-Cdc1_H318A_fw	CGGGGATGATCATGAC gcg TGTCAGATATCACACTCATAT
	15-Cdc1_H318A_rv	ATATGAGTGTGATATCTGACAcgGTCATGATCATCCCCG
QC Set 17	16-Cdc1_S357A_fw	CCTGCTATTCAATTGCTC gcg TTATATAATCCTTCAGATTTGAC
	16-Cdc1_S357A_rv	GTCAAATCTGAAGGATTATATAAcgcGAGCAATTGAATAGCAGG
QC Set 18	17-Cdc1_D146A_fw	TTTTTCCTAGGTGATCTATTTG cg GGAGGGAGAAACTGG
	17-Cdc1_D146A_rv	CCAGTTTCTCCCTCCcgCAAATAGATCACCTAGGAAAAA
QC Set 19	18-Cdc1_R150A_fw	GATCTATTTGATGGAGGG gcg AACTGGGATGATAAGCAA
	18-Cdc1_R150A_rv	TTGCTTATCATCCAGTcgCCCTCCATCAAATAGATC
QC Set 20	19-Cdc1_S227A_fw	CTTTTAGATACAATTTGCTT gcg GATAAAACAAATCCGAATGT
	19-Cdc1_S227A_rv	ACATTTCGGATTTGTTTTATCcgAAGCGAAATTGTATCTAAAAG
QC Set 21	20-Cdc1_Y229QTA_fw	CAGAAAGGGCACCAG gcg gcg gcg GTTATAGAAAACGATATATCACAAAG
	20-Cdc1_Y229QTA_rv	CTTGTGATATATCGTTTTCTATAACcgccgccgcCTGGTGCCCTTTCT G
QC Set 22	21-Cdc1_R264A_fw	CTCACGTTCCATTATGG gc GGATCCAGAACAGCAA
	21-Cdc1_R264A_rv	TTGCTGTTCTGGATCCgcCCATAATGGAACGTGAG
QC Set 23	22-Cdc1_Y289A_fw	CAGAAAGGGCACCAG gcg CAGACAGTTATAGAAAACG
	22-Cdc1_Y289A_rv	CGTTTTCTATAACTGTCTGcgCTGGTGCCCTTTCTG
QC Set 24	23-Cdc1_Q290A_fw	GAAAGGGCACCAGTAC gc GACAGTTATAGAAAACGATATATC
	23-Cdc1_Q290A_rv	GATATATCGTTTTCTATAACTGTGcgGTAAGTGGTGCCCTTTC
QC Set 25	24-Cdc1_H323A_fw	GACCATTGTCAGATATCA gcg TCATATCCGTTTCAGGG
	24-Cdc1_H323A_rv	CCCTGAAACGGATATGAcgTGATATCTGACAATGGTC
QC Set 26	Cdc_1_fw	GTCATAGGGTGGGTTTATCTGCAGACCCACAAATAATG
	Cdc_1_rv	CATTATTTGTGGGTCTGCAGATAAACCCACCCTATGAC
QC Set 27	Cdc_2_fw	CGAATATTCATATCCTGGGGGGCCTCTAATAGTTAAATATTCTAC AGGAGCGATTGTTGACCATTATCACAG
	Cdc_2_rv	CTGTGATAATGGTCAACAATCGCTCCTGTAGAATATTTAACTATT AGAGGCCCCCCAGGATATGAATATTCG
QC Set 28	Cdc_3_fw	AATATGTCCAGTATTACTTGGAACCTGATAGCAATTTTTTCCT
	Cdc_3_rv	AGGAAAAAATTGCTATCAGGTTCCAAGTAATACTGGACATATT
QC Set 29	Cdc_4_fw	GATCCTGATAGCAATTTTTTCCAAGGTGATCTATTTGATGGAG
	Cdc_4_rv	CTCCATCAAATAGATCACCTTGGAAAAAATTGCTATCAGGATC

Nr.	Name	Sequenz
QC Set 30	Cdc_5.1_fw	ATCTATTTGATGGAGGGAGAGACTGGGATGATAAGCAATG
	Cdc_5.1_rv	CATTGCTTATCATCCCAGTCTCTCCCTCCATCAAATAGAT
QC Set 31	Cdc_5.2_fw	GATTAAGAGGTACACACGATTTCGACCAGATATACCCCAAGAAGC CGCCCAGAAGAACGGTCATGTCT
	Cdc_5.2_rv	AGACATGACCGTTCTTCTGGGCGGCTTCTTGGGGTATATCTGGT CGAATCGTGTGTACTCTTTAATC
QC Set 32	Cdc_6_fw	TTGCAATGGGTTACATTCGCTTCTTAGAATTCTTTAACTCAGC TTC
	Cdc_6_rv	GAACGTGAGTTAAAAGAATTCTAAGAAGCGAATGTGAACCCAT TGCAA
QC Set 33	Cdc_7_fw	TTATGGAGGGATCCAGAACTGCAAACGTGCGGTC
	Cdc_7_rv	GACCGCACGTTTGCAGTTCTGGATCCCTCCATAA
QC Set 34	Cdc_8_fw	CGGTCAGCTACGTGACTCCAG AGAACCTTTTCCTATTAG
	Cdc_8_rv	CTGAATAGGAAAAGGTTCTCTGGAGTCACGTAGCTGACCG
QC Set 35	Cdc_9_fw	TACCAGACAGTTATAGAAAACGAGATATCACTGGAAATTTTAAAC GAAAATTCAACCA
	Cdc_9_rv	TGGTTGAATTTTCGTTAAAATTTCCAGTGATATCTCGTTTTCTATA ACTGTCTGGTA
QC Set 36	Cdc_10_fw	GGAAAACATAAAAATGCTCAAGGGATTTTCAGTAAAGTCATGTGC AATG
	Cdc_10_rv	CATTGCACATGACTTTACTGAAATCCCTTGAGCATTTTTAGTTTT CC
QC Set 37	Cdc_11_fw	GTAAAGTCATGTGCAATGAACGAGGGGTCCAGTAGGCCTGCTA TTCA
	Cdc_11_rv	TGAATAGCAGGCCTACTGGACCCCTCGTTCATTGCACATGACTT TAC
QC Set 38	Cdc_12_fw	GCTATATGCCAGATCCCTAC g AGGCAATCAGAATGTACC
	Cdc_12_rv	GGTACATTCTGATTGCCTcGTAGGGATCTGGCATATAGC
QC Set 39	1 TED1_D133A_fw	GGTGACTGTTATGGGT gcg CTTTTCTCCAGTCAATGG
	1 TED1_D133A_rv	CCATTGACTGGAGAAAAG cgc ACCATAACAGTCACC
QC Set 40	2 TED1_D235A_fw	CAACATCACAGGTAATCAT gcg GTAGGTTACTCAGGCG
	2 TED1_D235A_rv	CGCCTGAGTAACCTAC cgc ATGATTACCTGTGATGTTG
QC Set 41	3 TED1_379-81_fw	CCAGGTATCATATTAAGTGGT gcg gca gcg GAGGGCTGTGAAACAG
	3 TED1_D133A_rv	CTGTTTTACAGCCCTCcgctgccgcACCAGTTAATATGATACCTGG
QC Set 42	4 TED1_417-19_fw	GAAATCACAGTTAAGTCTATG gcg gcg gcg TTTAATGGGAATACTGGTTTG
	4 TED1_417-19_rv	CAAACCAGTATTCCCATTTAAA cgc cgc cgc

Nr.	Name	Sequenz
		CATAGACTTAACTGTGATTTTC
QC Set 43	5 TED1_H234A_fw	CATCAACATCACAGGTAAT gcg GATGTAGGTTACTCAGGC
	5 TED1_H234A_rv	GCCTGAGTAACCTACATCcgcgATTACCTGTGATGTTGATG
QC Set 44	6 TED1_H315A_fw	TAGTACTGTTTTGTTGACG gcg GTTCCATTTTACAAGCGTG
	6 TED1_H315A_rv	CACGCTTGTAATAATGGAACcgcgCGTCAACAAAACAGTACTA
QC Set 45	7.1 TED1_C325A_fw	CAAGCGTGAAGGGTTA gcg GTTGATGGCCCAGAC
	7.1 TED1_C325A_rv	GTCTGGGCCATCAAC cgcg TAACCCTTCACGCTTG
QC Set 46	7.2 TED1_C384A_fw	CATGACCATGAGGGC gcg GAAACAGTTTATAATAAAAAATCTG
	7.2 TED1_C384A_rv	CAGATTTTTTATTATAAACTGTTTC cgcg GCCCTCATGGTCATG
QC Set 47	8.1 TED1_C35A_fw	CTTCCATCCAGAACAG gcg TCATGGAAGTGTCTAAC
	8.1 TED1_C35A_rv	GTTAGAGCAGTTCATGAcgcgCTGTTCTGGATGGAAAG
QC Set 48	8.2 TED1_C445A_fw	GAGTGGACTTTCAGTTTA gcg CCATTCGCTATTCAACAT
	8.2 TED1_C445A_rv	ATGTTGAATAGCGAATGGcgcgTAAACTGAAAGTCCACTC
QC Set 49	9 TED1_F85A_fw	GGATATTCATATTTTGGCC gcg GGTGATCCTCAGATTAAAG
	9 TED1_F85A_rv	CTTTAATCTGAGGATCACC cgcg GGCCAAAATATGAATATCC
QC Set 50	10 TED1_103,6_f	GCCATATGTGTCCCGA gcg GATACA gcg GGTAATGACTACTATCTTGG
	10 TED1_103,6_r	CCAAGATAGTAGTCATTACCcgcgTGTATCcgcgTCGGGACACATATG GC
QC Set 51	11A TED1_M131A_fw	CTCAGGTGGTGACTGTT gc GGGTGATCTTTTCTCCA
	11A TED1_M131A_rv	TGGAGAAAAGATCACCCgcAACAGTCACCACCTGAG
QC Set 52	11Q TED1_M131Q_fw	CTCAGGTGGTGACTGTT caa GGTGATCTTTTCTCCAGTC
	11Q TED1_M131Q_rv	GACTGGAGAAAAGATCACCTtgAACAGTCACCACCTGAG
QC Set 53	12 TED1_F157Y_fw	CGAAAAGATATATTAGCAGGATTT a CAAAAGAGACCCAACTTC
	12 TED1_F157Y_rv	GAAGTTGGGTCTCTTTTgtAAATCCTGCTAATATATCTTTTCG
QC Set 54	13A TED1_410,2_f	AAAGTGACGTTTTTCGTAAA gcg ATC gcg GTTAAGTCTATGATGGGTG
	13A TED1_410,2_r	CACCCATCATAGACTTAAAC cgcg GAT cgcg TTTAACGAAAACGTCACCTT
QC Set 55	13GS TED1_410,2_f	AGTGACGTTTTTCGTAAA gcg ATC gcg GTTAAGTCTATGATGGGTG
	13GS TED1_410,2_r	CACCCATCATAGACTTAACTgaGATtccTTTAACGAAAACGTCACT
QC Set 56	14 TED1_417E_19S_f	GAAATCACAGTTAAGTCTATG gaa GGT tca TTTAATGGGAATACTGGTTTG
	14 TED1_417E_19S_r	CAAACCAGTATTCCCATTAATAtgAACttcCATAGACTTAACTGTGA TTTC

Nr.	Name	Sequenz
QC Set 57	DCR2_QC1_f	GTTGGTTGTTTTACTGGTGcg CAAATCATGGGTGATAGATC
	DCR2_QC1_r	GATCTATCACCCATGATTTGcgCACCAGTAAAAACAACCAAC
QC Set 58	DCR2_QC2_f	GGTCTTTC AATGGCATT TTTT gcg ATCCCACTGCCAGAATAC
	DCR2_QC2_r	GTATTCTGGCAGTGGGAT cgc AAAAAATGCCATTGAAAGACC
QC Set 59	DCR2_QC3_f	GTCGTCAGTTGCGGA gcg gcg gcg TGTAACGATTACTGTCTTCG
	DCR2_QC3_r	CGAAGACAGTAATCGTTACA cgc cgc cgc TCCGCAACTGACGAC
QC Set 60	DCR2_QC4_f	G TTCAGTTGGCGGATCTC gcg TTGGGTGTGGGGGAG
	DCR2_QC4_r	CTCCCCACACCCAA cgc GAGATCCGCCAACTGAAC
QC Set 61	DCR2_QC5_f	GTCAGTTGCGGACATG cg CATTGTAACGATTACTGTCTTC
	DCR2_QC5_r	GAAGACAGTAATCGTTACAATG cg CATGTCCGCAACTGAC
QC Set 62	DCR2_QC6_f	CGGACATGACCATTGT gcg GATTACTGTCTTCGAGATGAC
	DCR2_QC6_r	GTCATCTCGAAGACAGTAATC cgc ACAATGGTCATGTCCG
QC Set 63	DCR2_QC7_f	CGCAGTTGGTTGTTTT gcg GGTGACCAAATCATGGG
	DCR2_QC7_r	CCCATGATTTGGTCACC cgc AAAACAACCAACTGCG
QC Set 64	DCR2_QC8_f	CATGATGTGAACTTGAAGTTC gcgACAgcg CTTTCAATGG- CATT TTTTCAC
	DCR2_QC8_r	CGTGAAAAAATGCCATTGAAAG cgcTGTcgc GAACTTCAAGTT- CACATCATG
QC Set 65	DCR2_QC9_f	GACGAATGTTTTCATATTGGT gcg gcg gcg GAAGGATGTTTTAAT- CGGC
	DCR2_QC9_r	GCCGATTA AAAACATCCTTC cgc cgc cgc ACCAATATGAAAACATT- CGTC
QC Set 66	DCR2_QC10_f	GGTTCCTTTGGACGC gcg gcg gcg GGAAAGTCAGAATACCTTTAC
	DCR2_QC10_r	GTA AAGGTATTCTGACTTTCC cgc cgc cgc GCGTCCAAAGGAACC
QC Set 67	DCR2_QC11_f	GAAAAATCCCCTCATTGGA gc GTAC gcg GAAGGTGTTACTG- CACC
	DCR2_QC11_r	GGTGCAGTAACACCTTC cgc GTAC gc TCCAATGAGGG- GATTTTTC
QC Set 68	TED1_Q89_f	GCCTTCGGTGATCCT gc GATTAAAGGCATCTGGCC
	TED1_Q89_r	GGCCAGATGCCTTTAATC gc AGGATCACCGAAGGC
QC Set 69	TED1_E382_f	T TAACTGGTCATGACCATG c GGGCTGTGAAACAGTTTA
	TED1_E382_r	TAAACTGTTTCACAGCCC g CATGGTCATGACCAGTTA
QC Set 70	TED1_G92D_f	CGGTGATCCTCAGATTAAAG a CATCTGGCCAAAGACG
	TED1_G92D_r	CGTCTTTGGCCAGATG t CT TTAATCTGAGGATCACCG
QC Set 71	CDC1_Q288_f	CCTATTCAGAAAGGGCAC gc GTACCAGACAGTTATAGAAAAC
	CDC1_Q288_r	GTTTTCTATAACTGTCTGGTAC gc GTGCCCTTTCTGAATAGG

Nr.	Name	Sequenz
QC Set 72	CDC1_D147_f	CAATTTTTCTAGGTGATCTATTTG cg GGAGGGAGAACTGGG
	CDC1_D147_r	CCCAGTTTCTCCCTCC cg CAAATAGATCACCTAGGAAAAAATTG
QC Set 73	CDC1_R275_f	CGTGCGGTCAGCTA gcg GAATCCAAAGAACCTTTTCC
	CDC1_R275_r	GGAAAAGGTTCTTTGGATTc cgc TAGCTGACCGCACG
QC Set 74	CDC1_Q284_f	CCAAAGAACCTTTTCCTATT gc GAAAGGGCACCAGTAC
	CDC1_Q284_r	GTA CTGGT GCCCTTTC gc AATAGGAAAAGGTTCTTTGG
QC Set 75	CDC1_E101_f	GACCCACAAATAATGGACG cg TATTCATATCCTGGGAGGC
	CDC1_E101_r	GCCTCCCAGGATATGAATA cg CGTCCATTATTTGTGGGTC
QC Set 76	CDC1_P280-282_f	GCTACGTGAATCCAAAGAA gcg gcg gcg ATTCAGAAAGGGCACC
	CDC1_P280-282_r	GGTGCCCTTTCTGAAT cgc cgc cgc TTCTTTGGATTCACGTAGC
QC Set 77	CDC1_M99_f	GTTTATTTGCAGACCCACAAATA gc GGACGAATATTCATAT- CCTGG
	CDC1_M99_r	CCAGGATATGAATATTCGTCC gc TATTTGTGGGTCTGCAAA- TAAAC
QC Set 78	CDC1_F114_f	GAGGCCTCAAATAGTTAATTAT gcg ACAAGAGTGATTGTTGACC
	CDC1_F114_r	GGTCAACAATCACTCTTGT cgc ATAATTA ACTATTTGAGGCCTC
QC Set 79	4.1 Cdc_F93A_f	GAAAGTCATAGGGTGGGTTTA gcg GCAGACCCACAAATAATGG
	4.1 Cdc_F93A_r	CCATTATTTGTGGGTCTGCgcgTAAACCCACCCTATGACTTTC
QC Set 80	4.2 Cdc_L142A_f	GGATCCTGATAGCAATTTTTTC gcg GGTGATCTATTT- GATGGAGGG
	4.2 Cdc_L142A_r	CCCTCCATCAAATAGATCACCCgcgGAAAAAATTGCTATCAGGAT- CC
QC Set 81	4.3 Cdc_H184A_f	GTCATGTCTTTACCAGGTAAT gcg GATATTGGTTTTGGAGACA- CAG
	4.3 Cdc_H184A_r	CTGTGTCTCCAAAACCAATATCgcgATTACCTGGTAAAGACAT- GAC
QC Set 82	4.4 Cdc_D185A_f	GTCTTTACCAGGTAATCACG cg ATTGGTTTTGGAGACACAG
	4.4 Cdc_D185A_r	CTGTGTCTCCAAAACCAATcgCGTGATTACCTGGTAAAGAC
QC Set 83	4.5 Cdc_D315A_f	GAAATATTATTTTCCGGGGATG cg CATGACCATTGTCAGATAT- CAC
	4.5 Cdc_D315A_r	GTGATATCTGACAATGGTCATGgcgCATCCCCGAAAATAA- TATTC
QC Set 84	4.6 Ted_F85A_f	GAGGATATTCATATTTTGCC gcg GGTGATCCTCAGATTAAAGG
	4.6 Ted_F85A_r	CCTTTAATCTGAGGATCACCCgcgGGCCAAAATATGAATATCCTC
QC Set 85	4.7 Ted_F85S_f	GAGGATATTCATATTTTGCC tct GGTGATCCTCAGATTAAAGG
	4.7 Ted_F85S_r	CCTTTAATCTGAGGATCACCCagaGGCCAAAATATGAATATCCTC
QC	4.9 Ted_I140A_f	GATCTTTTCTCCAGTCAATGG gcg GGTGATTCCGAATTCCATAA-

Nr.	Name	Sequenz
Set 86		TAG
	4.9 Ted_I140A_r	CTATTATGGAATTCGGAATCACCcgcCCATTGACTGGAGAAAA-GATC
QC Set 87	4.10 Ted_I140S_f	GATCTTTTCTCCAGTCAATGG tct GGTGATTCCGAATTCCATAA-TAG
	4.10 Ted_I140S_r	CTATTATGGAATTCGGAATCACCcagaCCATTGACTGGAGAAAA-GATC
QC Set 88	4.11 Ted_K320A_f	GACGCATGTTCCATTTTAC gc GCGTGAAGGGTTATGC
	4.11 Ted_K320A_r	GCATAACCCTTCACGCgcGTAAAATGGAACATGCGTC
QC Set 89	4.12 Ted_R349A_f	GAATCATATAAATCTGGGCTTTTG gcg TCCCAAATCATTGAGTGAATC
	4.12 Ted_R349A_r	GATTCACTCAAATGATTTTGGGAcgcCAAAGCCCAGATTTATATGATTC
QC Set 90	4.13 Ted_D380A_f	CAGGTATCATATTAAGTGGTCATG cg CATGAGGGCTGTGAAAC
	4.13 Ted_D380A_r	GTTTCACAGCCCTCATGcgCATGACCAGTTAATATGATACCTG
QC Set 91	4.14 Ted_M416A_f	GTAAAGAAATCACAGTTAAGTCT gc GATGGGTGAATT-TAATGGG
	4.14 Ted_M416A_r	CCATTAAATTCACCCATCgcAGACTTAACTGTGATTTCTTTAAC
QC Set 92	4.15 Dcr_L253A_f	GGAAAGTTCAAATTTGTTTCAG gc GGCGGATCTCCACTTG
	4.15 Dcr_L253A_r	CAAGTGGAGATCCGCCgcCTGAACAATTTTGAACTTTCC
QC Set 93	4.16 Dcr_L253S_f	GAAGGAAAGTTCAAATTTGTTTCAGT ct GCGGATCTCCACTTGG
	4.16 Dcr_L253S_r	CCAAGTGGAGATCCGCagACTGAACAATTTTGAACTTTCTTC
QC Set 94	4.17 Dcr_T300Q_f	CGCAGTTGGTTGTTTTT cag GGTGACCAAATCATGGG
	4.17 Dcr_T300Q_r	CCCATGATTTGGTCCACcctgAAAAACAACCAACTGCG
QC Set 95	4.18 Dcr_S309A_f	CCAAATCATGGGTGATAGA gcg ATTCAAGACTCTGAAACCG
	4.18 Dcr_S309A_r	CGGTTTCAGAGTCTTGAATcgcTCTATCACCCATGATTTGG
QC Set 96	4.19 Dcr_S309I_f	CCAAATCATGGGTGATAGA ata ATTCAAGACTCTGAAACCG
	4.19 Dcr_S309I_r	CGGTTTCAGAGTCTTGAATtatTCTATCACCCATGATTTGG
QC Set 97	4.20 Dcr_H338A_f	GCAATGGTATGGGGAAAT gcg GACGACGAGGGAAGC
	4.20 Dcr_H338A_r	GCTTCCCTCGTCGTCcgcATTTCCCATACCATTTGC
QC Set 98	4.21 Dcr_D339A_f	GGTATGGGGAAATCACG cg GACGAGGGAAGCTTAAC
	4.21 Dcr_D339A_r	GTAAAGCTTCCCTCGTCcgcCGTGATTTCCCATACCATC
QC Set 99	4.22 Dcr_E449A_f	CACATCCCCTGACCAG cg TACTTGAATATTGAATCCAAGAC
	4.22 Dcr_E449A_r	GTCTTGGATTCAATATTCAAGTAcgCTGGCAGTGGGATGTG
QC Set 100	4.23 Dcr_M468A_f	GAAAAATCCCCTCATTGGA gc GTACAAAGAAGGTGTTACTG
	4.23 Dcr_M468A_r	GCAGTAACACCTTCTTTGTACgcTCCAATGAGGGGATTTTTC

Nr.	Name	Sequenz
QC Set 101	4.25 Dcr_G526M_f	GGTGGAGGTGGAGAA atg GGTTATGCTGGCTATGG
	4.25 Dcr_G526M_r	CCATAGCCAGCATAAACCcatTTCTCCACCTCCACC
QC Set 102	4.26 Dcr_G526N_f	GGTGGAGGTGGAGAA aac GGTTATGCTGGCTATGG
	4.26 Dcr_G526N_r	CCATAGCCAGCATAAACCggtTTCTCCACCTCCACC
QC Set 103	Cdc1 5.1 H259 f	GCTTCCTAGAATTCTTTTAACT gcg GTTCCATTATGGAGGGATC
	Cdc1 5.1 H259 r	GATCCCTCCATAATGGAACcgcAGTTAAAAGAATTCTAGGAAGC
QC Set 104	5.2 P251A P253A f	TTTGCAATGGGTTACAT gcg CTT gcg AGAATTCTTTTAACT-CACGTT
	5.2 P251A P253A r	GAACGTGAGTTAAAAGAATTCTcgcAAGcgcATGTGAACCCATTG-CAAA
QC Set 105	5.4 N307A S309A f	CCAATAAATGAACGTAAATTC gcg GGT gcg ACTGTTTTGTT-GACGC
	5.4 N307A S309A r	GCGTCAACAAAACAGTcgcACCcgcGAATTTACGTTTCATT-TAGTTGG
QC Set 106	CtCdc_A498N_f	ACTGTAAAGTCCATTAACATG aa TATGGGTGTTATTGGTAGAG
	CtCdc_A498N_r	CTCTACCAATAACACCCATA ttCATGTTAATGGACTTAACAGT
QC Set 107	Ted1 D327A fw	CGTGAAGGGTTATGCGTT GCG GGCCCAGACACTAGGTAT
	Ted1 D327A rv	ATACCTAGTGTCTGGGCC CGC AACGCATAACCCCTTCACG
QC Set 108	Ted1 D104D109A f	GCCATATGTGTCCCGATTA GCA ACATACGGTAAT GCG TAC-TATCTTGGTCACATCTATGATAT
	Ted1 D104D109A r	ATATCATAGATGTGACCAAGATAGTA CGC ATTACCGTATGT TGC TAATCGGGACACATATGGC

Die folgenden synthetischen Oligos wurden zur Sequenzierung oder zur Überprüfung von Gendelektionen verwendet:

Tab. 8: Synthetische Oligos für die Sequenzierung von DNA (S) oder zum Verifizieren von Gendelektionen (T)

Nr.	Name und Verwendung	Sequenz
P 1 (S)	M13	TGTAAAACGACGGCCAG
P 2 (S)	M13r	CAGGAAACAGCTATGAC
P 3 (S)	SacII Cdc1_fw	ccgcggATGGTATATCGTAACAGGTCAAAG
P 4 (S)	PauI_Cdc1_rv	gcgcgcATAAGGTGTATTTCGCATATATTAATAG
P 5 (S)	SacII Ted1_fw	ccgcggATGCTCAGGTGTGCGGTC
P 6 (S)	PauI_Ted1_rv	gcgcgcAATGTGCATCCCTTTAAAACAAAAC
P 7 (T)	tTAPTG_t_fw_gen (CDC1_ko_fw)	AATCTCAGACCTCAGCAATCTCTC

Nr.	Name und Verwendung	Sequenz
P 8 (T)	SmaI_Ted1-Rescue_fw	cccgggCTGCTTACTCGGAACATCTTAAAG
P 9 (T)	DCR2_ko_neu	GGCGAGAATCCAAAGATTACTTTAAAAG
P 10 (T)	CWH43_ko_fw	GAAGTGCCAGTTTGGGATTTTGAGTCCC
P 11 (T)	leu2_ko	AAATCAATTGTCCTGTACTTCC
P 12 (T)	hiskan-tag2	GCTGCGCACGTCAAGACTG

4.2 Stämme und Plasmide

4.2.1 *E. coli* Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *E. coli* Stämme verwendet:

Tab. 9: Verwendete *E. coli* Stämme

Name (Bezugsquelle)	Genotyp	Verwendung
TOP10 (Invitrogen)	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Klassische Klonierungen, Lagerung von Dauerkulturen
Arctic Express (DE3) (Stratagen)	E. coli B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr]	Rekombinante Proteinproduktion
BL21 (DE3) (Stratagen)	B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ TetR gal λ(DE3) endA Hte	Rekombinante Proteinproduktion
BL21 Gold (DE3) (Stratagen)	E. coli B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte	Rekombinante Proteinproduktion
Rosetta (DE3) (Novagen/ Merck)	F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (CamR)	Rekombinante Proteinproduktion
SoluBL21 (DE3) (BioCat)	Strain: F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) (und nicht charakterisierte Mutati- onen)	Rekombinante Proteinproduktion
T7 Shuffle Express (DE3) (NEB)	<i>fhuA2 lacC::T7 gene1</i> [Ion] ompT <i>ahpC gal λatt::pNEB3-r1-</i> <i>cDsbC(SpecR,</i> <i>lacIq) ΔtrxB sulA11 R(mcr-</i> <i>73::miniTn10-TetS)2 [dcm]</i> <i>R(zgb-210::Tn10-</i> <i>TetS) endA1 Δgor Δ(mcrC-</i>	Rekombinante Proteinproduktion

Name (Bezugsquelle)	Genotyp	Verwendung
	mrr)114::IS10	
Rosetta (DE3) (Novagen/ Merck)	F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE (CamR)	Rekombinante Proteinproduktion
SoluBL21 (DE3)	Strain: F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) (und nicht charakterisierte Mutati- onen)	Rekombinante Proteinproduktion

4.2.2 *S. cerevisiae* Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme besitzen den Stammhintergrund Σ 1278*b*-Stammhintergrund.

Tab. 10: Verwendete und hergestellte *S. cerevisiae* Stämme

Name (Alias)	Genotyp	Herstellung
YHUM0257	<i>ura3-53</i> <i>MATa/a</i>	/
YHUM0464 (Wildtypkontrolle)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>MATa</i>	/
YHUM0465 (Wildtypkontrolle)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>MATa</i>	/
YHUM0467	<i>ura3Δ0</i> <i>his3Δ0</i> <i>MATa</i>	/
YHUM2829 (<i>flo11Δ</i>)	<i>trp1Δ0</i> <i>flo11Δ::hphNT1</i> <i>MATa</i>	/
YHUM3070/3071 (<i>CDC1/cdc1Δ</i>)	<i>ura3-53</i> <i>CDC1/</i> <i>cdc1Δ::kanMX4</i> <i>MATa/a</i>	Deletion von <i>CDC1</i> nach (Janke <i>et al.</i> 2004) mit pFA6a und Primern KO Set 1 in YHUM0257 Testprimer: P7 & P12
YHUM3072/3073 (<i>TED1/ted1Δ</i>)	<i>ura3-53</i> <i>TED1/ ted1Δ::natNT2</i> <i>MATa/a</i>	Deletion von <i>TED1</i> nach (Janke <i>et al.</i> 2004) mit pks134-1 in YHUM0257 Testprimer: P8 & P12
YHUM3445/3446 (<i>CDC1^{low*}</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hphNT1</i> <i>cdc1Δ::kanMX4</i> BHUM3406 <i>MATa</i>	- Transformation von BHUM3406 in YHUM3070/3071 - Sporulation und Tetradisdissektion - Deletion von <i>LEU2</i> mit pks133-1 und Primern KO Set 5 nach (Janke <i>et al.</i> 2004)

Name (Alias)	Genotyp	Herstellung
		Testprimer: P11 & P12
YHUM3447/3448 (<i>CDC1^{reint}</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hphNT1</i> <i>cdc1Δ::kanMX4</i> <i>MATa</i>	- Transformation von geschnittenem BHUM3737 in YHUM3445/ 3446 - Inkubation auf 5-FOA
YHUM3449/3450 (<i>CDC1^{low}</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hphNT1</i> <i>cdc1Δ::kanMX4</i> BHUM3738 <i>MATa</i>	- Transformation von BHUM3407 und Inkubation auf 5-FOA - Transformation von BHUM3738 und Screen auf Verlust von BHUM3407
YHUM3451/3452 (<i>CDC1^{high}</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hphNT1</i> <i>cdc1Δ::kanMX4</i> BHUM3739 <i>MATa</i>	- Transformation von BHUM3407 und Inkubation auf 5-FOA - Transformation von BHUM3739 und Screen auf Verlust von BHUM3407
YHUM3453/3454 (<i>ted1Δ</i> oder <i>DCR2 (ted1Δ)</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>MATa</i>	Deletion von <i>TEDI</i> nach (Janke <i>et al.</i> 2004) mit pks134-1 und Primern KO Set 2 in YHUM0465 Testprimer: P8 & P12
YHUM3455/3456 (<i>cwh43Δ</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>cwh43Δ::hphNT1</i> <i>MATa</i>	Deletion von <i>CWH43</i> nach (Janke <i>et al.</i> 2004) mit pks133 und Primern KO Set 3 in YHUM0465 Testprimer: P10 & P12
YHUM3457/3458 (<i>cdc1Δ/ted1Δ</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hphNT1</i> <i>cdc1Δ::kanMX4</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> BHUM3406 <i>MATa</i>	- Kreuzung von YHUM3445/3446 mit YHUM3453/3454 - Sporulation und Tetradisdissektion
YHUM3459/3460 (<i>cdc1Δ/cwh43Δ</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hphNT1</i> <i>cdc1Δ::kanMX4</i> <i>cwh43Δ::hphNT1</i> BHUM3406 <i>MATa</i>	- Kreuzung von YHUM3445/3446 mit YHUM3455/3456 - Sporulation und Tetradisdissektion
YHUM3461/3462 (<i>ted1Δ /cwh43Δ</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>cwh43Δ::hphNT1</i> <i>MATa</i>	- Kreuzung von YHUM3453/3454 mit YHUM3455/3456 - Sporulation und Tetradisdissektion
YHUM3463/3464 (<i>cdc1Δ/ted1Δ/cwh43Δ</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hphNT1</i> <i>cdc1Δ::kanMX4</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>cwh43Δ::hphNT1</i>	- Kreuzung von YHUM3445/3446 mit YHUM3461/3462 - Sporulation und Tetradisdissektion

Name (Alias)	Genotyp	Herstellung
	BHUM3406 <i>MATa</i>	
YHUM3583	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>MATa</i>	Deletion von <i>TEDI</i> nach (Janke <i>et al.</i> 2004) mit pks134-1 und Primern KO Set 2 in YHUM0464 Testprimer: P8 & P12
YHUM3584/3585 (<i>ted1Δ/ ted1Δ</i> <i>DCR2/ dcr2Δ</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>DCR2/</i> <i>dcr2Δ::hphNT1</i> <i>MATa/a</i>	- Kreuzung von YHUM3453/3454 mit YHUM3583, - Deletion von <i>DCR2</i> nach (Janke <i>et al.</i> 2004) mit pks133 und Primern KO Set 4 Testprimer: P9 & P12
YHUM3586/ 3576 (<i>TEDI^{low*}</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>dcr2Δ::hphNT1</i> BHUM3914 <i>MATa</i>	- Transformation von BHUM3406 in YHUM3584/3585 - Sporulation und Tetradendisektion
YHUM3590/ 3591 (<i>DCR2^{low*}</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>dcr2Δ::hphNT1</i> BHUM3955 <i>MATa</i>	- Transformation von BHUM3408 und Inkubation auf 5-FOA - Transformation von BHUM3955 und Screen auf Verlust von BHUM3408
YHUM3592/ 3593 (<i>DCR2^{low}</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>dcr2Δ::hphNT1</i> BHUM3956 <i>MATa</i>	- Transformation von BHUM3408 und Inkubation auf 5-FOA - Transformation von BHUM3956 und Screen auf Verlust von BHUM3408
YHUM3594/ 3595 (<i>DCR2^{high}</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>dcr2Δ::hphNT1</i> BHUM3957 <i>MATa</i>	- Transformation von BHUM3408 und Inkubation auf 5-FOA - Transformation von BHUM3957 und Screen auf Verlust von BHUM3408
YHUM3596/3597 (<i>TEDI (dcr2Δ)</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>his3::hisG</i> <i>dcr2Δ::hphNT1</i>	- Kreuzung von YHUM3586/YHUM3587 mit YHUM0467 - Sporulation und Tetradendisektion
YHUM3598/ 3599 (<i>TEDI^{low}</i>)	<i>Ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>dcr2Δ::hphNT1</i> BHUM3958 <i>MATa</i>	- Transformation von BHUM3408 und Inkubation auf 5-FOA - Transformation von BHUM3958 und Screen auf Verlust von BHUM3408

Name (Alias)	Genotyp	Herstellung
YHUM3600/ 3601 (<i>TEDI^{high}</i>)	<i>ura3-53</i> <i>leu2::hisG</i> <i>ted1Δ::natNT2</i> <i>dcr2Δ::hphNT1</i> BHUM3959 <i>MATa</i>	- Transformation von BHUM3408 und Inkubation auf 5-FOA - Transformation von BHUM3959 und Screen auf Verlust von BHUM3408

4.2.3 Plasmide

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden folgende Plasmide verwendet und hergestellt:

Tab. 11: Liste aller verwendeten und hergestellten Plasmide

Name (Alias)	Relevanter Genotyp	Herstellung und Referenz
pET28a(+)	<i>PT7 6xHis lacI KanR</i>	Merck
pETM30	<i>PT7 6xHIS-GST-TEV, KanR</i>	Merck
pETM60	<i>PT7 NusA-6xHIS-TEV, KanR</i>	Merck
pFA6a_kan-MX4	<i>AmpR, kanMX4</i>	(Janke <i>et al.</i> 2004)
pks133 (pFA6A_hphNT1)	<i>AmpR, hphNT1</i>	(Janke <i>et al.</i> 2004)
pks134 (pFA6A_Nat-NT2)	<i>AmpR, NatNT2</i>	(Janke <i>et al.</i> 2004)
pJET1.2	<i>AmpR, pMB1</i>	Thermo Fisher Scientific Inc
pRS306	<i>ampR, URA3</i>	(Sikorski & Hieter 1989)
pRS315	<i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	(Sikorski & Hieter 1989)
pRS316	<i>ampR, URA3, CEN6, ARSH4</i>	(Sikorski & Hieter 1989)
pRS426	<i>ampR, URA, 2μm</i>	(Sikorski & Hieter 1989)
pTF27	<i>ampR, URA3, CEN6*, ARSH4</i>	
BHUM3392	<i>ScCDC1(72-388)</i> <i>ampR</i>	(Codon optimiert für Expression <i>E. coli</i>) (<i>GeneART</i>)
BHUM3393	<i>P_{T7}-6xHis-ScCDC1(72-388)</i> <i>kanR, lacI</i>	Restriktion von BHUM3392 mit NdeI, NotI und Ligation in geschnittenen und pET28a(+)-Vektor (Diese Arbeit)
BHUM3394	<i>CtCDC1(108-530)</i> <i>ampR</i>	(Codon optimiert für Expression <i>E. coli</i>) (<i>GeneART</i>)
BHUM3395	<i>P_{T7}-6xHis-CtCDC1(108-530)</i> <i>kanR, lacI</i>	Restriktion von BHUM3394 mit NdeI, NotI und Ligation in geschnittenen und pET28a(+)-Vektor
BHUM3396	<i>ScTEDI(31-447)</i>	(Codon optimiert für Expression <i>E. coli</i>)

Name (Alias)	Relevanter Genotyp	Herstellung und Referenz
	<i>kanR</i>	(GeneART)
BHUM3397	<i>P_{T7}-6xHis-ScTED1(31-447)</i> <i>kanR, lacI</i>	Restriktion von BHUM3396 mit NdeI, NotI und Ligation in geschnittenen und pET28a(+)-Vektor (Diese Arbeit)
BHUM3398	<i>CtTED1(35-538)</i> <i>ampR</i>	(Codon optimiert für Expression <i>E. coli</i>) (GeneART)
BHUM3399	<i>P_{T7}-6xHis-CtTED1(35-538)</i> <i>kanR, lacI</i>	Restriktion von BHUM3398 mit NdeI, NotI und Ligation in geschnittenen und pET28a(+)-Vektor (Diese Arbeit)
BHUM3406	<i>P_(CDC1)-CDC1-T_(CDC1)</i> <i>ampR, URA, CEN6*, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CDC1</i> Gens aus YHUM0466 mit Primern HR Set 1 und <i>in vivo</i> Ligation in pTF27 (Diese Arbeit)
BHUM3407	<i>P_(CDC1)-CDC1-T_(CDC1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CDC1</i> Gens aus YHUM0466 mit Primern HR Set 1 und <i>in vivo</i> Ligation in pRS315 (Diese Arbeit)
BHUM3408	<i>P_(TED1)-TED1-T_(TED1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CDC1</i> Gens aus YHUM0466 mit Primern HR Set 2 und <i>in vivo</i> Ligation in pRS315 (Diese Arbeit)
BHUM3414	<i>P_(TED1)-ScTED1(1-30)-CtTED1(35-544)-ScTED1(452-474)-T_(TED1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>TED1</i> Genabschnitts AS35-544 aus <i>C. thermophilum</i> cDNA mit Primern HR Set 5 und <i>in vivo</i> Ligation in pRS315 (Bachelorarbeit Amon Nemeth)
BHUM3486	<i>P_(CDC1)-CDC1^{D314A D315A H316A}-T_(CDC1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 1 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3487	<i>P_(CDC1)-CDC1^{D144A}-T_(CDC1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 2 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3488	<i>P_(CDC1)-CDC1^{H287A}-T_(CDC1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 3 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3489	<i>P_(CDC1)-CDC1^{Q97A}-T_(CDC1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 4 (Diese Arbeit)
BHUM3490	<i>P_(CDC1)-CDC1^{N151A}-T_(CDC1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 5 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3491	<i>P_(CDC1)-CDC1^{E279A}-T_{(CDC1)Set2}</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 6 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3492	<i>P_(CDC1)-CDC1^{C271A}-T_(CDC1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 7 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3493	<i>P_(CDC1)-CDC1^{C319A}-T_(CDC1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 8 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3494	<i>P_(CDC1)-CDC1^{C73A}-T_(CDC1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 9 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3495	<i>P_(CDC1)-CDC1^{C383A}-T_(CDC1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 10 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)

Name (Alias)	Relevanter Genotyp	Herstellung und Referenz
BHUM3496	$P_{(CDC1)}-CDC1^{M346A\ G347A\ I348A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 11 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3497	$P_{(CDC1)}-CDC1^{D100A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 12 (Diese Arbeit)
BHUM3498	$P_{(CDC1)}-CDC1^{S103A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 13 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3499	$P_{(CDC1)}-CDC1^{N345A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 14 (Diese Arbeit)
BHUM3500	$P_{(CDC1)}-CDC1^{D317A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 15 (Diese Arbeit)
BHUM3501	$P_{(CDC1)}-CDC1^{H318A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 16 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3502	$P_{(CDC1)}-CDC1^{D146A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 18 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3503	$P_{(CDC1)}-CDC1^{R150A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 19 (Diese Arbeit)
BHUM3504	$P_{(CDC1)}-CDC1^{S227A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 20 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3505	$P_{(CDC1)}-CDC1^{Y289A\ Q290A\ T291A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 21 (Diese Arbeit)
BHUM3506	$P_{(CDC1)}-CDC1^{R264A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 22 (Diese Arbeit)
BHUM3507	$P_{(CDC1)}-CDC1^{Y289A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 23 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3508	$P_{(CDC1)}-CDC1^{Q290A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 24 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3509	$P_{(CDC1)}-CDC1^{H323A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 25 (Diese Arbeit)
BHUM3510	$P_{(CDC1)}-ScCDC1(1-60)-CtCDC1(107-529)-ScCDC1(392-491)-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CtCDC1</i> Genabschnitts AS107-529 aus BHUM3512 mit Primern HR Set 3 und <i>in vivo</i> Ligation in pRS315 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3511	$P_{(CDC1)}-CtCDC1-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CtCDC1</i> ORF aus BHUM3512 mit Primern HR Set 4 und <i>in vivo</i> Ligation in pRS315 (Bachelorarbeit Lara Hollmann)
BHUM3512	<i>CtCDC1</i> <i>ampR</i>	(Codon optimiert für Expression <i>S. cerevisiae</i>) (GeneART)
BHUM3513	$P_{(CDC1)}-CDC1^{S357A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 18 (Diese Arbeit)
BHUM3685	$P_{(TED1)}-TED1^{D133A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 40 (Bachelorarbeit Clara Schilling)

Name (Alias)	Relevanter Genotyp	Herstellung und Referenz
BHUM3687	$P_{(TED1)}-TED1^{D235A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 41 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3688	$P_{(TED1)}-TED1^{H379A D380A H381A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 42 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3689	$P_{(TED1)}-TED1^{M417A G418A E419A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 43 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3691	$P_{(TED1)}-TED1^{H234A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 44 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3693	$P_{(TED1)}-TED1^{H315A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 45 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3694	$P_{(TED1)}-TED1^{C384A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 47 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3696	$P_{(TED1)}-TED1^{C35A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 48 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3697	$P_{(TED1)}-TED1^{L103A Y106A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 51 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3698	$P_{(TED1)}-TED1^{M131A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 52 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3699	$P_{(TED1)}-TED1^{F157Y}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 54 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3701	$P_{(TED1)}-TED1^{E410G T412S}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 55 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3702	$P_{(TED1)}-TED1^{E410A T412A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 56 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3703	$P_{(TED1)}-TED1^{M417E E419S}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 57 (Bachelorarbeit Clara Schilling)
BHUM3704	$P_{(CDC1)}-CDC1(1-60)-CDC1^{MORF}(61-391)-CDC1(392-491)-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CDC1^{MORF}</i> Genabschnitts AS61-391 aus BHUM3733 mit Primern HR Set 9 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3407 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3706	$P_{(CDC1)}-CDC1^{MORF}(1-60)-CDC1(61-391)-CDC1^{MORF}(392-491)-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CDC1</i> Genabschnitts AS61-391 aus BHUM3407 mit Primern HR Set 8 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3733 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3720	$P_{(CDC1)}-CDC1^{MORF}(1-60)-CDC1^{(F93S)}(61-391)-CDC1^{MORF}(392-491)-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 27 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3721	$P_{(CDC1)}-CDC1^{MORF}(1-60)-CDC1^{(R107G Q109L N112K F114S R116G V117A)}(61-391)-CDC1^{MORF}(392-491)-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 28 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3722	$P_{(CDC1)}-CDC1^{MORF}(1-60)-CDC1^{(D135E)}$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und

Name (Alias)	Relevanter Genotyp	Herstellung und Referenz
	$(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Primern QC Set 29 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3723	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(1-60)\text{-CDCI}^{(\text{L142Q})}$ $(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 30 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3724	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(1-60)\text{-CDCI}^{(\text{N151D})}$ $(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 31 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3725	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(1-60)\text{-CDCI}^{(\text{N165D}_{\text{F168Y L173P}})}$ $(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 32 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3726	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(1-60)\text{-CDCI}^{(\text{P251S}_{\text{P253L}})}$ $(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 33 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3727	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(1-60)\text{-CDCI}^{(\text{Q268L})}$ $(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 34 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3728	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(1-60)\text{-CDCI}^{(\text{E276D}_{\text{K278R}})}$ $(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 35 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3729	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(1-60)\text{-CDCI}^{(\text{D296E}_{\text{Q299L}})}$ $(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 36 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3730	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(1-60)\text{-CDCI}^{(\text{E336G}_{\text{T338S}})}$ $(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 37 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3731	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(1-60)\text{-CDCI}^{(\text{M346E}_{\text{I348S}})}$ $(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 38 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3732	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(1-60)\text{-CDCI}^{(\text{K390E})}$ $(61-391)\text{-CDCI}^{\text{MORF}}(392-491)\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3706 und Primern QC Set 39 (Masterarbeit Isabella Reitmeier)
BHUM3733	$P_{(\text{CDCI})}\text{-CDCI}^{\text{MORF}}\text{-}T_{(\text{CDCI})}$ * <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Durch <i>in vitro</i> Evolution hergestellte Mutante (siehe Abschnitt 4.2.4); Mehrere <i>Error Prone</i> PCRs mit den

Name (Alias)	Relevanter Genotyp	Herstellung und Referenz
		Primern P3 und P4 wurden durchgeführt und das PCR Produkt mittels <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3407 kloniert (Diese Arbeit)
BHUM3734	$P_{(CDCI)}-CDCI(1-60)-TED1(31-447)-CDCI(392-491)-T_{(CDCI)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>TEDI</i> Genabschnitts AS31-447 aus BHUM3408 mit Primern HR Set 7 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3407 (Diese Arbeit)
BHUM3735	$P_{(TED1)}-TED1(1-60)-CDCI(61-391)-TED1(462-474)-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CDCI</i> Genabschnitts AS61-391 aus BHUM3407 mit Primern HR Set 6 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3408 (Diese Arbeit)
BHUM3736	$P_{(TED1)}-TED1(1-60)-CDCI^{MORF}(61-391)-TED1(462-474)-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CDCI^{MORF}</i> Genabschnitts AS61-391 aus BHUM3733 mit Primern HR Set 6 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3408 (Diese Arbeit)
BHUM3737	$P_{(CDCI)}-CDCI-T_{(CDCI)}$ <i>ampR, URA3</i>	Restriktion des <i>CDCI</i> Gens aus BHUM3407 mit HindIII, NotI und Ligation in pRS306 (Diese Arbeit)
BHUM3738	$P_{(CDCI)}-CDCI-T_{(CDCI)}$ <i>ampR, URA3, CEN6, ARSH4</i>	Restriktion des <i>CDCI</i> Gens aus BHUM3407 mit HindIII, NotI und Ligation in pRS316 (Diese Arbeit)
BHUM3739	$P_{(CDCI)}-CDCI-T_{(CDCI)}$ <i>ampR, URA, 2μm</i>	Restriktion des <i>CDCI</i> Gens aus BHUM3407 mit HindIII, NotI und Ligation in pRS426 (Diese Arbeit)
BHUM3899	<i>6xHIS-GST-TEV-ScCDCI</i> <i>kanR, pUCori</i>	<i>ScCDCI(72-388)</i> wurde aus BHUM3391 mit Primer K Set 1 amplifiziert, in pJET 1.2 kloniert und anschließend mit PciI, XhoI ausgeschnitten; Fragment wurde über kompatible Enden in NcoI, XhoI geschnittenen pETM30 Vektor ligiert (Diese Arbeit)
BHUM3900	<i>NUSA-6xHIS-TEV-ScCDCI</i> <i>KanR, pUCori</i>	<i>ScCDCI(72-388)</i> wurde aus BHUM3391 mit Primer K Set 1 amplifiziert, in pJET 1.2 kloniert und anschließend mit PciI, XhoI ausgeschnitten; Fragment wurde über kompatible Enden in NcoI, XhoI geschnittenen pETM60 Vektor ligiert (Diese Arbeit)
BHUM3901	<i>6xHIS-GST-TEV-CtCDCI</i> <i>kanR, pUCori</i>	<i>CtCDCI(108-530)</i> wurde aus BHUM3393 mit Primer K Set 4 amplifiziert, in pJET 1.2 kloniert und anschließend mit PciI, XhoI ausgeschnitten; Fragment wurde über kompatible Enden in NcoI, XhoI geschnittenen pETM30 Vektor ligiert (Diese Arbeit)
BHUM3902	<i>NUSA-6xHIS-TEV-CtCDCI</i> <i>KanR, pUCori</i>	<i>CtCDCI(108-530)</i> wurde aus BHUM3393 mit Primer K Set 4 amplifiziert, in pJET 1.2 kloniert und anschließend mit PciI, XhoI ausgeschnitten; Fragment wurde über kompatible Enden in NcoI, XhoI geschnittenen pETM60 Vektor ligiert (Diese Arbeit)
BHUM3903	<i>6xHIS-GST-TEV-ScTEDI</i> <i>kanR, pUCori</i>	<i>ScTEDI(31-447)</i> wurde aus BHUM3395 mit Primer K Set 2 amplifiziert, in pJET 1.2 kloniert und anschließend mit NcoI, XhoI ausgeschnitten und in den geschnittenen pETM30 Vektor ligiert (Diese Arbeit)

Name (Alias)	Relevanter Genotyp	Herstellung und Referenz
BHUM3904	<i>NUSA-6xHIS-TEV-ScTED1</i> <i>KanR, pUCori</i>	<i>ScTED1</i> (31-447) wurde aus BHUM3395 mit Primer K Set 2 amplifiziert, in pJET 1.2 kloniert und anschließend mit NcoI, XhoI ausgeschnitten und in den geschnittenen pETM60 Vektor ligiert (Diese Arbeit)
BHUM3905	<i>6xHIS-GST-TEV-CtTED1</i> <i>kanR, pUCori</i>	<i>CtTED1</i> (35-538) wurde aus BHUM3397 mit Primer K Set 3 amplifiziert, in pJET 1.2 kloniert und anschließend mit NcoI, XhoI ausgeschnitten und in den geschnittenen pETM30 Vektor ligiert (Diese Arbeit)
BHUM3906	<i>NUSA-6xHIS-TEV-CtTED1</i> <i>KanR, pUCori</i>	<i>CtTED1</i> (35-538) wurde aus BHUM3397 mit Primer K Set 3 amplifiziert, in pJET 1.2 kloniert und anschließend mit NcoI, XhoI ausgeschnitten und in den geschnittenen pETM60 Vektor ligiert (Diese Arbeit)
BHUM3914	<i>P_(TED1)-TED1-T_(TED1)</i> <i>ampR, URA, CEN6*, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>TED1</i> Gens aus BHUM3408 mit Primern HR Set 2 und <i>in vivo</i> Ligation in pTF27 (Diese Arbeit)
BHUM3918	<i>P_(DCR2)-DCR2-T_(DCR2)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>DCR2</i> Gens aus YHUM0464 mit Primern HR Set 10 und <i>in vivo</i> Ligation in pRS315 (Diese Arbeit)
BHUM3920	<i>P_(DCR2)-DCR2^{H444A}-T_(DCR2)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 59 (Diese Arbeit)
BHUM3921	<i>P_(DCR2)-DCR2^{H498A D499A H500A}-T_(DCR2)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 60 (Diese Arbeit)
BHUM3922	<i>P_(DCR2)-DCR2^{D499A}-T_(DCR2)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 62 (Diese Arbeit)
BHUM3923	<i>P_(DCR2)-DCR2^{T300A}-T_(DCR2)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 64 (Diese Arbeit)
BHUM3924	<i>P_(DCR2)-DCR2^{K435A}-T_(DCR2)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 65 (Diese Arbeit)
BHUM3925	<i>P_(DCR2)-DCR2^{R118A W119A F120A}-T_(DCR2)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 67 (Diese Arbeit)
BHUM3926	<i>P_(DCR2)-DCR2^{M468A K470A}-T_(DCR2)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 68 (Diese Arbeit)
BHUM3927	<i>P_(TED1)-TED1^{D327A}-T_(TED1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 107 (Diese Arbeit)
BHUM3928	<i>P_(TED1)-TED1^{D104A D109A}-T_(TED1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 108 (Diese Arbeit)
BHUM3929	<i>P_(TED1)-TED1^{Q89A}-T_(TED1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 69 (Diese Arbeit)
BHUM3930	<i>P_(TED1)-TED1^{E382A}-T_(TED1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 70 (Diese Arbeit)
BHUM3931	<i>P_(TED1)-TED1^{G92D}-T_(TED1)</i> <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 71 (Diese Arbeit)
BHUM3934	<i>P_(CDC1)-CDC1^{D147A}-T_(CDC1)</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und

Name (Alias)	Relevanter Genotyp	Herstellung und Referenz
	<i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Primern QC Set 73 (Diese Arbeit)
BHUM3935	$P_{(CDC1)}-CDC1^{R275A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 74 (Diese Arbeit)
BHUM3936	$P_{(CDC1)}-CDC1^{Q284A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 75 (Diese Arbeit)
BHUM3937	$P_{(CDC1)}-CDC1^{E101A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 76 (Diese Arbeit)
BHUM3938	$P_{(CDC1)}-CDC1^{M99A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 78 (Diese Arbeit)
BHUM3939	$P_{(DCR2)}-CDC1^{F114A}-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 79 (Diese Arbeit)
BHUM3940	$P_{(DCR2)}-DCR2^{D302A}-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 58 (Diese Arbeit)
BHUM3941	$P_{(DCR2)}-DCR2^{H257A}-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 61 (Diese Arbeit)
BHUM3942	$P_{(DCR2)}-DCR2^{N502A}-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 63 (Diese Arbeit)
BHUM3943	$P_{(DCR2)}-DCR2^{R80A F81A Y82A}-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 66 (Diese Arbeit)
BHUM3944	$P_{(CDC1)}-CDC1^{Q288A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 72 (Diese Arbeit)
BHUM3945	$P_{(CDC1)}-CDC1^{P280A F281A P282A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 77 (Diese Arbeit)
BHUM3955	$P_{(DCR2)}-DCR2-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, URA, CEN6*, ARSH4</i>	Restriktion des <i>DCR2</i> Gens aus BHUM3918 mit Sall, NotI und Ligation in pTF27 (Diese Arbeit)
BHUM3956	$P_{(DCR2)}-DCR2-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, URA, CEN6, ARSH4</i>	Restriktion des <i>DCR2</i> Gens aus BHUM3918 mit Sall, NotI und Ligation in pRS316 (Diese Arbeit)
BHUM3957	$P_{(DCR2)}-DCR2-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, URA, 2μm</i>	Restriktion des <i>DCR2</i> Gens aus BHUM3918 mit Sall, NotI und Ligation in pRS426 (Diese Arbeit)
BHUM3958	$P_{(TED1)}-TED1-T_{(TED1)}$ <i>ampR, URA, CEN6, ARSH4</i>	Restriktion des <i>TED1</i> Gens aus BHUM3408 mit Sall, NotI und Ligation in pRS316 (Diese Arbeit)
BHUM3959	$P_{(TED1)}-TED1-T_{(TED1)}$ <i>ampR, URA, 2μm</i>	Restriktion des <i>TED1</i> Gens aus BHUM3408 mit Sall, NotI und Ligation in pRS426 (Diese Arbeit)
BHUM3960	$P_{(DCR2)}-DCR2(1-245)-CDC1(87-387)-DCR2(557-578)-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CDC1</i> Genabschnitts AS87-387 aus BHUM3407 mit Primern HR Set 11 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3918 (Diese Arbeit)
BHUM3961	$P_{(TED1)}-TED1(1-76)-CDC1(87-387)-TED1(449-471)-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>CDC1</i> Genabschnitts AS87-387 aus BHUM3407 mit Primern HR Set 13 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3408 (Diese Arbeit)
BHUM3962	$P_{(DCR2)}-DCR2(1-245)-TED1(77-448)-DCR2(557-578)-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Amplifikation des <i>TED1</i> Genabschnitts AS77-448 aus BHUM3408 mit Primern HR Set 12 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3918 (Diese Arbeit)

Name (Alias)	Relevanter Genotyp	Herstellung und Referenz
BHUM3963	$P_{(CDC1)}-CDC1(1-86)-TED1(77-448)-$ $CDC1(388-491)-T_{(CDC1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Amplifikation des <i>TED1</i> Genabschnitts AS77-448 aus BHUM3408 mit Primern HR Set 15 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3407 (Diese Arbeit)
BHUM3964	$P_{(TED1)}-TED1(1-76)-DCR2(246-$ $556)-TED1(449-471)-T_{(TED1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Amplifikation des <i>DCR2</i> Genabschnitts AS246-556 aus BHUM3918 mit Primern HR Set 14 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3408 (Diese Arbeit)
BHUM3965	$P_{(CDC1)}-CDC1(1-86)-DCR2(246-$ $556)-CDC1(388-491)-T_{(CDC1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Amplifikation des <i>DCR2</i> Genabschnitts AS246-556 aus BHUM3918 mit Primern HR Set 16 und <i>in vivo</i> Ligation in BHUM3407 (Diese Arbeit)
BHUM3966	$P_{(CDC1)}-CDC1^{F93A}-T_{(CDC1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 80 (Diese Arbeit)
BHUM3967	$P_{(CDC1)}-CDC1^{L142A}-T_{(CDC1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 81 (Diese Arbeit)
BHUM3968	$P_{(CDC1)}-CDC1^{H184A}-T_{(CDC1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 82 (Diese Arbeit)
BHUM3969	$P_{(CDC1)}-CDC1^{D185A}-T_{(CDC1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 83 (Diese Arbeit)
BHUM3970	$P_{(CDC1)}-CDC1^{D315A}-T_{(CDC1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 84 (Diese Arbeit)
BHUM3971	$P_{(TED1)}-TED1^{F85S}-T_{(TED1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 86 (Diese Arbeit)
BHUM3972	$P_{(TED1)}-TED1^{M131Q}-T_{(TED1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 53 (Diese Arbeit)
BHUM3973	$P_{(TED1)}-TED1^{I140S}-T_{(TED1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 88 (Diese Arbeit)
BHUM3974	$P_{(TED1)}-TED1^{K320A}-T_{(TED1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 89 (Diese Arbeit)
BHUM3975	$P_{(TED1)}-TED1^{R349A}-T_{(TED1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 90 (Diese Arbeit)
BHUM3976	$P_{(TED1)}-TED1^{D380A}-T_{(TED1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 91 (Diese Arbeit)
BHUM3977	$P_{(TED1)}-TED1^{M416A}-T_{(TED1)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 92 (Diese Arbeit)
BHUM3978	$P_{(DCR2)}-DCR2^{L253A}-T_{(DCR2)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 93 (Diese Arbeit)
BHUM3979	$P_{(DCR2)}-DCR2^{L253S}-T_{(DCR2)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 94 (Diese Arbeit)
BHUM3981	$P_{(DCR2)}-DCR2^{S309A}-T_{(DCR2)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 96 (Diese Arbeit)
BHUM3982	$P_{(DCR2)}-DCR2^{S309I}-T_{(DCR2)}$ $ampR, LEU2, CEN6, ARSH4$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 97 (Diese Arbeit)
BHUM3983	$P_{(DCR2)}-DCR2^{H338A}-T_{(DCR2)}$	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und

Name (Alias)	Relevanter Genotyp	Herstellung und Referenz
	<i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Primern QC Set 98 (Diese Arbeit)
BHUM3984	$P_{(DCR2)}-DCR2^{D339A}-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 99 (Diese Arbeit)
BHUM3985	$P_{(DCR2)}-DCR2^{E449A}-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 100 (Diese Arbeit)
BHUM3986	$P_{(DCR2)}-DCR2^{M468A}-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 101 (Diese Arbeit)
BHUM3987	$P_{(DCR2)}-DCR2^{G526M}-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 102 (Diese Arbeit)
BHUM3988	$P_{(DCR2)}-DCR2^{G526N}-T_{(DCR2)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3918 und Primern QC Set 103 (Diese Arbeit)
BHUM3990	$P_{(TED1)}-TED1^{C445A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 49 (Diese Arbeit)
BHUM3991	$P_{(TED1)}-TED1^{C325A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 46 (Diese Arbeit)
BHUM3992	$P_{CDC1}-ScCDC1(1-60)-CtCD-CI^{A443N}(107-529)-ScCDC1(392-491)-T_{CDC1}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3510 und Primern QC Set 107 (Diese Arbeit)
BHUM3993	$P_{CDC1}-CtCDC1^{A498N}-T_{CDC1}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3511 und Primern QC Set 107 (Diese Arbeit)
BHUM4033	$P_{(TED1)}-TED1^{F85A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 85 (Diese Arbeit)
BHUM4034	$P_{(TED1)}-TED1^{I140A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3408 und Primern QC Set 87 (Diese Arbeit)
BHUM4035	$P_{(CDC1)}-CDC1^{H259A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 104 (Diese Arbeit)
BHUM4036	$P_{(CDC1)}-CDC1^{P251A P253A}-T_{(CDC1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 105 (Diese Arbeit)
BHUM4037	$P_{(TED1)}-TED1^{N307A S309A}-T_{(TED1)}$ <i>ampR, LEU2, CEN6, ARSH4</i>	Ortsspezifische Mutagenese mit BHUM3407 und Primern QC Set 106 (Diese Arbeit)

4.2.4 Cdc1^{MORF}

**CDC1^{MORF}* (*CDC1 mutated open reading frame*) ist eine Cdc1-Variante, die mittels zufälliger Mutagenese erzeugt wurde (siehe Seite 122 f) und folgende Mutationen enthält:

Tab. 12: Mutationen in *CDC1^{MORF}*

Basenaustausch	Aminosäure	Basenaustausch	Aminosäure
A3756=C	H23=P	A4516=C	E276=D

Basenaustausch	Aminosäure	Basenaustausch	Aminosäure
A3812=G	I42=V	A4521=G	K278=R
T3966=C	F93=S	A4525=G	still
A4007=G	R107=G	T4528=C	still
A4014=T	Q109=L	T4576=G	D296=E
T4024=A	N112=K	A4584=T	Q299=L
T4029=C	F114=S	A4585=G	still
A4034=G	R116=G	T4633=C	still
T4038=C	V117=A	T4652=A	S322=T
G4059=A	R124=K	A4695=G; A4696=G	E336=G
T4093=A	D135=E	A4700=T	T338=S
T4113=A	L142=Q	A4724=G; T4725=A	M346=E
A4139=G	N151=D	A4730=T; T4731=C	I348=S
A4181=G	N165=D	A4846=T	still
A4186=G	still	A4856=G	K390=E
T4191=A	F168=Y	A4868=G	M394=V
T4206=C; G4207=C	L173=P	C4992=T	T435=I
C4439=T	P251=S	G5002=A	still
C4446=T	P253=L	A5054=G	S456=G
T4457=C	still	T5095=C	still
T4462=C	still	T5123=C	S479=P
A4491=T	Q268=L	T5160=G	still
A4495=G	still	A5229=T	still

4.3 Chemikalien, Puffer und Nährmedien

Chemikalien wurden von der Carl Roth GmbH & Co. KG bezogen. Falls nicht anders angegeben wurden die Puffer in destilliertem Wasser angesetzt.

Tab. 13: Verwendete Puffer

Name	Zusammensetzung		Verwendung
ECL-Lösung	100 mM 2,5 mM 0,45 mM 5,4 mM	Tris-HCl (pH 8,8) Luminol Paracoumarsäure H ₂ O ₂	Immunodetektion (Western Blot)
Harnstoffpuffer (HU-Puffer)	8 M 200 mM	Harnstoff Natriumphosphatpuffer	Denaturierung von Prote- inproben

Name	Zusammensetzung		Verwendung
	0,1 mM 5 % (w/v) 0,03 % 1,5 % (w/v)	EDTA (pH 8,0) SDS Bromphenolblau DTT (frisch hinzufügen)	
AM-Puffer (pH 8,0 bei 4°C) in MilliQ-H ₂ O	20-100 mM 200 mM	Tris/HCl NaCl	Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>
Blotting-Puffer	125 mM 960 mM 20 %	Tris Glycin Methanol	Western Blot
Coomassie Färbelösung	50 % (v/v) 5 % (v/v) 0,1 % (w/v) 0,1 % (w/v)	Ethanol (100 %ig, p.a.) Essigsäure Coomassie Brilliant Blue G250 Coomassie Brilliant Blue R250	Anfärbung von SDS-Ge- len
DNA-Färbepuffer (6x)	10 mM 60 % (v/v) 0,03 % (w/v) 0,03 % (w/v) 0,015 % (w/v) 60 mM	Tris/HCl (pH 7,6) Glycerin Bromphenolblau Xylencyanoblau Orange G EDTA (pH 8,0)	
Entfärbelösung	50 % (v/v) 5 % (v/v)	Ethanol (100 %ig, p.a.) Essigsäure	Entfärbung von SDS-Ge- len (Coomassie)
LiOAc-Puffer	100 mM 1 %	LiOAc SDS	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>
LiPEG-Puffer	100 mM 10 mM 1 mM 40 % (w/v)	LiOAc Tris/HCl (pH 8,0) EDTA (pH 8,0) PEG 4000	Transformation von Plas- miden in <i>S. cerevisiae</i>
LiSORB-Puffer (pH 8,0)	1 M 100 mM 10 mM 1 mM	Sorbitol Li-Acetat Tris/HCl (pH 8,0) EDTA (pH 8,0)	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> und Trans- formation von Plasmiden in <i>S. cerevisiae</i>
Lösung 3	5 M 2 M	KOAc Essigsäure	Fällung von DNA mit Ethanol
PMSF-Stock	100 mM	PMSF in Isopropanol	Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> Herstellung von Zellwan- dextrakten
RF1-Puffer (pH 5,8)	100 mM 50 mM 30 mM 10 mM 15 % (v/v)	RbCl MnCl ₂ KAc (pH 7,5) CaCl ₂ Glycerin	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>

Material

Name	Zusammensetzung		Verwendung
RF2 Puffer	10 mM 10 mM 75 mM 15 % (v/v)	RbCl MOPS CaCl ₂ Glycerin	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>
SDS-Elektrophorese Puffer	250 mM 2 M 1 %	Tris Glycin SDS	SDS-PAGE
SDS Protein-Extraktions-puffer (pH 7,8)	50 mM 2 % 100 mM 150 mM 0,8 %	Tris/HCl SDS EDTA NaCl β-MercaptoEtOH(frisch hinzufügen)	Extraktion von Zellwänden aus <i>S. cerevisiae</i>
SM-Puffer (10x)	200 mM 100 mM 100 mM 1 % (v/v) 0,015 mM BSA 40 mM	Tris/HCl (pH 8,8) (NH ₄) ₂ SO ₄ KCl Triton X-100 BSA MgSO ₄	PCR
SS-DNA	1 % (w/v)	SS DNA	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i>
TAE-Puffer (pH 7,6)	40 mM 20 mM 2 mM	Tris-Acetat Na-Acetat EDTA (pH8,0)	DNA Elektrophorese
TBS(-T)	200 mM 1 M (1 %	Na ₂ PO ₄ (pH 7,1) NaCl Tween20)	Western Blot

Die Angaben für die verwendeten Nährmedien bezieht sich auf das Verhältnis Gewicht pro eingesetztem Volumen (w/v). Für feste Medium wurden zudem 2 % (w/v) Agar hinzugefügt. Für den verwendeten Aminosäurenmix wurden 2 g aller Standardaminosäuren vermischt. Es wurden 0,5 g Adenin und 0,2 g Para-Aminobenzolsäure sowie 2 g Myo-Inositol hinzugegeben.

Tab. 14: Verwendete Nährmedien

Name	Zusammensetzung	Verwendung
5-FOA	0,67 % 0,2 % 2 % 0,1 % 0,005 % Yeast Nitrogen Base Aminosäurenmix Glukose 5-FOA Uracil	Selektion gegen <i>URA3</i> in <i>S. cerevisiae</i>
GNA	5 % 3 % 1 % Glukose Difco Nutrient Broth Hefeextrakt	Vollmedium zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> direkt vor der Sporulation
LB (Luria/Miller)	0,5 % 1 % 1 % Hefeextrakt Trypton NaCl	Kultivierung von <i>E. coli</i>
NGS	1 % 0,05 % KoAc Aminosäurenmix	Sporulationsmedium für <i>S. cerevisiae</i>
SC (Synthetic complete)	0,15 % 0,5 % 0,2 % 2 % Yeast Nitrogen Base Ammoniumsulfat Aminosäurenmix (- Leu und/ oder - Ura) Glukose	Selektionsmedium zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>
YPD (Yeastextract, Peptone, Dextrose)	1 % 2 % 2 % Hefeextrakt Pepton aus Fleischextrakt Glukose	Vollmedium zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>

4.4 Antikörper, Stressoren und Antibiotika

Für die Immunodetektion von Proteinen wurden folgende Antikörper verwendet:

Tab. 15: Antikörper

Name	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus α PolyHistidin	1:3000	(Sigma Aldrich Chemie GmbH)
Ziege α Maus (Peroxidase Label)	1:2000	(Dianova GmbH)

Folgende Antibiotika wurden zur Selektion von *E. coli* und *S. cerevisiae* verwendet:

Tab. 16: Antibiotika

Name	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin (Selektionsmarker <i>E. coli</i>)	100 mg/ml	100 μ g/ml
CloNat (Selektionsmarker <i>S. cerevisiae</i>)	200 mg/ml	100 μ g/ml
G417 (Selektionsmarker <i>S. cerevisiae</i>)	200 mg/ml	200 μ g/ml
HygromycinB (Selektionsmarker <i>S. cerevisiae</i>)	500 mg/ml	300 μ g/ml
Kanamycin (Selektionsmarker <i>E. coli</i>)	35 mg/ml	35 μ g/ml

Die Stressoren zur phänotypischen Analyse von *S. cerevisiae* in Fest- und Flüssigmedium wurden in folgenden Stamm- und Endkonzentrationen eingesetzt:

Tab. 17: Verwendete Stressoren für die phänotypische Analyse von *S. cerevisiae*

Name	Stammkonzentration	Verwendungskonzentration
Calcoflourweiß	25 %ige Lösung	0,1 %
Caspofungin	5 mg/ml	1,4-4,8 µg/ml
Koffein	15 mg/ml	1,5 µg/ml
Kongorot	25 mg/ml (in	100-700 µg/ml
SDS	1 %ig	0,005-0,01 %ig
Trypanblau	1 mg/ml	5-15 µg/ml
Zinksulfat-Heptahydrat	1 M	6-12 mM

4.5 Enzyme und Kits

In dieser Arbeit wurden für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* und *S. cerevisiae* das NucleoSpin®-Plasmid-Kit der *Macherey und Nagel GmbH und Co. KG* verwendet. Für Extraktionen von DNA aus Agarosegelen wurde das E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit von *Omega Bio-Tek Inc.* verwendet.

4.6 Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgende Software und eine Reihe von Datenbanken und Online Tools verwendet.

Tab. 18: Verwendete Software

Name	Verwendung und Bezugsquelle
Libre Office Calc	Auswertung von Daten, Libre Office The Document Foundation, https://de.libreoffice.org/
GIMP	Fotobearbeitung; https://www.gimp.org/
Inkscape	Erstellung von Abbildungen und Vektorgrafiken; https://inkscape.org/de/
Clone Manager	<i>In silico</i> Klonierung; Scientific & Educational Software
Sequencher	Auswertung von Sequenzierungen; Gene Codes Corporation
Jalview	Herstellung von Proteinalignments und phylogenetischen Bäumen, (Waterhouse <i>et al.</i> 2009)
PyMOL	Darstellung von Proteinmodellen und Generierung von Modellgrafiken; The PyMOL Graphics System

Chimera	Herstellung eines Cdc1 ^{MORF} Modells mittels Rotamer Funktion
Quantity One	Visualisierung von GelRed® gefärbter DNA in Agarosegelen; Bio-Rad Laboratories GmbH
Intas Chemostar	Intas Science Imaging Instruments GmbH

Tab. 19: Verwendete Datenbanken und Internetseiten

Name	Link und Referenz
iTOL	https://itol.embl.de/ (Letunic & Bork 2021)
Uniprot	https://www.uniprot.org/ (UniProt 2023)
Interpro	https://www.ebi.ac.uk/interpro/ (Paysan-Lafosse <i>et al.</i> 2023)
SGD	https://www.yeastgenome.org/ (Cherry <i>et al.</i> 2012; Engel <i>et al.</i> 2014)
ClustalOmega	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/ (Sievers <i>et al.</i> 2011)
DeepLoc1.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-1.0/ (Almagro Armenteros <i>et al.</i> 2017)
PSIPRED	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/ (Jones 1999; Jones & Cozzetto 2015; Buchan & Jones 2019)

5. Methoden

5.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Mikroorganismen

5.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* Stämmen wurde LB als Fest- oder Flüssigmedium mit entsprechenden Resistenzmarkern verwendet. Die Zellen wurden, falls nicht anders beschrieben, auf 37 °C inkubiert.

5.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* Stämmen erfolgte schüttelnd über Nacht in YPD-Vollmedium oder Sc- Selektionsmedium bei 30 °C. Auf Festmedium wurden die Stämme zwischen 2 und 10 Tagen bei 30 °C inkubiert.

5.1.2.1 Mating von *S. cerevisiae*

Um zwei Hefestämme zu kreuzen wurden diese auf festem YPD übereinander ausgestrichen und für 3 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden mithilfe eines sterilen Zahnstochers Zellen von der Agaroberfläche entnommen und in 200 µl sterilem Wasser aufgenommen. 20 µl der Zellsuspension wurden auf eine dünne YPD-Platte getropft. Anschließend wurden diploide Zellen mithilfe eines Mikromanipulators von den anderen Zellen separiert und für 2-3 Tage bei 30°C wachsen gelassen. Die Überprüfung auf Diploidie erfolgte mittels Mata/ α -PCR Test.

5.1.2.2 Sporulation und Tetraden Dissektion

Um einen diploiden Stamm zu sporulieren wurde dieser auf festes GNA-Vollmedium überstrichen und dann für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Stamm auf Sporulationsmedium (spo) übertragen und weitere 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Sporulation wurde mit einem Lichtmikroskop kontrolliert. Danach wurden mithilfe eines sterilen Zahnstochers *S. cerevisiae* Zellen entnommen und in 200 µl sterilem Wasser aufgenommen. Es wurden 20 µl Lytikase hinzugefügt, um den Ascus der *S. cerevisiae* Sporen zu verdauen. Die Zellen wurden für 1-2 h bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Danach wurden 20 µl des Ansatzes auf eine dünne YPD-Platte getropft. Tetraden wurden dann mithilfe eines Mikromanipulators voneinander getrennt abgelegt. Die Platte wurde für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert und das Wachstumsverhalten der Sporen untersucht.

5.1.3 Bestimmung der optischen Dichte

Zur Bestimmung der Zellzahl von Flüssigkulturen wurde die optische Dichte OD_{600nm} bestimmt. Zunächst wurde der Blindwert des Mediums ermittelt und von den Messwerten abgezogen. Von den Flüssigkulturen wurde eine 1:10-Verdünnung hergestellt. Die Kulturen wurden vor Messung der OD_{600nm} gemischt, um ein Absinken der Zellen zu verhindern. Für gemessene Werte $> 0,8$ wurden die Flüssigkulturen 1:20 mit Medium vermischt und erneut gemessen, um Messungenauigkeiten zu vermeiden.

5.1.4 Anlegen von Dauerkulturen zur langfristigen Lagerung

Zur langfristigen Lagerung von *E. coli* wurden Übernachtskulturen in 5 ml LB mit entsprechenden Antibiotika angezogen. 800 μ l der Kultur wurden mit 800 μ l 60 %iger Glycerinlösung gemischt und auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

S. cerevisiae wurde zur langfristigen Lagerung auf eine halbe Platte YPD übergestrichen und 2-3 Tage auf $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem sterilen Zahnstocher geerntet und in 1600 μ l steriler, 30 %iger Glycerinlösung resuspendiert. Die Suspension wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Herstellung von kompetenten Zellen und Transformationstechniken

5.2.1.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* nach (Mandel & Higa 1970)

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde eine Übernachtskultur in 5 ml LB Medium angesetzt. Die Zellen wurden am nächsten Tag in 200 ml frisches LB überimpft und schüttelnd bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu einer OD_{600nm} von 0,4 bis 0,6 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellsuspension in sterile 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 15 min bei 4.000 g geerntet und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde pro Reaktionsgefäß in 16 ml kaltem RF1-Puffer resuspendiert, erneut 15 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 4.000x g pelletiert.

Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Zellen in jeweils 4 ml RF2-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden in einem frischen Reaktionsgefäß vereinigt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in Aliquots à 100 μ l aufgeteilt und auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente *E. coli* wurde standardmäßig 1 µl Plasmid verwendet. Die Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und dann die Plasmid-DNA zugegeben. Die Zellen wurden zuerst für 15 min auf Eis inkubiert, dann folgte der Hitzeschock für 1 min bei 42 °C. Transformationen mit bakteriostatischen Antibiotika wie Ampicillin wurden anschließend sofort auf entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert. Bei Transformationen mit bakteriziden Antibiotika wie Kanamycin wurden die Zellen nach dem Hitzeschock in 800 µl LB aufgenommen und für 45 min bei 37 °C regeneriert. Danach wurden die Zellen für 3 min bei 8.000 g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl LB aufgenommen und auf entsprechende Selektionsmedien ausplattiert.

5.2.1.2 Herstellung kompetenten *E. coli* zur Elektroporation nach (Dower *et al.* 1988)

Zur Herstellung von kompetenten *E. coli* für die Elektroporation wurde eine 10 ml Übernachtskultur in LB Medium angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Kultur in 200 ml frischem LB verdünnt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,4 bis 0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden in sterile 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für 15 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 5.000x g geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zunächst mit 50 ml sterilem dH₂O gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschzyklen mit jeweils 30 ml sterilem dH₂O. Danach wurden die Zellen in 5 ml einer sterilen, 10 %igen Glycerinlösung aufgenommen und alle Ansätze in ein 50 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt. Die Zellen wurden erneut für 5 min bei 5.000x g geerntet und anschließend in 400 µl 10 %iger Glycerinlösung aufgenommen. Danach wurden die Zellen in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bis zur Verwendung auf -80°C gelagert.

Zur Elektroporation wurden die *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 8 µl zuvor aus *S. cerevisiae* Zellen präparierte DNA hinzugefügt und die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einer entsprechenden, leitfähigen Küvette bei 2,25 V. Danach wurden die Zellen in 800 µl LB Medium aufgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die Zellen für 15 min bei 37°C regenerieren konnten, wurden sie für 3 min bei 6.000 g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl LB aufgenommen und auf LB-Festmedium mit Ampicillin ausplattiert.

5.2.1.3 Herstellung und Transformation von kompetenten *S. cerevisiae* Zellen nach (Knop *et al.* 1999)

Zur Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Zellen wurden eine Übernachtskultur in 2 ml YPD oder Sc-Medium angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in 50 ml entsprechendem, frischen Me-

dium aufgenommen und etwa 4-5 Stunden bis zu einer OD_{600nm} von 1,0 wachsen gelassen. Die Zellen wurden für 3 min bei 500x g geerntet und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zunächst mit 20 ml sterilem dH_2O und danach mit 10 ml SORB-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 360 μ l SORB-Puffer aufgenommen und 60 μ l frisch aufgekochte SS-DNA hinzugefügt. Die Zellen wurden in Aliquots à 60 μ l aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung auf $-80^\circ C$ gelagert.

Zur Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae* wurden 8 μ l präpariertes Plasmid mit einer Konzentration von mindestens 200 ng/ μ l verwendet. Das Plasmid wurde den Zellen zugegeben. Anschließend wurden 300 μ l PEG-Puffer hinzugefügt und die Suspension gemischt. Die Zellen wurden für 30 min auf Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock für 15 min bei $42^\circ C$. Danach wurden die Zellen für 3 min bei 500 g pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 800 μ l YP gewaschen. Das Pellet wurde danach in 100 μ l YP aufgenommen und aus entsprechende Sc-Selektionsmedien ausplattiert. Die Transformanden wurden für 2-3 Tage bei $30^\circ C$ inkubiert. Bei Transformation von Gendelektionskassetten (Abschnitt 5.2.3.4) mit Antibiotika-Resistenzen wurden die Zellen nicht direkt auf Selektionsmedium ausplattiert, sondern nach der Transformation für 4 h bei $30^\circ C$ in YPD Medium regeneriert.

5.2.2 Isolierung von DNA

5.2.2.1 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* und *S. cerevisiae*

Zur Isolierung von Plasmiden wurde das Kit der Marke *Macherey und Nagel GmbH und Co. KG* NucleoSpin®-Plasmid-Kit verwendet. Es wurden 2 ml einer *E. coli* Übernachtskultur in LB Medium mit Ampicillin oder Kanamycin für 3 min bei 13.000x g geerntet. Anschließend wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

Für die Isolierung von Plasmiden aus *S. cerevisiae* im Zusammenhang mit der Klonierung mittels *in vivo* Ligation wurden alle Transformanden eines Ansatzes mithilfe eines sterilen Zahnstochers isoliert und in 300 μ l A1-Puffer mit Glasperlen versetzt. Die Zellen wurden für 10 min auf einem Multivortexer aufgebrochen. Es wurden anschließend 300 μ l A2-Puffer hinzugefügt, der Ansatz invertiert und die Zelllyse nach 5 min durch Zugabe von 350 μ l A3-Puffer gestoppt. Anschließend wurde nach Herstellerprotokoll verfahren. Die Plasmid DNA wurde in 20 μ l EB-Puffer eluiert.

5.2.2.2 Isolierung von genomischer DNA mittels LiOAc aus *S. cerevisiae* nach (Lööke *et al.* 2011)

Zur Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurde eine Zahnstocherspitzen-große Menge Zellen in 100 µl Lithiumacetatpuffer aufgenommen und für 15 min bei 70 °C lysiert. Anschließend wurden 300 µl 100%iger Ethanol (p.a.) hinzugefügt und gemischt. Die DNA wurde für 3 min bei 13.000 g pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die DNA mit 300 µl 70 %igem Ethanol (p.a.) gewaschen. Das Pellet wurde für 5 min getrocknet und danach in 100 µl dH₂O aufgenommen. Dann wurden verbliebene Zelltrümmer für 30 s bei 13.000 g pelletiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

5.2.3 Vervielfältigung von DNA nach (Peake 1989) und PCR-basierte Klonierung

Die Vervielfältigung von DNA zu Test- und Klonierungszwecken erfolgte mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR). Die Primer wurden stets mit einer Konzentration von 10 µM verwendet.

5.2.3.1 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Zur Amplifizierung spezifischer DNA Sequenzen wurde eine PCR durchgeführt. Standard-PCRs sind nach folgendem Programm verfahren:

	Menge [µl]	Programm	
SM-Puffer (10x)	5	98°C	5 min
Template DNA	1		
Primer fw	2	98°C	45 s
Primer rv	2	60°C	45 s 30x
dNTPs (10mM)	2	72°C	60 s/ 1 kb
5M Betaine	10		
Phusion-Polymerase	1	72°C	10 min
dH ₂ O	27		
Gesamt	50	8°C	∞

5.2.3.2 Ortsspezifische Mutagenese PCR nach (Weiner *et al.* 1994)

Für die Einführung ortsspezifischer Mutationen in Plasmiden wurde eine Quickchange PCR durchgeführt. Es wurden Primer verwendet, welche neben den mutierten Basen 15-20 flankierenden Basen an den Enden aufwiesen:

	Menge [μ l]	Programm	
SM-Puffer (10x)	10	98°C	5 min
Template DNA	2		
Primer fw	6,4	98°C	45 s
Primer rv	6,4	60°C	45 s
dNTPs (10mM)	4	72°C	30 s/ 1 kb
DMSO	3		
Phusion-Polymerase	2	72°C	10 min
dH ₂ O	66,2		
Gesamt	100	8°C	∞

} 20x

Die PCR-Produkte wurden mit Ethanol gefällt und die Template DNA der PCR in einem 20 μ l Ansatz für mindestens 2 h mit DpnI in Tango Puffer restriktiv verdaut. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* transformiert.

5.2.3.3 Colony Test-PCR mit *E. coli* (Bergkessel & Guthrie 2013)

Die *Colony PCR* ist eine schnelle Methode zur Verifizierung von *E. coli* Klonen mit gewünschtem Plasmid. Zur Durchführung wurde folgender PCR Ansatz verwendet:

	Menge [μ l]	Programm	
Taq-Puffer (10x)	2	94°C	5 min
Primer fw	0,5		
Primer rv	0,5	94°C	30 s
dNTPs (10mM)	0,5	52°C	40 s
Taq-Polymerase	0,2	68°C	50 s
dH ₂ O	16,3		
Template	1 Kolonie	68°C	5 min
Gesamt	20	8°C	∞

} 20x

Als Template für die PCR diente eine *E. coli* Kolonie, welche mit einem sterilen Zahnstocher von einer Transformationsplatte gepickt, auf eine frische Selektionsplatte übergestrichen und die restlichen Zellen anschließend im PCR-Reaktionsgefäß resuspendiert wurde.

5.2.3.4 Herstellung von *S. cerevisiae* Deletionskassetten mittels PCR und Integration in das Genom (Janke *et al.* 2004)

Zur Herstellung von Deletionskassetten für die chromosomale Integration in *S. cerevisiae* wurde eine Pym-PCR durchgeführt:

	Menge [μ l]	Programm		
SM-Puffer (10x)	5	98°C	10 min	
Template DNA	1			
Primer fw	6,5	98°C	45 s	} 10x
Primer rv	6,5	58°C	45 s	
dNTPs (10mM)	1	68°C	2 min	
Betain (5M)	20			
Phusion-Polymerase	2	98°C	45 s	} 20x
dH ₂ O	50,5	58°C	45 s	
Gesamt	50	68°C	2 min (+5 s/Zyklus)	
		8°C	∞	

Es wurde die 3-12 fache Menge der PCR angesetzt und diese anschließend mittels Gelelektrophorese verifiziert. Die PCR Produkte wurden zusammen geführt und mit Ethanol gefällt (Abschnitt 5.2.3.2). Anschließend wurde die DNA in kompetente *S. cerevisiae* transformiert (Abschnitt 5.2.1.3). Die Verifizierung von Klonen erfolgte mittels Test-PCR mit genomischer *S. cerevisiae* DNA.

5.2.3.5 Test-PCR mit genomischer *S. cerevisiae* DNA

Zum Test auf genomische Deletionen von *S. cerevisiae* wurde eine Test-PCR durchgeführt. Für jeweils drei Proben wurde folgender PCR-Ansatz hergestellt:

	Menge [μ l]	Programm		
Taq-Puffer (10x)	10	95°C	5 min	
Primer fw	10			
Primer rv	10	95°C	45 s	} 35x
dNTPs (10mM)	2	60°C	30 s	
Taq-Polymerase	0,7	68°C	2 min	
dH ₂ O	67,3			
Gesamt	100	8°C	∞	

Vom Gesamtvolumen wurden je 29 μ l entnommen und 1 μ l Template hinzugefügt. Als Template diente chromosomale DNA aus *S. cerevisiae*, welche zuvor mittels LiOAc-Methode isoliert wurde.

Alternativ wurde eine kleine Menge Hefezellen vor Zugabe des PCR-Mix in das Reaktionsgefäß überführt und für 30 sek bei maximaler Wattzahl in der Mikrowelle lysiert.

5.2.3.6 PCR basierte *in vitro* Evolution

5.2.3.7.1 Ungerichtete Mutagenese spezifischer ORFs mittels Error Prone PCR nach (Wilson & Keefe 2001)

Zur zufälligen Mutagenese von spezifischen Genen wurde eine *Error Prone* PCR durchgeführt. Es wurde nach folgendem Pipettierschema und Programm verfahren:

	Menge [μ l]	Programm	
Taq-Puffer (10x)	10	95°C	3 min
Template DNA	1		
Primer fw	10	95°C	45 s
Primer rv	10	60°C	45 s
dNTPs (10 mM)	2	72°C	60 s / 1 kb
dCTPs (10 mM)	2		
dTTPs (10 mM)	2	72°C	10 min
MnCl ₂ (25 mM)	2,5		
Taq-Polymerase	5	8°C	∞
dH ₂ O	55,5		
Gesamt	100		

} 40x

Anschließend wurden 5 μ l jedes PCR-Produkts zur Verifizierung auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Zur Verwendung der mutagensierten ORF-Bibliothek wurden 10 μ l des PCR-Produkts zusammen mit 5 μ l geschnittenem Plasmidvektor BHUM3407 mit homologen Enden der letzten 30-40 bp des PCR-Produkts in YHUM3451/3452 (*ted1 Δ*) transformiert.

5.2.3.7.2 Identifizierung von Klonen mit Phänotyp

Zur Identifizierung von Klonen mit dem gewünschten Phänotyp „Wachstum unter Stress mit Zinkionen“ wurden die Zellen zur Präselektion auf SC -Leu Platten mit 12mM Zinksulfat gestempelt. Jene Klone, die Wachstum aufwiesen wurden in einem *Finescreening* mittels einer 48 h Wachstumsanalyse in Flüssigkultur mit 6-9,5 mM Zinksulfat vermessen. Zeigte keiner der getesteten Klone eine Verbesserung im Wachstum im Gegensatz zur Negativkontrolle wurde ein neuer Zyklus der *In vitro* Evolution gestartet. Hierzu wurde als Template für die Mutagenese das PCR-Produkt des letzten Zyklus verwendet.

5.2.3 Klassische Klonierungstechniken

5.2.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Verifizierung wurden PCR-Produkte sowie analytische DNA-Restriktionen mittels Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert. Hierzu wurde die entsprechende DNA-Probe mit 6x Loading Dye versetzt und je nach erwarteter Größe und Bandenmuster auf ein 1-2 %iges Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für 30 min bei 130 V. Als Größenstandard diente Gene Ruler DNA Ladder Mix®, von welchem 7 µl aufgetragen wurden. Die DNA im Gel wurde für 15-30 min in einem GelRed®-haltigen Färbebad angefärbt und anschließend mittels UV-Illuminator visualisiert.

5.2.3.2 Fällung von DNA mit Ethanol

Zur Konzentration von PCR-Produkten wurden diese mittels Ethanol gefällt. Hierzu wurden PCR-Produkte gepoolt und das dreifache Volumen an eiskaltem Ethanol (100%, p.a.) hinzugefügt. Außerdem wurde 1/30 des Volumens an Lösung 3 hinzugefügt und das Gemisch für 10 min bei -20°C inkubiert. Danach wurde die DNA für 10 min bei 13.000x g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und danach in 1/10 des Ursprungsvolumens in MilliQ-H₂O aufgenommen.

5.2.3.3 Restriktion von Plasmiden mittels DNA-Endonukleasen

Restriktive Verdauungen von Plasmiden wurden im präparativen Maßstab zu Klonierungszwecken und im analytischen Maßstab zur Verifizierung von Plasmiden durchgeführt. Zur präparativen Restriktion von DNA wurden 3 µg DNA mit einer Konzentration von mindestens 300 ng/µl eingesetzt. Die verwendeten DNA Endonukleasen (*ThermoFisher Scientific Inc.*) wurden immer im Reaktionspuffer mit der bestmöglichen Aktivität verwendet. Es wurde von jedem Enzym 1 µl zugegeben und mit MilliQ-H₂O zu einem Gesamtansatz von 30 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde für 3-4 h bei für die Enzyme entsprechender Aktivitätstemperatur (30°C, 37°C oder 50°C) inkubiert. Für die analytische Restriktion wurden 3 µl DNA in einem 20 µl Gesamtansatz verwendet. Es wurden jeweils 0,2 µl der entsprechenden DNA-Endonukleasen zugegeben und der Ansatz für 1 h bei entsprechender Temperatur inkubiert.

5.2.3.4 Dephosphorylierung von 5-DNA-Enden

Um die Religation eines Plasmidrückgrats zu verhindern, wurden diese nach der präparativen Restriktion dephosphoryliert. Hierzu wurde dem Restriktionsansatz 1 µl FastAP Alkalische Phosphata-

se (ThermoFisher Scientific Inc.) hinzugefügt und der Ansatz für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 20 min bei 70 °C.

5.2.3.5 Eliminierung von Template-DNA mittels DpnI-Verdau

Zur Eliminierung von Template DNA nach einer PCR wurde eine Restriktion mit DpnI durchgeführt. Hierzu wurde die DNA zunächst mit Ethanol gefällt und anschließend in 17 µl MilliQ-H₂O aufgenommen. Es wurden 2 µl Tango-Puffer (10x, *ThermoFisher Scientific Inc.*) und 1 µl DpnI hinzugefügt. Der Verdau wurde für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert.

5.2.3.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von spezifischen DNA Fragmenten aus einer präparativen Restriktion, wurde der Verdau elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt, die DNA in einem GelRed-haltigen Färbepuffer sichtbar gemacht und das Gel anschließend auf einem UV-Illuminator visualisiert. Spezifische Banden wurden mithilfe eines Skalpellens aus dem Gel geschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit dem E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (*Omega Bio-Tek Inc.*) aus dem Gel isoliert. Die DNA wurde in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen

5.2.3.7 Mengenbestimmung von DNA mittels Nanodrop ND Spektrometer

Um nach einer Plasmidisolierung aus *E. coli* oder nach einer Gelextraktion die gewonnene Menge an DNA zu bestimmen wurde ein Nanodrop ND Spektrometer verwendet. Hierzu wurde zunächst der Blindwert durch Messen der OD_{260nm} von 1,5 µl Elutionspuffer. Anschließend wurde die Menge der DNA bestimmt.

5.2.3.8 Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte stets im Backbone-Insert-Verhältnis 1:3. Es wurden 50-100 ng extrahierte Backbone-DNA eingesetzt und die entsprechende Menge an Insert-DNA hinzugefügt. Anschließend wurden 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (*ThermoFisher Scientific Inc.*) sowie 1 µl T4-DNA-Ligase (*ThermoFisher Scientific Inc.*) hinzugefügt und der Ansatz mit MilliQ-H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Ligation wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des Gesamtansatzes in chemisch kompetente *E. coli* transformiert und die verbliebenen 10 µl über Nacht bei Raumtemperatur weiter ligiert.

5.2.3.9 Herstellung von Plasmiden mittels *in vivo* Ligation nach (Jansen *et al.* 2005)

Um Plasmide mithilfe der präzisen homologen Rekombinationsmaschinerie von *S. cerevisiae* herzustellen, wurden zu klonierende Fragmente mithilfe einer PCR amplifiziert. Die Primer für diese PCR wiesen 30-40 b Homologie zu anderen, generierten Fragmenten des Plasmids oder zum Plasmidvektor auf. Die PCR-Produkte wurden auf ihre korrekte Größe mittels Gelelektrophorese überprüft (Abschnitt 5.2.3.1). Außerdem wurden sie mit DpnI verdaut, um die Template DNA der PCR zu eliminieren (Abschnitt 5.2.3.5). Das Plasmidrückgrat wurde mithilfe einer präparativen Restriktion aufgeschnitten und danach ohne weitere Arbeitsschritte verwendet. Es wurden 4-6 µl verdautes Rückgrat und 8-12 µl jedes PCR-Produktes in einen beliebigen *S. cerevisiae* Stamm mit entsprechendem offenen Selektionsmarker transformiert. Als Kontrolle wurden außerdem lediglich 4-6 µl verdautes Rückgrat transformiert, um die Effizienz der Restriktion abschätzen zu können. Die Zellen wurden nach der Transformation für 2-3 Tage bei 30°C auf Selektionsfestmedium inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmide aus den *S. cerevisiae* Zellen (Abschnitt 5.2.2.1).

5.2.3.10 Sequenzanalyse von DNA nach (Sanger *et al.* 1977)

Zur Verifizierung neu klonierter Plasmide wurden diese sequenziert. Hierzu wurden 4 µl präpariertes Plasmid zusammen mit 3 µl Sequenzierprimer (10 µM) und 8 µl MilliQ-H₂O vermischt. Die Sequenzanalyse erfolgte durch die *Microsynth AG* nach (Sanger *et al.* 1977). Falls nicht anders beschrieben erfolgte die Sequenzierung mithilfe der Standardprimer M13 und M13r.

5.3 Wachstumsanalysen mit *S. cerevisiae*

Für Wachstumsanalysen mit *S. cerevisiae* wurde am Vortag eine 4 ml Übernachtskultur spezifischer Hefestämme in Sc-Selektionsmedium für Plasmid-tragende Hefen und in Sc-complete für Hefestämme ohne Plasmide angeimpft.

5.3.1 Wachstumsanalysen in Flüssigkultur

Für Wachstumsanalysen in Flüssigmedien wurde zunächst die optische Dichte (OD_{600nm}) der Übernachtskulturen bestimmt und diese zunächst auf eine OD_{600nm} von 2,0 in 2 ml entsprechendem Medium mit entsprechenden Stressoren eingestellt. Anschließend wurde die optische Dichte dieser Kultur erneut bestimmt und diese auf eine OD_{600nm} von 0,05 in 1 ml frischem Medium mit Stressoren eingestellt. Von dieser Kultur wurden Duplikate oder Triplikate à 200 µl in eine klare 96-Mikrotiterplatte mit runden Böden pipettiert. Außerdem wurde dreifach Medium ohne Zellen in die Mikrotiterplatte gegeben, um den Blindwert des Mediums zu ermitteln. Im *Platereader* wurde für 24 bzw.

48 Stunden unter ständigem Schütteln alle 30 min die optische Dichte der Kulturen bestimmt. Zur Auswertung des Wachstums wurde zunächst der Blindwert des Mediums subtrahiert. Anschließend wurde der Mittelwert aller technischen und danach aller biologischen Replikate eines Stammes pro Messung gebildet. Es wurden mindestens 3 Messungen durchgeführt und aus diesen ebenfalls ein Mittelwert gebildet. Für die Bestimmung der Verdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase wurde für jede Messung anhand der Messdaten und Kurven die Zeit ermittelt, die ein Stamm benötigt, um von einer OD_{600nm} von 0,2 auf 0,8 zu wachsen. Die erhaltene Zeitspanne entspricht zwei Teilungen und wurde daher durch 2 dividiert. Signifikante Unterschiede im exponentiellen Zellwachstum wurden mittels Signifikanztest validiert (zweiseitiger T-Test, ungepaarte Daten mit gleicher Varianz).

5.3.2 Wachstumsanalysen auf Festmedien

Für Wachstumsanalysen auf Festmedien wurden am Vortag des Experiments YPD-Platten mit verschiedenen Stressoren hergestellt. Am Versuchstag wurde die optische Dichte der zuvor angesetzten Übernachtskultur bestimmt und auf eine OD_{600nm} auf 0,2 in 500 μ l sterilem dH_2O eingestellt. Für Wachstumsanalysen auf 5-FOA wurden die Zellen auf eine optische Dichte von OD_{600nm} auf 0,5 in 500 μ l sterilem dH_2O eingestellt. Es wurden Verdünnungsreihen mit insgesamt fünf Schritten im 1:5-Verhältnis in sterilem dH_2O hergestellt. Anschließend wurde jede Verdünnungsstufe sorgfältig gemischt um eine homogene Verteilung der Zellen zu ermöglichen und unmittelbar danach je 3 μ l auf das entsprechende Festmedium getropft. Die Platten wurden 48-72 Stunden bei 30 °C inkubiert.

5.3.2.1 Biofilmbildung

Zur Untersuchung der Biofilmbildung von *S. cerevisiae* Stämmen wurden halbfeste YPD-Medien mit 0,3 % und 0,5 % Agar und mit 2 % und 0,5 % Glukose verwendet. Es wurden Übernachtskulturen auf eine OD_{600nm} auf 1 in 500 μ l sterilem dH_2O eingestellt. Davon wurden jeweils 5 μ l in die Mitte einer runden Petrischale getropft. Die Bildung von Biofilmen wurde nach einer Inkubation von 10-14 Tagen bei 30 °C beobachtet.

5.3.2.2 Agaradhäsion

Um Hefestämme auf ihre Fähigkeit hin zu testen, Adhäsion an Agar zu vermitteln, wurden verschiedene Hefestämme auf eine 15*15 cm YPD-Festmediumplatte übergestrichen. Es wurden jeweils neun *Patches* pro Platte in einem drei × drei-Raster auf das Festmedium übertragen. Anschließend wurden die Platten für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Agaradhäsion wurde durch Waschen unter

einem leichten Wasserstrahl überprüft. Es wurde gewaschen, bis die *flo11Δ*-Negativkontrolle nicht mehr auf der Agaroberfläche zu sehen war.

5.5 Proteinbiochemische Techniken

5.5.1 Herstellung von Zellwandextrakten aus *S. cerevisiae*

Zur Herstellung von Zellwandextrakten zur massenspektrometrischen Analyse wurden die entsprechenden Hefestämme über Nacht in 5 ml YPD-Vollmedium inokuliert. Die Zellen wurden am nächsten Tag in 100 ml frisches YPD überimpft und etwa 4-5 Stunden bis zu einer OD_{600nm} von 1,0 wachsen gelassen. Für die Analyse des Zellwandproteoms unter optimalen Wachstumsbedingungen wurden die Zellen für 3 min bei 500x g geerntet. Alternativ wurde 0,7 µg/ml Caspofungin oder 10 mM Zinksulfat zu den Zellen gegeben und diese dann für weitere 12 Stunden mit den entsprechenden Stressoren bei 30 °C wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen unter den gleichen, oben genannten Bedingungen geerntet. Die Zellpellets wurden ein mal mit 10 ml kaltem Tris/HCl-Puffer pH 7,5 gewaschen und anschließend bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.5.1.1 Extraktion von Zellwänden

Der Aufschluss der Hefezellen erfolgte mittels der Retsch Zelmühle. Als Vorbereitung für den Zellaufschluss wurden die gelagerten Zellpellets in 1 ml kaltem Tris/HCl-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden jeweils 500 µl der Zellsuspension in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Den Zellen wurden Glasperlen der Größe 0,2-0,25 mm hinzugefügt, bis die gesamte Flüssigkeit im Reaktionsgefäß bedeckt war. Danach wurden 10 µl PMSF hinzugefügt. Das Zell-Glasperlengemisch wurde für 20 min bei -80 °C eingefroren und dann für 10 min in der Zelmühle zermahlen. Der Vorgang wurde drei bis vier mal wiederholt, bis ein Aufschluss von mindestens 95 % erreicht war. Der Aufschluss wurde unter dem Mikroskop verfolgt.

Danach wurden die Zelltrümmer zusammen mit den Glasperlen mittels einer kalten, 1 M NaCl-Lösung aus den Reaktionsgefäßen gewaschen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurden verbliebene Reste im 2 ml Reaktionsgefäß drei bis vier mal mit jeweils 1 ml NaCl-Lösung gelöst und in das neue Reaktionsgefäß überführt. Um die Zelltrümmer von den Glasperlen zu trennen, wurde der Überstand danach in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Glasperlen wurden drei bis vier mal mit 10 ml der 1 M NaCl-Lösung gewaschen, aufgeschüttelt und der Überstand anschließend überführt. Die Zelltrümmer wurden dann für 5 min bei 3.000 g bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem NaCl-Puffer aufgenommen. Anschließend

wurden die Zelltrümmer erneut pelletiert. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Überstand nach dem Zentrifugieren klar war. Danach wurde der Waschschrift mit 20 ml MilliQ-Wasser wiederholt.

Die Zellpellets wurden in 2 ml MilliQ-Wasser aufgenommen und in ein frisches, zuvor gewogenes 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde sie nochmals pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Feuchtgewicht der Zellwände bestimmt. Pro 100 mg Zellwandextrakt wurden jeweils 500 µl SDS-Extraktionspuffer und 2 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt und die Proben für 10 min in einem 100 °C Wasserbad gekocht, um nicht-kovalent gebundene und Disulfidbrücken gebundene Proteine aus den Zellwänden zu lösen. Danach wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und für 5 min bei 3.000x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und der Extraktionsschritt wiederholt.

Um das Pellet zu säubern wurde es mit jeweils 10 ml MilliQ-Wasser gewaschen, bis im Überstand keine SDS-Rückstände mehr sichtbar waren. Danach wurde das Pellet in 500 µl MilliQ-Wasser aufgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellwandextrakte wurden erneut pelletiert und der Überstand verworfen.

5.5.1.2 Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie und Auswertung

Zur Vorbereitung für die massenspektrometrische Analyse wurden die Zellwandextrakte mittels einer Lyophilie gefriergetrocknet. Die Massenspektrometrische Analyse war eine Serviceleistung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg. Die Extrakte wurden nach dem Trypsin/LysC Protokoll aufgearbeitet und analysiert.

Die Auswertung der Daten erfolgte für jede Probe anhand der ermittelten *Score Sequest*-Werte. Alle Proteine mit *Score Sequest* > 40,0 in mindestens einer der analysierten Proben wurden in die Auswertung einbezogen. Alle *Score Sequest* Werte wurden addiert (*Score Sequest*^{Gesamt}). Die *Score Sequest*^{Gesamt}-Werte aller Proben wurden durch Division durch den *Score Sequest*^{Gesamt}-Wert der Wildtypkontrolle unter der entsprechenden Wachstumsbedingung normalisiert und Größenfaktor genannt. Anschließend wurde der relative Anteil jedes Proteins am *Score Sequest*^{Gesamt} der jeweiligen Probe bestimmt. Der Proteinanteil wurde durch Größenfaktor geteilt. Es wurden pro Stamm und Bedingung mindestens zwei unabhängige Biologische Replikate an zwei unabhängigen Messtagen analysiert. Der Mittelwert aus allen Proben wurde pro Stammhintergrund und Bedingung ermittelt. Es

wurde ein Signifikanztest durchgeführt (zweiseitiger T-Test, ungepaarte Daten mit gleicher Varianz).

5.5.2 Nachweis von rekombinanten Proteinen

Zur Detektion und zum qualitativen Nachweis von rekombinant hergestellten Proteinen wurden Proteingele hergestellt und diese mittels Coomassie angefärbt oder mit Western Blot Analyse spezifische Proteine detektiert.

5.5.2.1 Größenauftrennung von Proteinen mittels Denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung denaturierter Proteinproben wurden je nach erwarteter Größe der Proteine auf ein 10-12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Zusammensetzung des Gels entspricht folgenden Komponenten:

	Trenngel (10 %ig)	Trenngel (12,5 %ig)	Sammelgel
1 M Tris/HCl (pH8,8)	3,75 ml	3,75 ml	2,5 ml 0,5 M Tris/HCl (pH6,8)
ddH ₂ O	2,5 ml	1,6 ml	6,1 ml
Acrylamid (30 %ig)	3,4 ml	4,1 ml	1,3 ml
SDS (10 %ig, w/v)	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl	10 µl
APS (10 %ig)	100 µl	100 µl	100 µl

Es wurden 8 µl jeder Probe auf das Gel geladen und 3,5 µl Page Ruler als Größenstandard verwendet. Es wurden für 75 min eine Spannung von 150 V angelegt.

5.5.2.2 Coomassie Färbung

Das SDS-Gel wurde für 1 min in der Mikrowelle unter maximaler Wattzahl in Coomassie-Färbelösung inkubiert und danach in Entfärbelösung überführt, um Proteinbanden zu visualisieren. Am nächsten Tag konnten entsprechende Banden im Gel detektiert werden. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die gefärbten SDS-Gele in einen Autoklavierbeutel gelegt und mittels eines Scanners gescannt.

5.5.2.3 Western Blot Analyse

Zum spezifischen Nachweis rekombinanter Proteine mit 6His-Tag wurden die Proteine nach Größenauftrennung durch SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose Membran (*Whatman GmbH*) übertragen. Hierzu wurde ein Sandwich hergestellt aus Faserpolster-2xFilterpapier (*Whatman GmbH*)-Trenngel-Nitrozellulose Membran-2xFilterpapier (*Whatman GmbH*)-Faserpolster. Das Sandwich wurde in eine Transferkassette gestapelt und eine Spannung von 20 V für 12 h angelegt, sodass die Proteine Richtung Kathode in die Nitrozellulose Membran übertragen wurden.

Zur Detektion wurden die Transferkassette nach 12 h auseinander gebaut und die Nitrozellulose Membran für eine Stunde in TBS-T Puffer mit 10 % Milchpulver (w/v) inkubiert. Danach wurde die Membran drei mal in TBS-T gewaschen und anschließend eine Stunde in TBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) und dem primären Antikörper Maus α PolyHistidin (1:3000 Verdünnung, Sigma Aldrich Chemie GmbH) inkubiert. Die Membran wurde erneut drei mal in TBS-T gewaschen und dann für eine Stunde in TBS-T mit 5 % Milchpulver (w/v) und dem primären Antikörper Ziege α Maus mit Peroxidase-Label (1:2000 Verdünnung, Dianova GmbH) inkubiert. Anschließend wurde die Membran sechs mal mit TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte nach Zugabe von 10 ml ECL Lösung, die 1 min auf der Membran inkubiert wurde. Danach wurde die Chemofluoreszenz der Peroxidase-Labels mit einer Chemostar Professional Apparatur detektiert. Die Detektionszeit wurde je nach Signalstärke angepasst.

5.5.3 Produktion von Proteinen in *E. coli* im analytischen Maßstab

Zur Produktion von Proteinen in *E. coli* wurden codon-optimierte Varianten der *S. cerevisiae* Proteine in verschiedenen pET-Expressionsvektoren mit einem 6xHis-Tag genutzt. Es wurde jeweils 1 μ l des entsprechenden Plasmids in einen für die Proteinproduktion optimierten *E. coli*-Stamm transformiert und über Nacht auf Kanamycin-haltigen LB-Platten inkubiert. Je nach verwendetem Stamm enthielten die Platten zusätzliche Antibiotika für die Selektion weiterer, stammspezifischer Plasmide.

Am nächsten Tag wurden jeweils zwei Klone der Transformation in 5 ml LB mit Kanamycin inokuliert und über Nacht auf 37 °C rollend inkubiert. Dann wurde die Kultur im Verhältnis 1:100 in 50 ml frischem LB mit Kanamycin überimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,4 bis 0,6 wachsen gelassen. Die Induktion zur Proteinproduktion erfolgte mittels verschiedener Konzentrationen IPTG zwischen 0,01 und 1 mM IPTG. Die Proteine wurden unter verschiedenen Bedingungen produziert: kontrollweise über Nacht bei 37 °C, für 12 h bei 30 °C, für 24 h bei 18 °C und für 72 h bei 12 °C.

Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C für 15 min bei 4.000x g geerntet und danach in 500 µl AM-Puffer (20- 200 mM Tris, 200 mM NaCl) mit verschiedenen Zusätzen (5-50 mM MnCl₂, DTT, Glycerol, ATP, Triton X-100, Mannose) aufgenommen. Es wurden 5 µl Lysozym und 5 µl PMSF hinzugefügt und die Proben in ein Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt. Es wurden Glasperlen der Größe 0,2- 0,25 mm hinzugefügt und die Proben dreifach mittels des MP Bio FastPrepR-24 Homogenisator für jeweils 20 s aufgeschlossen.

Danach wurden die Rohextrakte für 45 min bei 13.000 g zentrifugiert. Es wurde eine Probe aus dem Überstand (lösliche Fraktion S) genommen und der Rest des Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl AM-Puffer aufgenommen und ebenfalls eine Probe entnommen (unlösliche Fraktion U). Beide Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit HU-Puffer versetzt und für 15 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden 8-16 µl der Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches für 75 min bei 150 V laufen gelassen wurde.

5.5.4 präparative Produktion von Proteinen in *E. coli*

Für die präparative Produktion von *S. cerevisiae* Proteindomänen in *E. coli* wurde eine der zuvor analytisch getesteten Klone in 100 ml LB mit Kanamycin über Nacht bei 37 °C inokuliert. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in Verhältnis 1:100 in 8 l frischem LB mit Kanamycin überimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 wachsen gelassen. Die Kultur wurde anschließend mit 0,1 mM IPTG induziert und für 72 h bei 12 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei 6.000x g geerntet, in 20 ml AM-Puffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur ihrer Verwendung wurden die Zellpellets bei -80 °C gelagert.

Für den Aufschluss wurden die Zellpellets in Eiswasser aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 200 µl Lysozym und PMSF hinzugefügt sowie eine Spatelspitze DNase. Die Zellen wurden 10 min auf Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte der dreifache Zellaufschluss mittels einer French Press Zelle. Der Rohextrakt wurde für 1 h bei 30.000x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mittels eines Filters mit 0,45 µm Porengröße sterilfiltriert.

5.5.5 Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Zur Isolierung der produzierten Proteine von den nativen *E. coli* Proteinen aus dem Proteinextrakt wurde zunächst eine Affinitätschromatographie mit einer 1 ml Ni-NTA-Agarosesäule der *Macherey-Nagel GmbH und Co. KG* durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden sterilfiltriert und entgast.

Zuerst wurde die Säule mit 10 ml MilliQ-H₂O und dann mit 10 ml AM-Puffer bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen. Danach wurde das Proteinlysate bei einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgebracht. Die Säule wurde anschließend mit 10 ml AM-Puffer gewaschen. Bei der ersten Durchführung des Experiments wurden dem Puffer danach schrittweise je 10 mM Imidazol hinzugefügt und die Säule mit 10 ml des jeweiligen Puffers gewaschen, um die Bindung des Zielproteins an die Säule zu ermitteln und so die Waschschrte zu optimieren. Später wurden als zweiter Waschschrte 10 ml AM-Puffer mit 30 mM Imidazol verwendet. Das Zielprotein wurde mit 10 ml AM-Puffer mit 250 mM Imidazol von der Säule eluiert und anschließend mithilfe eines Zentrifugenfilters auf 1 ml Gesamtvolumen konzentriert. Die Säule wurde danach mit 10 ml MilliQ-H₂O gespült.

Vom Rohlysate, allen Waschschrten sowie dem Eluat wurden jeweils 100 µl-Proben entnommen und mit 100 µl HU-Puffer versetzt. Die Proben wurden für 15 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels Coomassie-Färbung. Außerdem wurden mutmaßliche Banden der Proteinendomänen *ScCdc1* und *ScTed1* nach der Coomassie Färbung mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und massenspektrometrisch verifiziert. Die Massenspektrometrische Analyse war eine Serviceleistung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg.

5.5.6 Isolierung von Proteinen mittels Größenausschlusschromatographie

Das nach der IMAC eluierte Protein wurde zunächst mithilfe eines Amicon Zentrifugenfilters (*Merck*) zu einem Endvolumen von 1 ml konzentriert. Um das Imidazol des Elutionspuffers zu entfernen wurden die Proteine über Nacht in einem Dialysierschlauch mit Filterrate 12,000 der *Carl Roth GmbH & Co. KG* dialysiert. Das NusA-6His-*ScTed1* Fusionskonstrukt wurde zudem im Verhältnis 4:1 mit TEV-Protease dialysiert.

Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mithilfe einer HiLoad Superdex 75 Säule (*GE Healthcare*) und einem ÄKTA Purifier (*GE Healthcare*). Hierzu wurde die Säule zunächst mit 120 ml AM-Puffer equilibriert und anschließend das Protein aufgetragen. Die Probe wurde in 2 ml Aliquots fraktioniert. Aus jeder Fraktion wurde eine Probe von 50 µl- entnommen und mit 50 µl HU-Puffer versetzt. Die Proben wurden für 15 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels Coomassie-Färbung

6. Referenzen

- Aguilar-Uscanga, B. & François, J.M. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in applied microbiology* 37: 268–274.
- Almagro Armenteros, J.J., Sønderby, C.K., Sønderby, S.K., Nielsen, H. & Winther, O. 2017. DeepLoc: Prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics (Oxford, England)* 33: 3387–3395.
- Amlacher, S., Sarges, P., Flemming, D., van Noort, V., Kunze, R., Devos, D.P., Arumugam, M., Bork, P. & Hurt, E. 2011. Insight into structure and assembly of the nuclear pore complex by utilizing the genome of a eukaryotic thermophile. *Cell* 146: 277–289.
- Aravind, L. & Koonin, E.V. 1998. Phosphoesterase domains associated with DNA polymerases of diverse origins. *Nucleic acids research* 26: 3746–3752.
- Babele, P.K., Thakre, P.K., Kumawat, R. & Tomar, R.S. 2018. Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere* 213: 65–75.
- Bairoch, A. 1993. The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. *Nucleic acids research* 21: 3097–3103.
- Balendiran, K., Tan, Y., Sharma, R.K. & Murthy, K.H. 1995. Preliminary crystallization studies of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin) from bovine brain. *Molecular and cellular biochemistry* 149-150: 127–130.
- Belcastro, M., Marino, T., Russo, N. & Toscano, M. 2005. Interaction of cysteine with Cu²⁺ and group IIb (Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺) metal cations: A theoretical study. *Journal of mass spectrometry* : JMS 40: 300–306.
- Belval, L., Marquette, A., Mestre, P., Piron, M.-C., Demangeat, G., Merdinoglu, D. & Chich, J.-F. 2015. A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by *E. coli* Arctic Express. *Protein expression and purification* 109: 29–34.
- Benachour, A., Sipos, G., Flury, I., Reggiori, F., Canivenc-Gansel, E., Vionnet, C., Conzelmann, A. & Benghezal, M. 1999. Deletion of GPI7, a yeast gene required for addition of a side chain to the glycosylphosphatidylinositol (GPI) core structure, affects GPI protein transport, remodeling, and cell wall integrity. *Journal of Biological Chemistry* 274: 15251–15261.
- Bergkessel, M. & Guthrie, C. 2013. Colony PCR. *Methods in enzymology* 529: 299–309.
- Bermejo, C., Rodríguez, E., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., La Rodríguez de Concepción, M.L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F. & Arroyo, J. 2008. The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Molecular biology of the cell* 19: 1113–1124.

- Bickle, M., Delley, P.A., Schmidt, A. & Hall, M.N. 1998. Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *The EMBO journal* 17: 2235–2245.
- Blankenship, J.R. & Mitchell, A.P. 2006. How to build a biofilm: A fungal perspective. *Current opinion in microbiology* 9: 588–594.
- Boeke, J.D., LaCroute, F. & Fink, G.R. 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Molecular & general genetics* : MGG 197: 345–346.
- Boorsma, A., Nobel, H. de, ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K.J. & Klis, F.M. 2004. Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 21: 413–427.
- Botstein, D. & Fink, G.R. 2011. Yeast: An experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* 189: 695–704.
- Bouyx, C., Schiavone, M. & François, J.M. 2021. FLO11, a Developmental Gene Conferring Impressive Adaptive Plasticity to the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10:
- Braconi, D., Amato, L., Bernardini, G., Arena, S., Orlandini, M., Scaloni, A. & Santucci, A. 2011. Surfome analysis of a wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Food microbiology* 28: 1220–1230.
- Brocca, S., Testa, L., Sobott, F., Samalikova, M., Natalello, A., Papaleo, E., Lotti, M., Gioia, L. de, Doglia, S.M., Alberghina, L. & Grandori, R. 2011. Compaction properties of an intrinsically disordered protein: Sic1 and its kinase-inhibitor domain. *Biophysical journal* 100: 2243–2252.
- Brückner, S. & Mösch, H.-U. 2012. Choosing the right lifestyle: Adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* 36: 25–58.
- Buchan, D.W.A. & Jones, D.T. 2019. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic acids research* 47: W402-W407.
- Buchholz, J.N. & Behringer, E.J. (eds.) 2018. Calcium and Signal Transduction. InTech.
- Bulik, D.A., Olczak, M., Lucero, H.A., Osmond, B.C., Robbins, P.W. & Specht, C.A. 2003. Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryotic cell* 2: 886–900.
- Cabib, E., Drgonová, J. & Drgon, T. 1998. Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annual review of biochemistry* 67: 307–333.
- Calderone, R.A. & Fonzi, W.A. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology* 9: 327–335.
- Canivenc-Gansel, E., Imhof, I., Reggiori, F., Burda, P., Conzelmann, A. & Benachour, A. 1998. GPI anchor biosynthesis in yeast: Phosphoethanolamine is attached to the alpha1,4-linked mannose of the complete precursor glycopospholipid. *Glycobiology* 8: 761–770.

- Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R. & Tanner, W. 1994. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: Cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin. *The EMBO journal* 13: 4737–4744.
- Caras, I.W. & Weddell, G.N. 1989. Signal peptide for protein secretion directing glycosphospholipid membrane anchor attachment. *Science (New York, N.Y.)* 243: 1196–1198.
- Caras, I.W., Weddell, G.N., Davitz, M.A., Nussenzweig, V. & Martin, D.W. 1987. Signal for attachment of a phospholipid membrane anchor in decay accelerating factor. *Science (New York, N.Y.)* 238: 1280–1283.
- Caro, L.H.P., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F.J., van den Ende, H. & Klis, F.M. 1997. In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1477–1489.
- Chapman, K.B. & Boeke, J.D. 1991. Isolation and characterization of the gene encoding yeast debranching enzyme. *Cell* 65: 483–492.
- Chen, L., Tu, L., Yang, G. & Banfield, D.K. 2021. Remodeling-defective GPI-anchored proteins on the plasma membrane activate the spindle assembly checkpoint. *Cell reports* 37: 110120.
- Cherry, J.M., Hong, E.L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E.T., Christie, K.R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Engel, S.R., Fisk, D.G., Hirschman, J.E., Hitz, B.C., Karra, K., Krieger, C.J., Miyasato, S.R., Nash, R.S., Park, J., Skrzypek, M.S., Simison, M., Weng, S. & Wong, E.D. 2012. *Saccharomyces* Genome Database: The genomics resource of budding yeast. *Nucleic acids research* 40: D700-5.
- Clark, N.E., Katolik, A., Roberts, K.M., Taylor, A.B., Holloway, S.P., Schuermann, J.P., Montemayor, E.J., Stevens, S.W., Fitzpatrick, P.F., Damha, M.J. & Hart, P.J. 2016. Metal dependence and branched RNA cocystal structures of the RNA lariat debranching enzyme Dbr1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 14727–14732.
- Cócera, M., Lopez, O., Coderch, L., Parra, J.L. & La Maza, A. de 1999. Influence of the level of ceramides on the permeability of stratum corneum lipid liposomes caused by a C12-betaine/sodium dodecyl sulfate mixture. *International journal of pharmaceutics* 183: 165–173.
- Conzelmann, A., Puoti, A., Lester, R.L. & Desponds, C. 1992. Two different types of lipid moieties are present in glycosphosphoinositol-anchored membrane proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 11: 457–466.
- Cormack, B.P., Ghori, N. & Falkow, S. 1999. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science (New York, N.Y.)* 285: 578–582.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S.E. 2004. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome research* 14: 1188–1190.
- Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M. & Harrison, R.G. 1999. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 65: 382–388.

- Deresinski, S.C. & Stevens, D.A. 2003. Caspofungin. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 36: 1445–1457.
- Diss, G., Gagnon-Arsenault, I., Dion-Coté, A.-M., Vignaud, H., Ascencio, D.I., Berger, C.M. & Landry, C.R. 2017. Gene duplication can impart fragility, not robustness, in the yeast protein interaction network. *Science (New York, N.Y.)* 355: 630–634.
- Doering, T.L. & Schekman, R. 1996. GPI anchor attachment is required for Gas1p transport from the endoplasmic reticulum in COP II vesicles. *The EMBO journal* 15: 182–191.
- Dowell, R.D., Ryan, O., Jansen, A., Cheung, D., Agarwala, S., Danford, T., Bernstein, D.A., Rolfe, P.A., Heisler, L.E., Chin, B., Nislow, C., Giaever, G., Phillips, P.C., Fink, G.R., Gifford, D.K. & Boone, C. 2010. Genotype to phenotype: A complex problem. *Science (New York, N.Y.)* 328: 469.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* 16: 6127–6145.
- Dranginis, A.M., Rauceo, J.M., Coronado, J.E. & Lipke, P.N. 2007. A biochemical guide to yeast adhesins: Glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 71: 282–294.
- Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrsa, V. & Tanner, W. 2006. Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *Journal of Biological Chemistry* 281: 11523–11529.
- Eguez, L., Chung, Y.-S., Kuchibhatla, A., Paidhungat, M. & Garrett, S. 2004. Yeast Mn²⁺ transporter, Smf1p, is regulated by ubiquitin-dependent vacuolar protein sorting. *Genetics* 167: 107–117.
- Eisenhaber, B., Bork, P. & Eisenhaber, F. 1998. Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: Constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein engineering* 11: 1155–1161.
- Ejaz, A., Goldgur, Y. & Shuman, S. 2019. Activity and structure of *Pseudomonas putida* MPE, a manganese-dependent single-strand DNA endonuclease encoded in a nucleic acid repair gene cluster. *The Journal of biological chemistry* 294: 7931–7941.
- Elorza, M.V., Rico, H. & Sentandreu, R. 1983. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *Journal of general microbiology* 129: 1577–1582.
- Engel, S.R., Dietrich, F.S., Fisk, D.G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Hitz, B.C., Karra, K., Nash, R.S., Weng, S., Wong, E.D., Lloyd, P., Skrzypek, M.S., Miyasato, S.R., Simison, M. & Cherry, J.M. 2014. The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and now. *G3 (Bethesda, Md.)* 4: 389–398.
- Essen, L.-O., Vogt, M.S. & Mösch, H.-U. 2020. Diversity of GPI-anchored fungal adhesins. *Biological chemistry* 401: 1389–1405.

- Falcón, A.A. & Aris, J.P. 2003. Plasmid accumulation reduces life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 278: 41607–41617.
- Fankhauser, C., Homans, S.W., Thomas-Oates, J.E., McConville, M.J., Desponds, C., Conzelmann, A. & Ferguson, M.A. 1993. Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 268: 26365–26374.
- Fidalgo, M., Barrales, R.R. & Jimenez, J. 2008. Coding repeat instability in the FLO11 gene of *Saccharomyces* yeasts. *Yeast (Chichester, England)* 25: 879–889.
- Fischer, C., Valerius, O., Rupprecht, H., Dumkow, M., Krappmann, S. & Braus, G.H. 2008. Posttranscriptional regulation of FLO11 upon amino acid starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 8: 225–236.
- Flury, I., Benachour, A. & Conzelmann, A. 2000. YLL031c belongs to a novel family of membrane proteins involved in the transfer of ethanolaminephosphate onto the core structure of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 275: 24458–24465.
- Fraering, P., Imhof, I., Meyer, U., Strub, J.M., van Dorselaer, A., Vionnet, C. & Conzelmann, A. 2001. The GPI transamidase complex of *Saccharomyces cerevisiae* contains Gaa1p, Gpi8p, and Gpi16p. *Molecular biology of the cell* 12: 3295–3306.
- Franzot, S.P. & Doering, T.L. 1999. Inositol acylation of glycosylphosphatidylinositols in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* and the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal* 340 (Pt 1): 25–32.
- Frieman, M.B. & Cormack, B.P. 2003. The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Molecular microbiology* 50: 883–896.
- Fu, Y., Luo, G., Spellberg, B.J., Edwards, J.E. & Ibrahim, A.S. 2008. Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* 7: 483–492.
- Fujita, M. & Kinoshita, T. 2010. Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins. *FEBS letters* 584: 1670–1677.
- Fujita, M., Maeda, Y., Ra, M., Yamaguchi, Y., Taguchi, R. & Kinoshita, T. 2009. GPI glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi. *Cell* 139: 352–365.
- Fujita, M., Yoko-O, T. & Jigami, Y. 2006. Inositol deacylation by Bst1p is required for the quality control of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Molecular biology of the cell* 17: 834–850.
- Gancedo, J.M. 2001. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* 25: 107–123.
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J.M., Francois, J., Nombela, C. & Arroyo, J. 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces*

cerevisiae and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279: 15183–15195.

García, R., Botet, J., Rodríguez-Peña, J.M., Bermejo, C., Ribas, J.C., Revuelta, J.L., Nombela, C. & Arroyo, J. 2015. Genomic profiling of fungal cell wall-interfering compounds: Identification of a common gene signature. *BMC genomics* 16: 683.

Gaynor, E.C., Mondésert, G., Grimme, S.J., Reed, S.I., Orlean, P. & Emr, S.D. 1999. MCD4 encodes a conserved endoplasmic reticulum membrane protein essential for glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in yeast. *Molecular biology of the cell* 10: 627–648.

Ghanegolmohammadi, F., Okada, H., Liu, Y., Itto-Nakama, K., Ohnuki, S., Savchenko, A., Bi, E., Yoshida, S. & Ohya, Y. 2021. Defining Functions of Mannoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* by High-Dimensional Morphological Phenotyping. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* 7:

Ghugtyal, V., Vionnet, C., Roubaty, C. & Conzelmann, A. 2007. CWH43 is required for the introduction of ceramides into GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 65: 1493–1502.

Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.-D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Güldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kötter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.-y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W. & Johnston, M. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387–391.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. & Fink, G.R. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077–1090.

Goder, V. & Melero, A. 2011. Protein O-mannosyltransferases participate in ER protein quality control. *Journal of cell science* 124: 144–153.

Goldberg, J., Huang, H.B., Kwon, Y.G., Greengard, P., Nairn, A.C. & Kuriyan, J. 1995. Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376: 745–753.

Groot, P.W.J. de, Hellingwerf, K.J. & Klis, F.M. 2003. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast (Chichester, England)* 20: 781–796.

Groot, P.W.J. de, Ram, A.F. & Klis, F.M. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal genetics and biology : FG & B* 42: 657–675.

Groot, P.W. de, Ruiz, C., Vázquez de Aldana, C.R., Duenas, E., Cid, V.J., Del Rey, F., Rodríguez-Peña, J.M., Pérez, P., Andel, A., Caubín, J., Arroyo, J., García, J.C., Gil, C., Molina, M., García,

- L.J., Nombela, C. & Klis, F.M. 2001. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative and functional genomics* 2: 124–142.
- Guo, J. & Polymenis, M. 2006. Dcr2 targets Ire1 and downregulates the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO reports* 7: 1124–1127.
- Haapalainen, A.M., Daddali, R., Hallman, M. & Rämetsä, M. 2021. Human CPPED1 belongs to calcineurin-like metallophosphoesterase superfamily and dephosphorylates PI3K-AKT pathway component PAK4. *Journal of cellular and molecular medicine* 25: 6304–6317.
- Haass, F.A., Jonikas, M., Walter, P., Weissman, J.S., Jan, Y.-N., Jan, L.Y. & Schuldiner, M. 2007. Identification of yeast proteins necessary for cell-surface function of a potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 18079–18084.
- Haber, J.E. 1992. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in genetics* : TIG 8: 446–452.
- Hagen, D.C., McCaffrey, G. & Sprague, G.F. 1986. Evidence the yeast STE3 gene encodes a receptor for the peptide pheromone a factor: Gene sequence and implications for the structure of the presumed receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 1418–1422.
- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N. & Kitada, K. 1999. Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *Journal of bacteriology* 181: 3886–3889.
- Hartinger, D., Heinel, S., Schwartz, H.E., Grabherr, R., Schatzmayr, G., Haltrich, D. & Moll, W.-D. 2010. Enhancement of solubility in *Escherichia coli* and purification of an aminotransferase from *Sphingopyxis* sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisins B(1). *Microbial cell factories* 9: 62.
- Hartwell, L.H. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriological reviews* 38: 164–198.
- Hartwell, L.H., Mortimer, R.K., Culotti, J. & Culotti, M. 1973. Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of *cdc* Mutants. *Genetics* 74: 267–286.
- Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 52: 536–553.
- Hong, Y., Ohishi, K., Kang, J.Y., Tanaka, S., Inoue, N., Nishimura, J.-i., Maeda, Y. & Kinoshita, T. 2003. Human PIG-U and yeast Cdc91p are the fifth subunit of GPI transamidase that attaches GPI-anchors to proteins. *Molecular biology of the cell* 14: 1780–1789.
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Craig, L., Woo, T.T., Carney, J.P. & Tainer, J.A. 2001. Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105: 473–485.

- Hosiner, D., Gerber, S., Lichtenberg-Fraté, H., Glaser, W., Schüller, C. & Klipp, E. 2014. Impact of acute metal stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one* 9: e83330.
- Hsu, P.-H., Chiang, P.-C., Liu, C.-H. & Chang, Y.-W. 2015. Characterization of Cell Wall Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* Clinical Isolates Elucidates Hsp150p in Virulence. *PloS one* 10: e0135174.
- Igual, J.C., Johnson, A.L. & Johnston, L.H. 1996. Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *The EMBO journal* 15: 5001–5013.
- Igunnu, A., Osalaye, D.S., Olorunsogo, O.O., Malomo, S.O. & Olorunniji, F.J. 2011. Distinct metal ion requirements for the phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities of calf intestinal alkaline phosphatase. *The open biochemistry journal* 5: 67–72.
- Imhof, I., Canivenc-Gansel, E., Meyer, U. & Conzelmann, A. 2000. Phosphatidylethanolamine is the donor of the phosphorylethanolamine linked to the alpha1,4-linked mannose of yeast GPI structures. *Glycobiology* 10: 1271–1275.
- Imhof, I., Flury, I., Vionnet, C., Roubaty, C., Egger, D. & Conzelmann, A. 2004. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) proteins of *Saccharomyces cerevisiae* contain ethanolamine phosphate groups on the alpha1,4-linked mannose of the GPI anchor. *Journal of Biological Chemistry* 279: 19614–19627.
- Insenser, M.R., Hernáez, M.L., Nombela, C., Molina, M., Molero, G. & Gil, C. 2010. Gel and gel-free proteomics to identify *Saccharomyces cerevisiae* cell surface proteins. *Journal of proteomics* 73: 1183–1195.
- Jackson, C.J., Carr, P.D., Liu, J.-W., Watt, S.J., Beck, J.L. & Ollis, D.L. 2007. The structure and function of a novel glycerophosphodiesterase from *Enterobacter aerogenes*. *Journal of molecular biology* 367: 1047–1062.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E. & Knop, M. 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast (Chichester, England)* 21: 947–962.
- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D.Y. & Whiteway, M. 2005. Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* 344: 43–51.
- Jenness, D.D., Burkholder, A.C. & Hartwell, L.H. 1986. Binding of alpha-factor pheromone to *Saccharomyces cerevisiae* a cells: Dissociation constant and number of binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 6: 318–320.
- Jensen, R.E. & Herskowitz, I. 1984. Directionality and regulation of cassette substitution in yeast. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 49: 97–104.
- Jones, D.T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of molecular biology* 292: 195–202.

- Jones, D.T. & Cozzetto, D. 2015. DISOPRED3: Precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. *Bioinformatics (Oxford, England)* 31: 857–863.
- Jonikas, M.C., Collins, S.R., Denic, V., Oh, E., Quan, E.M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J.S. & Schuldiner, M. 2009. Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science (New York, N.Y.)* 323: 1693–1697.
- Kachroo, A.H., Laurent, J.M., Yellman, C.M., Meyer, A.G., Wilke, C.O. & Marcotte, E.M. 2015. Evolution. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science (New York, N.Y.)* 348: 921–925.
- Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A. & Alves, R. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: A comparative study. *PloS one* 6: e16015.
- Kernien, J.F., Snarr, B.D., Sheppard, D.C. & Nett, J.E. 2017. The Interface between Fungal Biofilms and Innate Immunity. *Frontiers in immunology* 8: 1968.
- Kim, S.R., Park, Y.-C., Jin, Y.-S. & Seo, J.-H. 2013. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnology advances* 31: 851–861.
- Kinoshita, T. 2016. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series. *Journal of lipid research* 57: 4–5.
- Kinoshita, T. & Fujita, M. 2016. Biosynthesis of GPI-anchored proteins: Special emphasis on GPI lipid remodeling. *Journal of lipid research* 57: 6–24.
- Kitagaki, H., Wu, H., Shimoi, H. & Ito, K. 2002. Two homologous genes, DCW1 (YKL046c) and DFG5, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 46: 1011–1022.
- Klabunde, T., Sträter, N., Fröhlich, R., Witzel, H. & Krebs, B. 1996. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. *Journal of molecular biology* 259: 737–748.
- Klar, A.J. 1987. Determination of the yeast cell lineage. *Cell* 49: 433–435.
- Klis, F.M. 1994. Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast (Chichester, England)* 10: 851–869.
- Klis, F.M., Boorsma, A. & Groot, P.W.J. de 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 23: 185–202.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews* 26: 239–256.
- Knöfel, T. & Sträter, N. 2001. Mechanism of hydrolysis of phosphate esters by the dimetal center of 5'-nucleotidase based on crystal structures. *Journal of molecular biology* 309: 239–254.

- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. & Schiebel, E. 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: More tags and improved practical routines. *Yeast* (Chichester, England) 15: 963–972.
- Kock, C., Dufrêne, Y.F. & Heinisch, J.J. 2015. Up against the wall: Is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Applied and environmental microbiology* 81: 806–811.
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M.J. & Mori, K. 1993. The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 13: 877–890.
- Komath, S.S., Singh, S.L., Pratyusha, V.A. & Sah, S.K. 2018. Generating anchors only to lose them: The unusual story of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis and remodeling in yeast and fungi. *IUBMB life* 70: 355–383.
- Koonin, E.V. 1994. Conserved sequence pattern in a wide variety of phosphoesterases. *Protein science : a publication of the Protein Society* 3: 356–358.
- Kopecká, M. & Gabriel, M. 1992. The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of microbiology* 158: 115–126.
- Krause, S.A., Xu, H. & Gray, J.V. 2008. The synthetic genetic network around PKC1 identifies novel modulators and components of protein kinase C signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* 7: 1880–1887.
- Kron, S.J. & Gow, N.A. 1995. Budding yeast morphogenesis: Signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Current opinion in cell biology* 7: 845–855.
- Kurtzman, C.P. 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS yeast research* 4: 233–245.
- Leberer, E., Thomas, D.Y. & Whiteway, M. 1997. Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Current opinion in genetics & development* 7: 59–66.
- Lesage, G. & Bussey, H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 70: 317–343.
- Lesage, G., Shapiro, J., Specht, C.A., Sdicu, A.-M., Ménard, P., Hussein, S., Tong, A.H.Y., Boone, C. & Bussey, H. 2005. An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC genetics* 6: 8.
- Letscher-Bru, V. & Herbrecht, R. 2003. Caspofungin: The first representative of a new antifungal class. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 51: 513–521.
- Letunic, I. & Bork, P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic acids research* 49: W293-W296.

- Levin, D.E. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 69: 262–291.
- Li, F. & Palecek, S.P. 2003. EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryotic cell* 2: 1266–1273.
- Lindqvist, Y., Johansson, E., Kaija, H., Vihko, P. & Schneider, G. 1999. Three-dimensional structure of a mammalian purple acid phosphatase at 2.2 Å resolution with a μ -(hydr)oxo bridged di-iron center. *Journal of molecular biology* 291: 135–147.
- Lipke, P.N. 2018. What We Do Not Know about Fungal Cell Adhesion Molecules. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland) 4:
- Liu, H., Zhou, P., Qi, M., Guo, L., Gao, C., Hu, G., Song, W., Wu, J., Chen, X., Chen, J., Chen, W. & Liu, L. 2022. Enhancing biofuels production by engineering the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature communications* 13: 1886.
- Lodder, A.L., Lee, T.K. & Ballester, R. 1999. Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152: 1487–1499.
- Lõoke, M., Kristjuhan, K. & Kristjuhan, A. 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* 50: 325–328.
- Losev, E., Papanikou, E., Rossanese, O.W. & Glick, B.S. 2008. Cdc1p is an endoplasmic reticulum-localized putative lipid phosphatase that affects Golgi inheritance and actin polarization by activating Ca^{2+} signaling. *Molecular and cellular biology* 28: 3336–3343.
- Lu, C.F., Montijn, R.C., Brown, J.L., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H. & Lipke, P.N. 1995. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *The Journal of cell biology* 128: 333–340.
- Ma, P., Wera, S., van Dijck, P. & Thevelein, J.M. 1999. The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Molecular biology of the cell* 10: 91–104.
- Mackiewicz, P., Kowalczyk, M., Mackiewicz, D., Nowicka, A., Dudkiewicz, M., Laszkiewicz, A., Dudek, M.R. & Cebrat, S. 2002. How many protein-coding genes are there in the *Saccharomyces cerevisiae* genome? *Yeast* (Chichester, England) 19: 619–629.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D. & Lopez, R. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research* 47: W636-W641.
- Malhotra, A. 2009. Tagging for protein expression. *Methods in enzymology* 463: 239–258.
- Mandel, M. & Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology* 53: 159–162.
- Manzano-Lopez, J., Perez-Linero, A.M., Aguilera-Romero, A., Martin, M.E., Okano, T., Silva, D.V., Seeberger, P.H., Riezman, H., Funato, K., Goder, V., Wellinger, R.E. & Muñoz, M. 2015.

- COPII coat composition is actively regulated by luminal cargo maturation. *Current biology : CB* 25: 152–162.
- Markovich, S., Yekutieli, A., Shalit, I., Shadkchan, Y. & Osherov, N. 2004. Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48: 3871–3876.
- Maršíková, J., Wilkinson, D., Hlaváček, O., Gilfillan, G.D., Mizeranschi, A., Hughes, T., Begany, M., Rešetárová, S., Váchová, L. & Palková, Z. 2017. Metabolic differentiation of surface and invasive cells of yeast colony biofilms revealed by gene expression profiling. *BMC genomics* 18: 814.
- Martinez, L.R. & Fries, B.C. 2010. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Current fungal infection reports* 4: 266–275.
- Martínez-Bartolomé, S., Navarro, P., Martín-Maroto, F., López-Ferrer, D., Ramos-Fernández, A., Villar, M., García-Ruiz, J.P. & Vázquez, J. 2008. Properties of average score distributions of SEQUEST: The probability ratio method. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7: 1135–1145.
- Matange, N., Podobnik, M. & Visweswariah, S.S. 2014. The non-catalytic "cap domain" of a mycobacterial metallophosphoesterase regulates its expression and localization in the cell. *The Journal of biological chemistry* 289: 22470–22481.
- Matange, N., Podobnik, M. & Visweswariah, S.S. 2015. Metallophosphoesterases: Structural fidelity with functional promiscuity. *The Biochemical journal* 467: 201–216.
- Mehta, D.P., Ichikawa, M., Salimath, P.V., Etchison, J.R., Haak, R., Manzi, A. & Freeze, H.H. 1996. A lysosomal cysteine proteinase from *Dictyostelium discoideum* contains N-acetylglucosamine-1-phosphate bound to serine but not mannose-6-phosphate on N-linked oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 271: 10897–10903.
- Meyers, R.A. (ed.) 2002. *Encyclopedia of physical science and technology*. Acad. Press, San Diego.
- Mitchell, A.P. 1994. Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 58: 56–70.
- Möckel, C., Lammens, K., Schele, A. & Hopfner, K.-P. 2012. ATP driven structural changes of the bacterial Mre11:Rad50 catalytic head complex. *Nucleic acids research* 40: 914–927.
- Montemayor, E.J., Katolik, A., Clark, N.E., Taylor, A.B., Schuermann, J.P., Combs, D.J., Johnsson, R., Holloway, S.P., Stevens, S.W., Damha, M.J. & Hart, P.J. 2014. Structural basis of lariat RNA recognition by the intron debranching enzyme Dbr1. *Nucleic acids research* 42: 10845–10855.
- Moran, P. & Caras, I.W. 1991. Fusion of sequence elements from non-anchored proteins to generate a fully functional signal for glycosylphosphatidylinositol membrane anchor attachment. *The Journal of cell biology* 115: 1595–1600.
- Morão, L.G., Manzine, L.R., Clementino, L.O.D., Wrenger, C. & Nascimento, A.S. 2022. A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression. *PloS one* 17: e0271403.

- Morris, G.J., Winters, L., Coulson, G.E. & Clarke, K.J. 1986. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology* 132: 2023–2034.
- Mortimer, R.K. & Johnston, J.R. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* 113: 35–43.
- Moukadiri, I., Jaafar, L. & Zueco, J. 1999. Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae* *mnn1 mnn9* double mutant by reducing agents. *Journal of bacteriology* 181: 4741–4745.
- Mrsá, V., Seidl, T., Gentsch, M. & Tanner, W. 1997. Specific Labelling of Cell Wall Proteins by Biotinylation. Identification of Four Covalently Linked O-mannosylated Proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 13: 1145–1154.
- Muñiz, M., Morsomme, P. & Riezman, H. 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* 104: 313–320.
- Muñiz, M. & Riezman, H. 2000. Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *The EMBO journal* 19: 10–15.
- Nallamsetty, S. & Waugh, D.S. 2006. Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners. *Protein expression and purification* 45: 175–182.
- Neiman, A.M. 2005. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 69: 565–584.
- Neiman, A.M. 2011. Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 189: 737–765.
- Nobel, H. de & Lipke, P.N. 1994. Is there a role for GPIs in yeast cell-wall assembly? *Trends in cell biology* 4: 42–45.
- Nobel, J.G. de, Klis, F.M., Priem, J., Munnik, T. & van den Ende, H. 1990. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 6: 491–499.
- Offley, S.R. & Schmidt, M.C. 2019. Protein phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 65: 41–55.
- Ohishi, K., Inoue, N. & Kinoshita, T. 2001. PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. *The EMBO journal* 20: 4088–4098.
- Ohishi, K., Inoue, N., Maeda, Y., Takeda, J., Riezman, H. & Kinoshita, T. 2000. *Gaa1p* and *gpi8p* are components of a glycosylphosphatidylinositol (GPI) transamidase that mediates attachment of GPI to proteins. *Molecular biology of the cell* 11: 1523–1533.
- Orlean, P. 2012. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* 192: 775–818.

- Orlean, P. & Menon, A.K. 2007. Thematic review series: Lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycosphospholipids. *Journal of lipid research* 48: 993–1011.
- Osumi, M. 1998. The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. *Micron* (Oxford, England : 1993) 29: 207–233.
- Ouyang, H., Du, T., Zhou, H., Wilson, I.B.H., Yang, J., Latgé, J.-P. & Jin, C. 2019. *Aspergillus fumigatus* phosphoethanolamine transferase gene *gpi7* is required for proper transportation of the cell wall GPI-anchored proteins and polarized growth. *Scientific reports* 9: 5857.
- Packeiser, A.N., Urakov, V.N., Polyakova, Y.A., Shimanova, N.I., Shcherbukhin, V.D., Smirnov, V.N. & Ter-Avanesyan, M.D. 1999. A novel vacuolar protein encoded by *SSU21 / MCD4* is involved in cell wall integrity in yeast. *Yeast* (Chichester, England) 15: 1485–1501.
- Pathak, R., Blank, H.M., Guo, J., Ellis, S. & Polymenis, M. 2007. The Dcr2p phosphatase destabilizes Sic1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* 361: 700–704.
- Paulick, M.G. & Bertozzi, C.R. 2008. The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* 47: 6991–7000.
- Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B.L., Salazar, G.A., Bileschi, M.L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D.H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D.A., Orengo, C.A., Pandurangan, A.P., Rivoire, C., Sigrist, C.J.A., Sillitoe, I., Thanki, N., Thomas, P.D., Tosatto, S.C.E., Wu, C.H. & Bateman, A. 2023. InterPro in 2022. *Nucleic acids research* 51: D418-D427.
- Peake, I. 1989. The polymerase chain reaction. *Journal of clinical pathology* 42: 673–676.
- Peter, J., Chiara, M. de, Friedrich, A., Yue, J.-X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freel, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J.-M., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G. & Schacherer, J. 2018. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature* 556: 339–344.
- Pittet, M. & Conzelmann, A. 2007. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1771: 405–420.
- Pomorski, T. & Menon, A.K. 2006. Lipid flippases and their biological functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63: 2908–2921.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P. & Vai, M. 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *gpp1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 179: 463–469.
- Ragni, E., Sipiczki, M. & Strahl, S. 2007. Characterization of Ccw12p, a major key player in cell wall stability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (Chichester, England) 24: 309–319.
- Rasheed, M., Kumar, N. & Kaur, R. 2020. Global Secretome Characterization of the Pathogenic Yeast *Candida glabrata*. *Journal of proteome research* 19: 49–63.

- Reggiori, F., Canivenc-Gansel, E. & Conzelmann, A. 1997. Lipid remodeling leads to the introduction and exchange of defined ceramides on GPI proteins in the ER and Golgi of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 16: 3506–3518.
- Reynolds, C.H. 2014. Protein-ligand cocrystal structures: We can do better. *ACS medicinal chemistry letters* 5: 727–729.
- Reynolds, T.B. & Fink, G.R. 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* (New York, N.Y.) 291: 878–881.
- Richie, D.L., Hartl, L., Aimaniananda, V., Winters, M.S., Fuller, K.K., Miley, M.D., White, S., McCarthy, J.W., Latgé, J.-P., Feldmesser, M., Rhodes, J.C. & Askew, D.S. 2009. A role for the unfolded protein response (UPR) in virulence and antifungal susceptibility in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens* 5: e1000258.
- Richter, K., Haslbeck, M. & Buchner, J. 2010. The heat shock response: Life on the verge of death. *Molecular cell* 40: 253–266.
- Rodriguez-Gallardo, S., Sabido-Bozo, S., Ikeda, A., Araki, M., Okazaki, K., Nakano, M., Aguilera-Romero, A., Cortes-Gomez, A., Lopez, S., Waga, M., Nakano, A., Kurokawa, K., Muñoz, M. & Funato, K. 2022. Quality-controlled ceramide-based GPI-anchored protein sorting into selective ER exit sites. *Cell reports* 39: 110768.
- Rowley, A., Johnston, G.C., Butler, B., Werner-Washburne, M. & Singer, R.A. 1993. Heat shock-mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1034–1041.
- Ruotolo, R., Marchini, G. & Ottonello, S. 2008. Membrane transporters and protein traffic networks differentially affecting metal tolerance: A genomic phenotyping study in yeast. *Genome biology* 9: R67.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463–5467.
- Sanz, A.B., Díez-Muñoz, S., Moya, J., Petryk, Y., Nombela, C., Rodríguez-Peña, J.M. & Arroyo, J. 2022. Systematic Identification of Essential Genes Required for Yeast Cell Wall Integrity: Involvement of the RSC Remodelling Complex. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland) 8:
- Schrick, K., Garvik, B. & Hartwell, L.H. 1997. Mating in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of the pheromone signal transduction pathway in the chemotropic response to pheromone. *Genetics* 147: 19–32.
- Schwob, E., Böhm, T., Mendenhall, M.D. & Nasmyth, K. 1994. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79: 233–244.
- Sieber, B., Coronas-Serna, J.M. & Martin, S.G. 2023. A focus on yeast mating: From pheromone signaling to cell-cell fusion. *Seminars in cell & developmental biology* 133: 83–95.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D. & Higgins, D.G. 2011. Fast, scalable generation of high-

- quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7: 539.
- Sikorska, N., Lemus, L., Aguilera-Romero, A., Manzano-Lopez, J., Riezman, H., Muñiz, M. & Goder, V. 2016. Limited ER quality control for GPI-anchored proteins. *The Journal of cell biology* 213: 693–704.
- Sikorski, R.S. & Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19–27.
- Sipos, G., Puoti, A. & Conzelmann, A. 1995. Biosynthesis of the side chain of yeast glycosylphosphatidylinositol anchors is operated by novel mannosyltransferases located in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Journal of Biological Chemistry* 270: 19709–19715.
- Smith, A.E., Zhang, Z., Thomas, C.R., Moxham, K.E. & Middelberg, A.P. 2000. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 9871–9874.
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31–40.
- Smits, G.J., Kapteyn, J.C., van den Ende, H. & Klis, F.M. 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Current opinion in microbiology* 2: 348–352.
- Sprague, G.F. 1977. Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in pyruvate kinase activity. *Journal of bacteriology* 130: 232–241.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* 189: 113–130.
- Suh, S.-O., Blackwell, M., Kurtzman, C.P. & Lachance, M.-A. 2006. Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts. *Mycologia* 98: 1006–1017.
- Takeda, J. & Kinoshita, T. 1995. GPI-anchor biosynthesis. *Trends in biochemical sciences* 20: 367–371.
- Taron, C.H., Wiedman, J.M., Grimme, S.J. & Orlean, P. 2000. Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis defects in *Gpi11p*- and *Gpi13p*-deficient yeast suggest a branched pathway and implicate *gpi13p* in phosphoethanolamine transfer to the third mannose. *Molecular biology of the cell* 11: 1611–1630.
- Tashima, Y., Taguchi, R., Murata, C., Ashida, H., Kinoshita, T. & Maeda, Y. 2006. PGAP2 is essential for correct processing and stable expression of GPI-anchored proteins. *Molecular biology of the cell* 17: 1410–1420.
- Terrance, K. & Lipke, P.N. 1981. Sexual agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 148: 889–896.

- Thevelein, J.M. & Winde, J.H. de 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 33: 904–918.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22: 4673–4680.
- Timmermans, B., Las Peñas, A. de, Castaño, I. & van Dijck, P. 2018. Adhesins in *Candida glabrata*. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* 4:
- Toh-e, A., Yasunaga, S., Nisogi, H., Tanaka, K., Oguchi, T. & Matsui, Y. 1993. Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast (Chichester, England)* 9: 481–494.
- Umemura, M., Fujita, M., Yoko-O, T., Fukamizu, A. & Jigami, Y. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* CWH43 is involved in the remodeling of the lipid moiety of GPI anchors to ceramides. *Molecular biology of the cell* 18: 4304–4316.
- Umemura, M., Okamoto, M., Nakayama, K.-i., Sagane, K., Tsukahara, K., Hata, K. & Jigami, Y. 2003. GWT1 gene is required for inositol acylation of glycosylphosphatidylinositol anchors in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 278: 23639–23647.
- UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023 2023. *Nucleic acids research* 51: D523–D531.
- van Mulders, S.E., Christianen, E., Saerens, S.M.G., Daenen, L., Verbelen, P.J., Willaert, R., Verstrepen, K.J. & Delvaux, F.R. 2009. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 9: 178–190.
- Vannini, G.L., Poli, F., Donini, A. & Pancaldi, S. 1983. Effects of Congo red on wall synthesis and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Science Letters* 31: 9–17.
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D. & Velankar, S. 2022. AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research* 50: D439–D444.
- Vazquez, H.M., Vionnet, C., Roubaty, C. & Conzelmann, A. 2014. Cdc1 removes the ethanolamine phosphate of the first mannose of GPI anchors and thereby facilitates the integration of GPI proteins into the yeast cell wall. *Molecular biology of the cell* 25: 3375–3388.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A. & Ballester, R. 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 13804–13809.

- Vidair, C.A., Huang, R.N. & Doxsey, S.J. 1996. Heat shock causes protein aggregation and reduced protein solubility at the centrosome and other cytoplasmic locations. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 12: 681–695.
- Vogt, M.S., Schmitz, G.F., Varón Silva, D., Mösch, H.-U. & Essen, L.-O. 2020. Structural base for the transfer of GPI-anchored glycoproteins into fungal cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117: 22061–22067.
- Watanabe, R., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N. & Kinoshita, T. 1999. Mammalian PIG-L and its yeast homologue Gpi12p are N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylases essential in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *The Biochemical journal* 339 (Pt 1): 185–192.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M. & Barton, G.J. 2009. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25: 1189–1191.
- Watzel, M., Klis, F. & Tanner, W. 1988. Purification and characterization of the inducible α agglutinin of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 7: 1483–1488.
- Weiner, M.P., Costa, G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. & Bauer, J.C. 1994. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151: 119–123.
- Welihinda, A.A. & Kaufman, R.J. 1996. The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* 271: 18181–18187.
- Wilson, D.S. & Keefe, A.D. 2001. Random mutagenesis by PCR. *Current protocols in molecular biology Chapter 8: Unit8.3*.
- Worsfold, P.J., Townshend, A. & Poole, C.F. 2010. *Encyclopedia of analytical science*. Elsevier, [S.l.].
- Wu, H., Ng, B.S.H. & Thibault, G. 2014. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Bioscience reports* 34:
- Wysocki, R. & Tamás, M.J. 2010. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS microbiology reviews* 34: 925–951.
- Yadav, U. & Khan, M.A. 2018. Targeting the GPI biosynthetic pathway. *Pathogens and global health* 112: 115–122.
- Yan, W. & Craig, E.A. 1999. The glycine-phenylalanine-rich region determines the specificity of the yeast Hsp40 Sis1. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7751–7758.
- Yang, G. & Banfield, D.K. 2020. Cdc1p is a Golgi-localized glycosylphosphatidylinositol-anchored protein remodelase. *Molecular biology of the cell* 31: 2883–2891.

- Yin, Q.Y., Groot, P.W.J. de, Dekker, H.L., Jong, L. de, Klis, F.M. & Koster, C.G. de 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: Identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *Journal of Biological Chemistry* 280: 20894–20901.
- Yin, Q.Y., Groot, P.W.J. de, Jong, L. de, Klis, F.M. & Koster, C.G. de 2007. Mass spectrometric quantitation of covalently bound cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 7: 887–896.
- Yofe, I., Weill, U., Meurer, M., Chuartzman, S., Zalckvar, E., Goldman, O., Ben-Dor, S., Schütze, C., Wiedemann, N., Knop, M., Khmelinskii, A. & Schuldiner, M. 2016. One library to make them all: Streamlining the creation of yeast libraries via a SWAp-Tag strategy. *Nature methods* 13: 371–378.
- Yoko-O, T., Ichikawa, D., Miyagishi, Y., Kato, A., Umemura, M., Takase, K., Ra, M., Ikeda, K., Taguchi, R. & Jigami, Y. 2013. Determination and physiological roles of the glycosylphosphatidylinositol lipid remodelling pathway in yeast. *Molecular microbiology* 88: 140–155.
- Yoko-O, T., Umemura, M., Komatsuzaki, A., Ikeda, K., Ichikawa, D., Takase, K., Kanzawa, N., Saito, K., Kinoshita, T., Taguchi, R. & Jigami, Y. 2018. Lipid moiety of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins contributes to the determination of their final destination in yeast. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 23: 880–892.
- Zhu, Y., Vionnet, C. & Conzelmann, A. 2006. Ethanolaminephosphate side chain added to glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor by *mcd4p* is required for ceramide remodeling and forward transport of GPI proteins from endoplasmic reticulum to Golgi. *Journal of Biological Chemistry* 281: 19830–19839.
- Zhuo, S., Clemens, J.C., Stone, R.L. & Dixon, J.E. 1994. Mutational analysis of a Ser/Thr phosphatase. Identification of residues important in phosphoesterase substrate binding and catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 269: 26234–26238.
- Zlotnik, H., Fernandez, M.P., Bowers, B. & Cabib, E. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *Journal of bacteriology* 159: 1018–1026.

7. Anhang

S.Tab. 1: Ermittelte Anteile aller identifizierten Proteine aus der Zellwandproteomanalyse

		YPD			+ Caspofungin			+ Zinksulfat		
		Wildtyp	<i>CDC1^{low*}</i>	<i>ted1Δ</i>	Wildtyp	<i>CDC1^{low*}</i>	<i>ted1Δ</i>	Wildtyp	<i>CDC1^{low*}</i>	<i>ted1Δ</i>
Cwp1	P28319	10,61	11,30	6,26	28,10	21,87	22,23	9,52	11,28	11,03
Crh1	P53301	8,51	8,58	5,45	13,02	17,56	15,46	8,33	7,75	9,12
Gas1	P22146	6,28	6,56	3,84	10,10	9,78	10,73	5,55	4,98	7,40
Gas3	Q03655	8,37	6,57	4,77	6,38	5,66	7,44	5,60	4,53	5,45
Gas5	Q08193	3,13	2,21	2,15	3,94	4,07	4,36	2,07	1,74	2,39
HSP150	P32478	11,29	9,70	7,85	5,14	6,69	7,46	8,79	11,48	11,50
Scw4	P53334	3,55	5,50	2,05	2,22	1,87	1,90	7,25	4,33	5,66
Pir3	Q03180	0,20	2,26	0,72	1,88	2,79	3,42	2,74	4,49	4,51
Pir1	Q03178	7,26	5,32	4,84	1,85	2,81	3,16	3,06	5,52	5,26
Ecm33	P38248	6,94	4,55	4,08	1,81	2,16	2,48	2,25	2,57	2,95
Cis3	P47001	5,46	4,34	3,79	1,67	2,31	2,58	3,78	4,78	4,60
Pst1	Q12355	1,39	0,94	0,75	0,98	0,87	1,41	0,60	0,39	0,68
Exg2	P52911	0,53	1,25	0,45	1,14	1,55	1,43	1,01	1,06	1,95
Crh2	P32623	2,27	1,06	1,75	0,96	0,83	0,96	0,85	0,81	1,29
Mkc7	P53379	0,67	1,24	0,53	0,86	0,94	1,12	1,32	0,93	1,31
Scw10	Q04951	1,39	1,45	0,30	0,68	0,84	0,80	2,65	1,98	2,45
Toh1	P46992	0,63	1,08	0,28	0,77	0,87	0,93	0,32	0,38	0,56
Pma1	P05030	5,51	4,13	5,84	0,46	1,31	2,11	7,84	7,43	8,95
Bgl2	P15703	0,90	0,93	0,23	0,63	0,93	1,12	0,90	0,93	0,94
Pir5	P46999	0,00	0,00	0,22	0,31	0,00	0,00	0,08	0,34	0,68
Cdc19	P00549	4,42	2,96	2,62	0,31	1,12	1,52	7,76	6,52	10,18
Tos1	P38288	1,17	1,78	0,72	0,51	0,49	0,50	1,21	1,09	1,16
Eno2	P00925	0,29	0,47	0,38	0,21	0,74	1,81	2,39	2,76	3,80
Gsc2	P40989	0,70	0,46	0,67	0,02	0,29	0,00	1,24	1,88	3,06
Fks1	P38631	1,52	1,18	0,97	0,13	0,68	0,96	3,62	3,14	4,48
Ccw14	O13547	0,96	0,14	0,11	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03
Rl13B	P40212	0,68	0,02	0,37	0,01	0,03	0,03	0,18	0,76	0,80
Bar1	P12630	0,55	0,67	0,21	0,00	0,70	0,00	0,00	0,39	0,00
Tdh3	P00359	1,52	0,77	0,54	0,12	0,67	1,03	2,88	2,13	3,94
Ssa1	P10591	0,93	0,65	0,79	0,12	0,48	0,86	0,00	3,02	3,52
Ssa2	P10592	0,95	1,25	0,95	0,06	0,93	1,11	3,26	3,29	3,66
Yps7	Q06325	0,75	1,16	0,37	1,23	1,11	1,14	0,90	0,46	0,83
Hxt6	P39003	0,10	0,87	0,19	0,10	0,25	0,55	2,02	1,24	2,01

Im folgenden sind alle in dieser Arbeit analysierten Cdc1 Reste mit mutmaßlicher Funktion der Substraterkennung- und Bindung und mit unbekannter Funktion, sowie ihre Funktionsbewertung (F (0= ersetzlich, 1-3= funktionell, 4= essentiell). Orthologe Reste aus *CtCdc1* sind in der entsprechenden Zeile aufgelistet sowie die Konservierung K zwischen Cdc1 und *CtCdc1* (1= gleicher Rest, 2= ähnlicher Rest, 3= verschiedene Reste). Die Spezifitätsbewertung S wurde berechnet anhand der Formel: $S = F * K + 1$. Reste mit einer Spezifitätsbewertung >5 gelten als spezifisch für die Cdc1-Funktion in *S. cerevisiae*.

S.Tab. 2: Cdc1 Reste und orthologe *CtCdc1* Reste sowie Bewertung der Funktion F, Konservierung K und Spezifität S

Cdc1	F	<i>CtCdc1</i>	K	S
Q97	4	Q131	1	5
M99	1	I133	2	3
D100	3	D134	1	4
E101	0	P135	3	1
S103	4	T137	2	9
D135	0	D169	1	1
D144	4	D	1	5
D147	2	D181	1	3
R150	0	R184	1	1
N151	1	E185	3	4
W157	0	W221	1	1
H184	4	H262	1	5
D185	4	D263	1	5
S227	0	S305	1	1
H259				
R264	4	R394	1	5
Q268	0	T398	3	1

Cdc1	F	<i>CtCdc1</i>	K	S
R275	4	R404	1	5
E276 K278	4	E405 Y407	1 3	9
E279	0	N426	3	1
P280 F281 P282	4	A427 I428 S429	2 2 2	9
Q284	1	S431	3	4
H287	0	Y434	3	1
Q288	0	Q435	1	1
Y289	0	Y436	1	1
Q290	3	Q437	1	4
Y289A Q290A T291A	3	Y436 Q437 N438	1 1 2	5
D296 L299	0	R443 E446	3 3	1
D315	4	D463	1	5
D314 D315 H316	4	D462 D463 H464	1	5
H318	0	Y466	3	1
H323	0	H471	1	1
N345	4	A498	3	13
S357	0	I501	3	1

8. Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnis

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit genannten Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstabencode der „*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*“ abgekürzt. Es wurden als Maßeinheiten stets das SI-Einheitensystem (*Système internationale d'unités*) verwendet.

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
5-FOA	5-Fluorotsäure	<i>MAT</i>	Paarungstyp
Abb.	Abbildung	MORF	Mutated Open Reading Frame
Ac	Acetat	MPE	Metallophosphoesterase
Amp	Ampicilin	N-terminal	Amino-terminal
AMP	Adenosinmonophosphat	Nat	Nourseothricin
bp	Basenpaare	OD	Optische Dichte
C-terminal	Carboxy-terminal	ORF	Open Reading Frame
<i>CEN</i>	Centromer-Region	P	Phosphat
CWI	Zellwandintegritätssignalweg	PE	Phosphoatidylethanolamin
DAG	Diacylglycerol	pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dNTP	Desoxinukleosidtriphosphat	R	Rest
GlcNH ₂	Glukosamin	g	Umdrehungen pro Minute
(k)Da	(kilo)Dalton	Sc	Synthetic complete
EDTA	Ethylen	SDS	Natriumdecylsulfat
<i>et. al</i>	Und andere	Tab.	Tabelle
EtNP	Ethanolaminphosphat	TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
ER	Endoplasmatisches Retikulum	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
GMP	Guanosinmonophosphat	Tris	Tris-Aminomethan
GPI	Glykosyphosphatidylinositol	Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
GST	Glutathion-S-Transferase	UPR	Unfolded Protein Response
IPC	Inositolphosphokeramid	Ura	Uracil
kan	Kanamycin	UV	Ultraviolett
Leu	Leucin	(v/v)	Volumen pro Volumen
M	Molar	(w/v)	Gewicht pro Volumen
Man	Mannose	x	unspezifischer Rest
<i>MAT</i>	Paarungstyp		
YPD	Hefeextrakt, Peptone, Dextrose		

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Lebenszyklus von <i>S. cerevisiae</i>	2
Abb. 2: Übersicht der <i>S. cerevisiae</i> Zellwand Morphologie.....	4
Abb. 3: Struktureller Aufbau von GPI.....	8
Abb. 4: Phylogenetischer Stammbaum von Proteinen mit MPE-Domäne aus <i>S. cerevisiae</i>	10
Abb. 5: Proteinsequenzalignment von Cdc1, Ted1 und Dcr2 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>C. thermophilum</i>	12
Abb. 6: 3D-Modell der Metallophosphoesterasen Cdc1, Ted1 und Dcr2.....	14
Abb. 7: Übersicht der GPI-Biosynthese.....	15
Abb. 8: Konstruktion von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen zur Etablierung eines <i>Plasmid Shuffling</i> Systems für Cdc1, Ted1 und Dcr2.....	21
Abb. 9: Stammset zur Gendosis-abhängigen phänotypischen Analyse von Cdc1, Ted1 und Dcr2...	22
Abb. 10: Wachstumsanalyse des <i>CDC1</i> -, <i>TED1</i> - und <i>DCR2</i> -Stammsets in Flüssigkultur.....	23
Abb. 11: Phänotypische Analyse des Mengen spezifischen <i>CDC1</i> -, <i>TED1</i> - und <i>DCR2</i> - Stammsets unter Zellwandstress.....	24
Abb. 12: Biofilmbildung des <i>CDC1</i> -, <i>TED1</i> - und <i>DCR2</i> -Stammsets.....	27
Abb. 13: Stammset für die systematische phänotypische Analyse von GPI-Biosynthese Deletionsmutanten.....	29
Abb. 14: Wachstumsanalyse verschiedener <i>CWH43</i> -abhängiger GPI-Biosynthese Deletionsmutanten unter Zellwand- und Membranstress.....	30
Abb. 15: Agaradhäsion der verschiedenen GPI-Biosynthese Deletionsmutanten.....	31
Abb. 16: Biofilm verschiedener GPI-BDeletionsmuatnten auf halbfesten Oberflächen.....	32
Abb. 17: Zellwandproteomanalyse von <i>CDC1^{ow*}</i> und <i>ted1Δ</i> unter verschiedenen Zellwandstressen	35
Abb. 18: Flusschema zur Identifizierung geeigneter Parameter für die rekombinante Synthese von Cdc1 und Ted1.....	38
Abb. 19: Produktion und Reinigung von ScCdc1 und ScTed1 im präparativen Maßstab.....	40
Abb. 20: Größenausschlusschromatographie von ScTed1.....	41
Abb. 21: Funktionelle Sets der 66 ausgewählten Cdc1-, Ted1- und Dcr2-Mutanten.....	43
Abb. 22: Komplementationsanalyse der 66 Cdc1, Ted1 und Dcr2-Mutanten durch <i>Plasmid Shuffling</i>	45
Abb. 23: Phänotypische Wachstumsanalyse der Cdc1-Varianten auf verschiedenen Zellwandstressen	48
Abb. 24: Phänotypische Wachstumsanalyse der Ted1-Varianten auf verschiedenen Zellwandstressen	49
Abb. 25: Phänotypische Wachstumsanalyse der Dcr2-Varianten auf verschiedenen Zellwandstressen	50
Abb. 26: Komeplementationsanalyse von MPE-Chimären aus Cdc1, Ted1 und Dcr2.....	51
Abb. 27: Strukturmodelle von Cdc1 und Ted1 aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>C. thermophilum</i> im Vergleich	53
Abb. 28: Komplementationsanalyse mit Cdc1 und Ted1 Orthologen mit <i>Chaetomium thermophilum</i>	54
Abb. 29: Flusschema zur Herstellung einer Cdc1 ^{MORF} Variante mittels <i>in vitro</i> Evolution.....	55
Abb. 30: Komplementationsanalyse von Cdc1 ^{MORF} unter Zink ²⁺ -Stress.....	56
Abb. 31: Modell von Cdc1 ^{MORF}	57
Abb. 32: Domänenkartierung von Cdc1 ^{MORF} Varianten in verschiedenen Stammhintergründen.....	59
Abb. 33: <i>Fine Mapping</i> der MPE-lokaliserten Mutationen aus Cdc1 ^{MORF}	61

Abb. 34: Zusammenfassung des Stress-spezifischen Transports GPI-verankerter Zellwandproteine65
Abb. 35: Zusammenfassung aller funktionell charakterisierten Reste von Cdc1, Ted1 und Dcr2.....73
Abb. 36: Detailaufnahme aller getesteten Reste mit mutmaßlicher Substratbindefunktion.....75
Abb. 37: Spezifitätsbewertung ausgewählter analysierter Reste von Cdc1.....80

9. Danksagung

Ein ehrlich richtig dickes Danke an...

... Prof. Dr. Mösch für die Anstellung als Doktorandin, die fachliche Unterstützung und die schöne Zeit, die ich in seiner Arbeitsgruppe hatte.

... Prof. Dr. Essen für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die exzellenten Hilfestellungen bei der Struktur-basierten Analyse.

... Prof. Dr. Randau und Prof. Dr. Thanbichler für ihren Platz im Prüfungskomitee.

... Dr. Christof Taxis für sein Know How und seine zahlreichen Tipps bei der Überwindung technischer Probleme

... die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Essen für Hilfestellungen und Anregungen in Bezug auf biochemische Techniken, die Reparatur der ÄKTA und *C. thermophilum* cDNA

... Dr. Thomas Heimerl für das Anfertigen elektronenmikroskopischer Aufnahmen meiner Hefestämme

... der AG Mösch mit ihren aktuellen und ehemaligen Mitgliedern für die persönliche Atmosphäre und für die wirklich schöne Zeit, die ich mit euch hatte:

... Herrn Doktor Brückner für seine immer willkommene konstruktive Kritik, emotionale Unterstützung und all die E-Mails, mit denen ich sein Postfach zumüllen durfte. Dankbar bin ich auch für die endlos guten Diskussionen über Glasperlen, Drigalski-Spatel und 6 µl-Transformationen.

... Daniela Störmer für ihre technisch versierte Erfahrung und die gute Unterhaltung.

... Isolde Kranz und Govert Junker für ihre unentbehrliche Hilfe im Kampf gegen die Unordnung auf meinem Arbeitsplatz.

... Philipp und Carmen Schöppner für die guten Gespräche und netten Abende in ihrem Wohnzimmer.

... meinen Bachelorstudent_innen Amon, Lara und Clara für ihr Interesse und gute Arbeit.

... meiner Masterstudentin Isabella Reitmeier, weil ich unglaublich viel Spaß hatte mit ihr zu arbeiten und auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

... Frau Dr. Sophia Hasi Hasenjäger: Lobet das Hasi! GLEICH ERST MAL KUCHEN! Auch danke ich ihr für das ausführliche Korrekturlesen meiner Arbeit. (Lobet es!).

... meine Mami, weil sie immer Unterstützung und Selbstvertrauen gegeben hat.

... meinen Opa Mahmud für seine inspirierende Art.

10. Lebenslauf

Sabrina Friederichs

Geburtsdatum: 21.04.1994

Geburtsort: Clausthal-Zellerfeld

Berufliche Erfahrung

03/2019- 09/2023 - Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Philipps-Universität Marburg

Wissenschaftlicher Werdegang

03/2019- 10/2023 - Promotion am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg

bei Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Schwerpunkte: Proteinbiochemie, Genetik, strukturbasierte Analyse, Funktionsanalyse, *S. cerevisiae*, *in vitro* Evolution, Zellwandproteomanalysen

10/2016- 09/2018 – M.Sc. Studium Molecular and Cellular Biology an der Philipps-Universität Marburg

Schwerpunkte der Masterarbeit: Bindungsstudien an menschlichen Zelllinien, Proteinbiochemie, Genetik, *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, Zellkulturen

10/2013- 09/2016 – B.Sc. Studium Biologie an der Philipps Universität Marburg

Schwerpunkte der Bachelorarbeit: Genetik, Bindungsstudien an abiotischen Oberflächen, *S. cerevisiae*, *C. glabrata*

