

**Charakterisierung des lignocellulolytischen  
Degradationssystems des xylobiontischen  
*Phanerochaete chrysosporium* (Basidiomycota)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) im Fachbereich 10,  
Mathematik und Naturwissenschaften, Institut für Biologie,  
Universität Kassel

vorgelegt von  
Torsten Bernauer

Datum der Disputation: 19.05.2016

1. Prüfer: Prof. Dr. Ewald Langer
2. Prüfer: Prof. Dr. Friedrich W. Herberg
3. Prüfer: Prof. Dr. Kurt Weising
4. Prüfer: Prof. Dr. Rüdiger Wagner

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	4
2. Zielsetzung .....	15
3. Material und Methoden .....	16
3.1 Material .....	16
3.1.1 Kulturmedien.....	16
3.1.2 Puffer und Lösungen .....	18
3.2 Kultivierungsmethoden .....	19
3.2.1 Anzucht der Kulturen .....	19
3.3 molekularbiologische Methoden .....	21
3.3.1 Protein-Extraktion (nach Abbas et al. 2005; Sato et al. 2007; Millipore 2007).....	21
3.3.2 1D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE) .....	21
3.3.3 Protein-in-Gel-Verdau und nano-LC-ESI-MS/MS .....	22
3.3.4 Identifizierung der Proteine mit Hilfe von Genom- und Proteindatenbanken .....	23
4. Ergebnisse .....	24
4.1 Fermentierung .....	24
4.2 Isolierung des extrazellulären Proteoms, 1D-PAGE und Aufreinigung .....	27
4.3 Identifizierung der Proteine mit Hilfe von Genom- und Proteindatenbanken .....	30
4.4 Charakterisierung des Proteoms von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	38
4.4.1 Proteom über Rotbuchen-Holzpuder, 1. Kultivierung .....	44
4.4.2 Proteom über Fichten-Holzpuder, 1. Kultivierung.....	49
4.4.3 Proteom über Rotbuchen-Holzpuder, biologische Reproduktion, 1 Woche Anzucht	55
4.4.4 Proteom über Rotbuchen-Holzpuder, biologische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht	60
4.4.5 Proteom über Fichten-Holzpuder, biologische Reproduktion, 1 Woche Anzucht.....	65
4.4.6 Proteom über Fichten-Holzpuder, biologische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht....	70
4.4.7 Proteom über Rotbuchen-Holzpuder, technische Reproduktion, 1 Woche Anzucht..	75
4.4.8 Proteom über Rotbuchen-Holzpuder, technische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht	81
4.4.9 Proteom über Fichten-Holzpuder, technische Reproduktion, 1 Woche Anzucht .....	87
4.4.10 Proteom über Fichten-Holzpuder, technische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht .....	92
5. Diskussion .....	97
5.1 Verifizierung und Ergänzung des extrazellulären Enzymkomplexes für <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	97
5.2 die Rolle der sekretierten Proteine der einzelnen Stoffwechselwege.....	102
5.2.1 Pektinasen und Oxalat-Decarboxylase.....	102
5.2.2 Proteasen und der Stickstoff-Stoffwechsel .....	103
5.2.3 Proteine weiterer Stoffwechselwege .....	105
5.2.4 Hydrolasen und der Cellulose- und Hemicellulose-Stoffwechsel.....	105
5.2.5 Peroxidasen und der Lignin-Stoffwechsel .....	106
5.2.6 Proteine, die oxidativen Stress anzeigen .....	107
5.3 Schwierigkeiten bei der Protein-Identifizierung mittels Datenbanken und Massenspektrometrie.....	107
6. Schlussfolgerung und Ausblick.....	109
7.1 Zusammenfassung .....	112
7.2 Summary .....	113
8. Literaturverzeichnis.....	115
9. Abbildungsverzeichnis .....	124
10. Tabellenverzeichnis.....	127
11. Danksagung .....	128
12. Erklärung.....	130

## 1. Einleitung

Der Ligno-Cellulose abbauende Pilz *Phanerochaete chrysosporium* zählt zu den effizienten Lignin degradierenden Mikroorganismen. Natürliche Vorkommen der vermutlich zirkumpolar in der temperaten Zone verbreiteten Art wurden bisher für Nordamerika, Europa und den Iran beschrieben (Burdsall Jr. et al. 1974, Burdsall Jr. 1985, Eriksson et al. 1978, Thelen 1996). Der Basidiomycet, der molekularsystematisch in das phlebioide Subclade im polyporoiden Clade eingeordnet wird, ist makromorphologisch durch einen resupinaten, weißlich bis gelblichen oder hellbraunen Fruchtkörper charakterisiert (Binder et al. 2005, Burdsall Jr. 1985). Als Saprophyt ernährt sich *Phanerochaete chrysosporium* von totem organischem Material, also Laub und heruntergefallenen Hartholzweigen, z. B. der Gattungen *Picea*, *Pinus*, *Betula*, *Fagus*, *Acer* oder *Quercus*. Während der Holzdegradation werden Cellulose und Hemicellulose durch eine Vielzahl von Mikroorganismen zersetzt. Lignin ist sehr schwer und hauptsächlich von Pilzen abbaubar (Baker 1973, Crawford et al. 1980). Im Gegensatz zu anderen Pilzarten ist *Phanerochaete chrysosporium* in der Lage, Lignin komplett in Kohlendioxid umzusetzen und dadurch Kohlenhydratpolymere als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Kirk et al. 1987, Martinez et al. 2004). Die den Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwände bildenden Cellulosefasern sind dabei in einem System von Makrofibrillen angeordnet, die wiederum aus Mikrofibrillen aufgebaut sind. In den Micellen, die jene bilden, befinden sich parallele und gitterartig angeordnete Cellulosemoleküle, die der Zellwand ihre kristalline Eigenschaft verleihen (Abb. 1.1) (Pastusiak 2003, Raven et al. 2006, Strasburger et al. 2002).

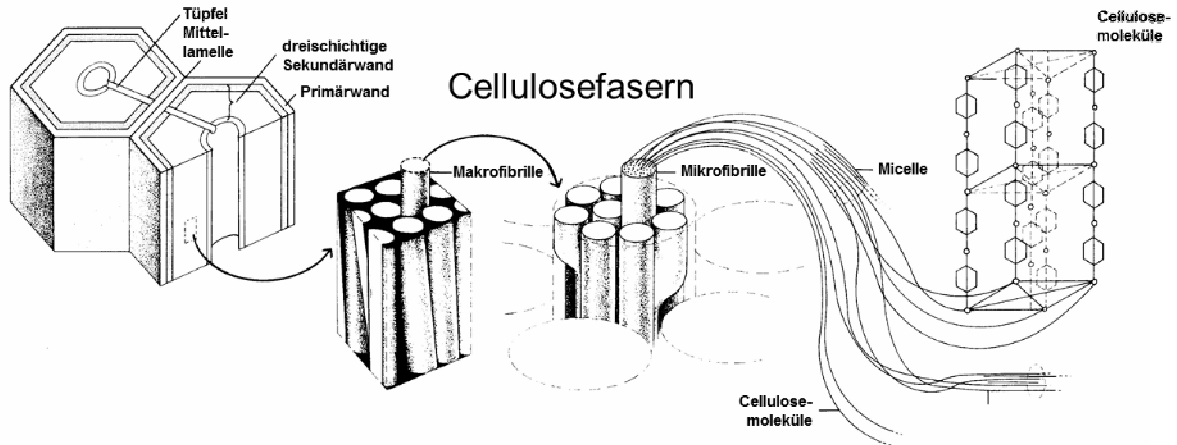


Abb. 1.1: Anordnung der Cellulose in der Zellwand der Pflanzen (verändert nach Raven et al. 2006)

Das Lignin, das aus 3D-Phenylpropanoiden besteht, befindet sich zwischen den Makro- und Mikrofibrillen und gibt der Zellwand Festigkeit - vergleichbar mit Stahlbeton, bei dem der Stahl der Cellulose und der Beton dem Lignin entspricht. Den Angriffspunkt bei der Lignin-Depolymerisation der Pilze stellt die Aryletherbindung zwischen dem  $\beta$ -Kohlenstoffatom der Seitenkette und dem Phenylring dar (Adler 1977, Pastusiak 2003, Raven et al. 2006, Strasburger et al. 2002, van Rensburg et al. 2000). Der strukturelle Aufbau des Lignins wird in Abbildung 1.2 gezeigt.

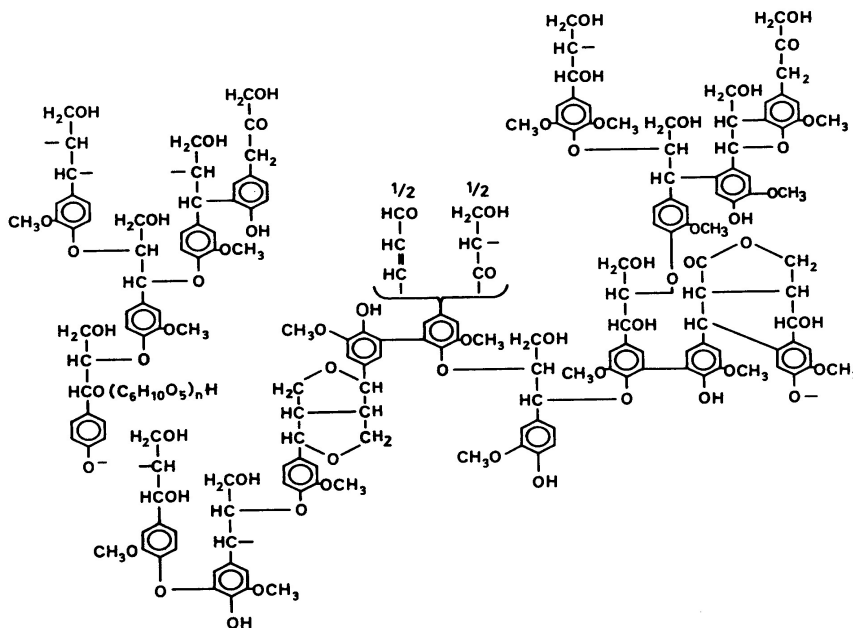


Abb. 1.2: Struktur des Lignins (Strasburger et al. 2002)

Das Genom von *Phanerochaete chrysosporium* wurde von Martinez et al. (2004) vollständig sequenziert. Hierbei handelt es sich um die Entschlüsselung des ersten Basidiomyceten mit knapp 12.000 Genen. Dies bildete die Grundlage für die Erforschung des Proteoms, das bei *Phanerochaete chrysosporium* vom genannten Autor auf 500.000 bis 1.000.000 Proteinspezies geschätzt wird.

*Phanerochaete chrysosporium* besitzt zwei Eigenschaften, die die Art für viele biotechnologische Anwendungen einsetzbar machen:

Sie baut die Cellulose des Holzes unter natürlichen Bedingungen kaum ab und besitzt eine sehr hohe Optimaltemperatur von ca. 40°C. Deshalb können ihre Enzyme für eine industrielle, energiesparende und Umweltverschmutzung vermeidende Herstellung von Papier und Textilien verwendet werden (Schmidt 2006, Thelen 1996). Außerdem wird dieser Pilz für die Giftmüll-Sanierung eingesetzt, da die oxidativen, Lignin abbauenden Enzyme ebenfalls in der Lage sind, ähnliche aromatische Verbindungen umzuwandeln, wie sie in explosiven Kontaminanten, Pestiziden und toxischem Abfall zu finden sind, z. B. Polychlorierte Biphenyle (PCBs, z. B. Dioxine und Furane), Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs, Benzopyrene) oder Aniline (Arjmand et al. 1985, Bogan et al. 1996, Brodkorb et al. 1992, Bumpus et al. 1987, Bumpus et al. 1994, Davis et al. 1993, Lamar et al. 1990, Manimekalai et al. 2000, Pieper et al. 1992, Schmidt 2006, Servent et al. 1991, Takada et al. 1996, Thelen 1996, Valli et al. 1991, Valli et al. 1992). Weiterhin ist die Art in der Lage, Phenolharz-Polymere biologisch abzubauen, was noch vor wenigen Jahren für nicht möglich gehalten wurde (Gusse et al. 2006).

Im Folgenden wird der aktuelle Wissensstand über die extrazellulären Ligno-Cellulose abbauenden Enzyme bei *Phanerochaete chrysosporium* dargestellt:

Der Pilz produziert verschiedene extrazelluläre, oxidative und hydrolytische Proteine für den Abbau der Cellulose, Hemicellulose, des Lignins und Pektins (Kirk et al. 1998). Diese Enzyme können in 6 Gruppen unterteilt werden (Abbas et al. 2005, Martinez et al. 2004, Sato et al. 2007, Sato et al. 2009):

- Endoglucanasen, Exoglucanasen und  $\beta$ -Glucosidasen des extrazellulären Cellulose-Abbausystems,
- Lignin- und Mangan-Peroxidasen und die Glyoxaloxidase und Mannose-6-phosphatase des extrazellulären Lignin-Depolymerisationssystems,
- die Cellobiose-Dehydrogenase, die am Abbau von Cellulose, Hemicellulose und Lignin beteiligt ist,
- Endoxylanasen und  $\beta$ -Xylosidasen des extrazellulären Hemicellulose-Abbausystems,
- Galaktosidasen des extrazellulären Pektin-Abbausystems und
- verschiedene extrazelluläre Proteasen.

Das extrazelluläre Cellulose-Abbausystem, das in Abb. 1.3 schematisch dargestellt ist, besteht aus folgenden Enzymtypen (Kirk et al. 1998, Renganathan et al. 1990, Yoshida et al. 2004):

- Endocellulasen trennen die inneren Verbindungen, um die kristalline Struktur der Cellulose auseinander zu brechen und einzelne Cellulose-Polysaccharidketten freizusetzen.
- Exocellulasen spalten 2-4 Einheiten (Di- oder Tetrasaccharide, wie z. B. Cellobiose oder Cellotetrose) von den reduzierten oder nicht reduzierten Enden der freigesetzten Ketten.
- Cellobiasen oder  $\beta$ -Glucosidasen hydrolysieren das Exocellulase-Produkt zu einzelnen Monosacchariden (z. B. Glucose) durch die Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen den beiden Glucosemolekülen der Cellobiose (Lyman et al. 1995).
- Das Cellobiase-Produkt, die Glucose, wird schließlich im Pentosephosphat-Weg bzw. der Glykolyse weiter umgesetzt.

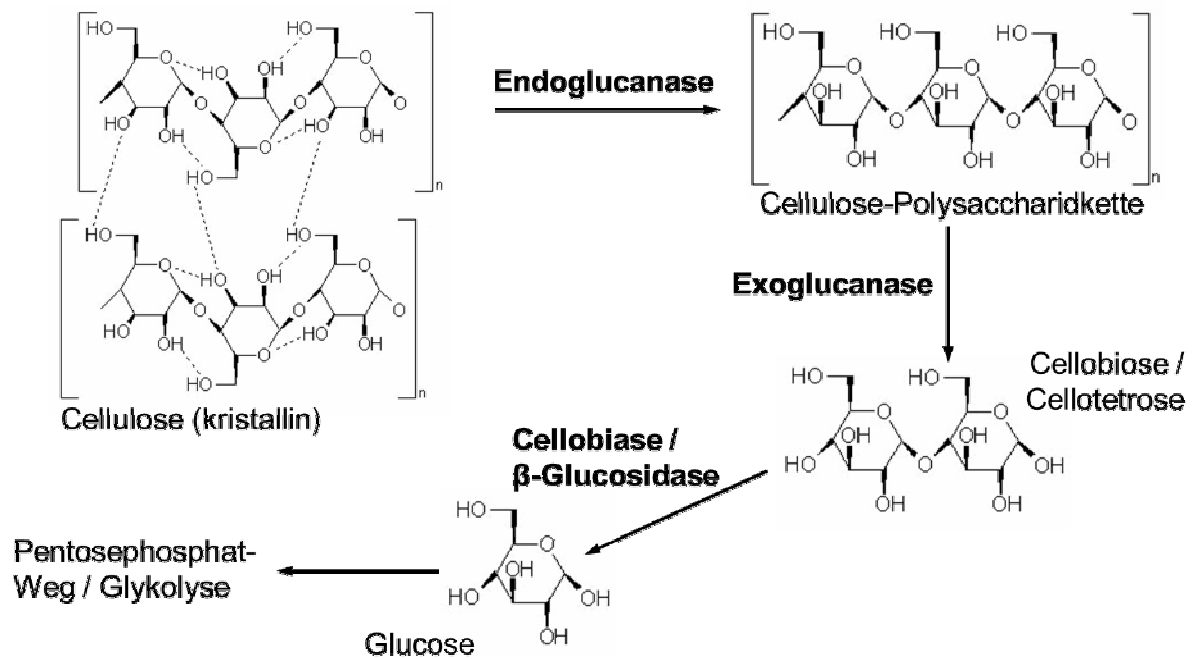


Abb. 1.3: Schema des extrazellulären Cellulose-Abbausystems bei *Phanerochaete chrysosporium* (verändert nach Renganathan et al. 1990, Yoshida et al. 2004)

Das extrazelluläre Lignin-Depolymerisationssystem umfasst hauptsächlich Lignin- und Mangan-abhängige Peroxidasen (Gold et al. 1993, Kersten et al. 2007, Kirk et al. 1987, Kirk et al. 1998, Orth et al. 1991, Peters 2004, Schmidt 2006, Singh et al. 2008):

- Die **Lignin-Peroxidase** katalysiert die Oxidation von phenolischen Verbindungen während der Delignifikation (Abb. 1.4). 3 Induktoren veranlassen dabei die Katalyse der Reaktion:
  - Der Pilz produziert eine Glyoxaloxidase, die die Produktion von **Wasserstoffperoxid** aus Sauerstoff katalysiert.
  - Die Reaktion des **Veratrylalkohols** mit dem Wasserstoffperoxid bedingt eine extrazelluläre posttranslationale Methylierung der Lignin-Peroxidase.
  - Die **Mannose-6-Phosphatase**, die ebenfalls vom Pilz produziert wird, bedingt eine extrazelluläre posttranslationale Phosphorylierung.

Gemeinsam mit der Methylierung aktiviert sie die Lignin-Peroxidase und die Delignifikation.



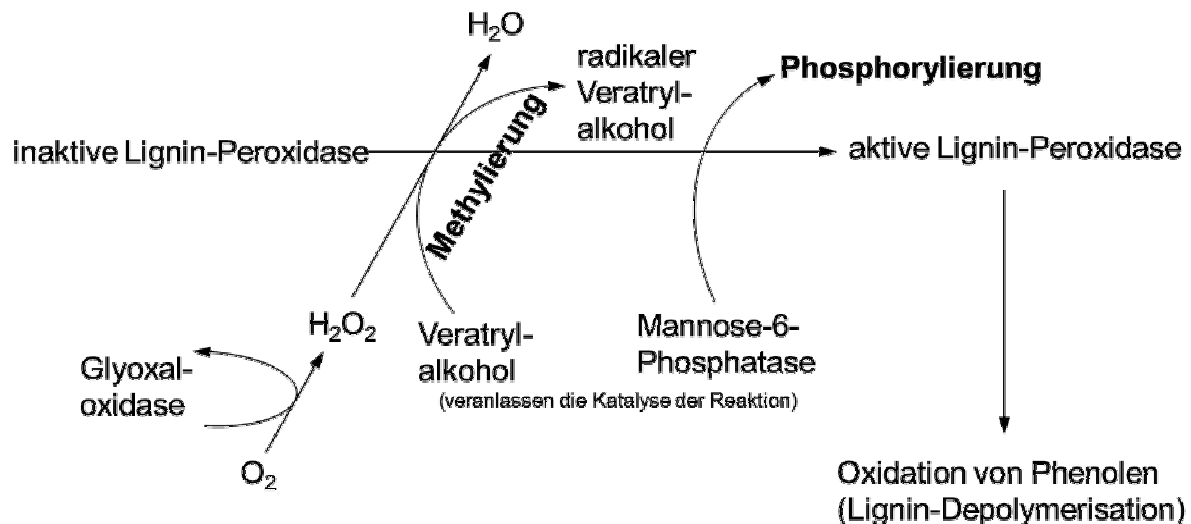


Abb. 1.4: Extrazelluläres Lignin-Depolymerisationssystem unter Beteiligung der Lignin-Peroxidase bei *Phanerochaete chrysosporium* (verändert nach Kersten et al. 2007, Singh et al. 2008)

- Im Gegensatz zur Lignin-Peroxidase katalysiert die **Mangan-abhängige Peroxidase (MnP)** die Oxidation der phenolischen Verbindungen indirekt (Abb. 1.5) (Gold et al. 1993, Kersten et al. 2007, Kirk et al. 1987, Kirk et al. 1998, Orth et al. 1991, Peters 2004, Schmidt 2006, Singh et al. 2008):
  - Das von der **Glyoxaloxidase** produzierte Wasserstoffperoxid oxidiert die **MnP**, um eine **MnP-Verbindung I** zu bilden.
  - Diese Verbindung I formt einen Komplex mit Mangan, die **MnP-Verbindung II**, durch eine erste Chelatbildung mit organischen Säuren, wie Oxalaten oder Malonaten.
  - Nach der 2. Chelatbildung ist das Mangan stabilisiert und diffundiert von der Oberfläche der MnP als ein **Mangan-Chelator II-Komplex**, um das phenolische Substrat während der Delignifikation zu oxidieren. Die MnP kehrt in den Ruhezustand zurück und kann nun einen weiteren Zyklus durchlaufen.

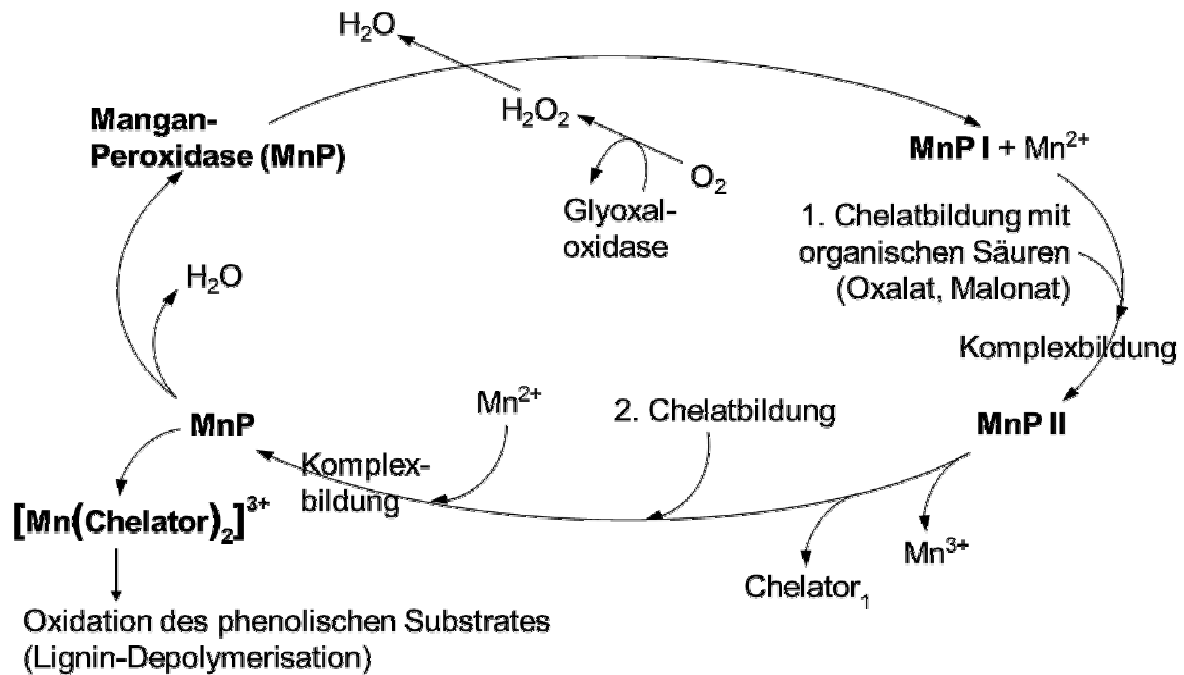


Abb. 1.5: Fließschema des extrazellulären Ligninabbaus durch die MnP bei *Phanerochaete chrysosporium* (verändert nach Kersten et al. 2007, Singh et al. 2008)

Entsprechend der produzierten lignolytischen Enzyme können 5 Gruppen an Weißfäule-Pilzen unterschieden werden (Hatakka 1994):

- die Mangan-abhängige (**MnP**) und Lignin-Peroxidase (**LiP**)-Gruppe,
- die Lignin-Peroxidase (**LiP**)- und Laccase (**LAC**)-Gruppe,
- die Mangan-abhängige Peroxidase (**MnP**)- und Laccase (**LAC**)-Gruppe,
- die Mangan-abhängige-Lignin-Peroxidase (**MnP-LiP**)- und Laccase (**LAC**)-Gruppe sowie
- die Gruppe der **Streuzersetzer** (Mangan-abhängige Peroxidase (**MnP**) und Laccase (**LAC**)).

Gemäß der extrazellulären, oxidativen und hydrolytischen Enzyme wird *Phanerochaete chrysosporium* der ersten Gruppe zugeordnet.

Das extrazelluläre Hemicellulose-Abbausystem (Abb. 1.6) besteht hauptsächlich aus Xylan abbauenden Enzymen. Xylane sind hoch komplexe Polysaccharide und stellen die wichtigsten Vertreter der Hemicellulosen in pflanzlichen Zellwänden dar. Sie verbinden die Cellulose mit dem Lignin und bedingen eine bessere Flexibilität und Elastizität des Holzes. Die **Endoxylanasen** brechen die Xylanketten in Xylo-Oligomere. **β-D-Xylosidasen** lösen die

Xylose am nicht-reduzierenden Ende der Oligomere (Kirk et al. 1998, Schmidt 2006, Szakács Dobozi et al. 1992).

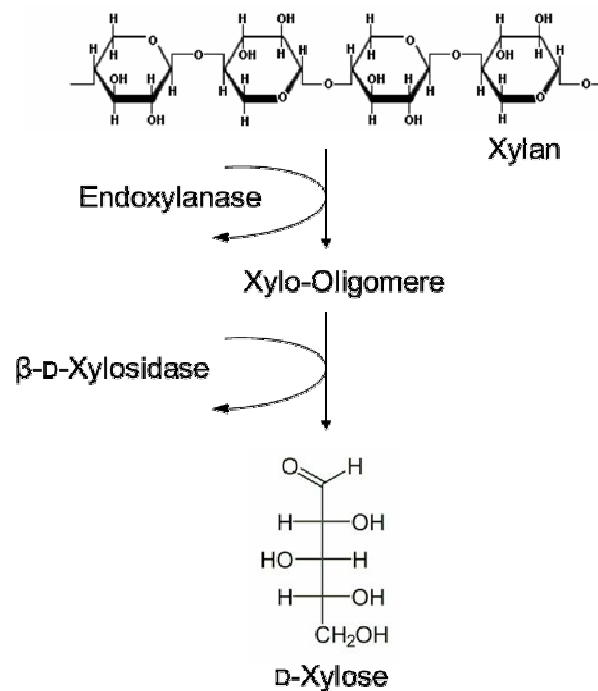


Abb. 1.6: Extrazelluläres Hemicellulose-Abbausystem bei *Phanerochaete chrysosporium* (verändert nach Schmidt 2006)

Zusammenfassend kann das komplexe System der extrazellulären Ligno-Cellulose abbauenden Enzyme bei *Phanerochaete chrysosporium* wie folgt charakterisiert werden (Peters 2004):

- Enzyme, die das Holz **direkt** abbauen:
  - Endoglucanasen, Exoglucanasen und β-Glucosidasen des extrazellulären Cellulose-Abbausystems,
  - Lignin- und Mangan-abhängige Peroxidasen des extrazellulären Lignin-Depolymerisationssystems und
  - Xylanasen und β-D-Xylosidasen des extrazellulären Hemicellulose-Abbausystems

- Enzyme, die das Holz **indirekt** abbauen:
  - die Glyoxaloxidase des LiP- und MnP-Abbauweges des extrazellulären Lignin-Depolymerisationssystems  
 Sie kooperiert mit jenen der ersten Gruppe und katalysiert den Abbau des verholzten Substrates.
- **„feed back“**- oder Rückkopplungs-Enzyme
  - die Cellobiose-Dehydrogenase  
 Sie verbindet im Falle von *Phanerochaete chrysosporium* die beiden Metabolismen während des Holzabbaus und arbeitet sowohl einzeln als auch in Kooperation.

Der kooperierende Lignin-, Cellulose- und Hemicellulose-Abbau ist im folgenden allgemeinen hypothetischen Schema für Weißfäulepilze (Abb. 1.7) dargestellt (Henriksson et al. 1995, Henriksson et al. 2000, Leonowicz et al. 1999, Peters 2004):

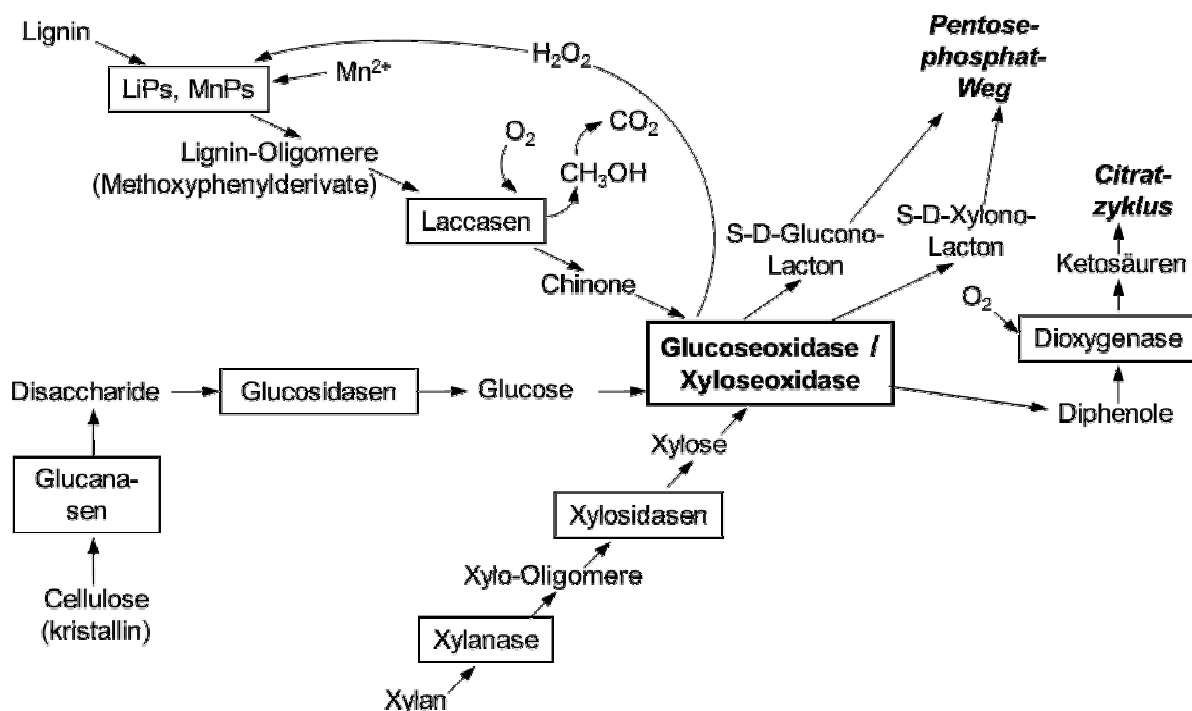


Abb. 1.7: Hypothetisches Schema des Lignocellulose-Abbaus bei Weißfäulepilzen (verändert nach Leonowicz et al. 1999, Peters 2004)

Dabei kommt die zentrale Rolle des Enzyms Glucoseoxidase bzw. Xyloseoxidase zum Ausdruck, denn es verbindet die einzelnen Abbauewege des Lignins, der Cellulose und Hemicellulose. Die Cellulasen hydrolysieren die Cellulose, die Xylanasen das Xylan, und die

Produkte Glucose und Xylose sind die Substrate für die Glucoseoxidase bzw. Xyloseoxidase. Die durch die Laccasen produzierten Chinone während des Abbaus der Lignin-Oligomere dienen ebenfalls als Substrat. Das S-D-Glucono-Lacton und S-D-Xylono-Lacton sind die Produkte der Oxidation und werden im Pentosephosphat-Weg weiter umgesetzt. Das bei der Oxidation freigesetzte Wasserstoffperoxid aktiviert die MnPs und LiPs, die das Lignin zu Methoxyphenylderivaten abbauen. Im Anschluss demethylieren die Laccasen diese Lignin-Oligomere, wobei die Glucoseoxidase bzw. Xyloseoxidase einen Überschuss an Chinonen und eine mögliche Repolymerisation durch ihre Reduzierung verhindert. Schließlich stellen die Diphenole das Substrat der Dioxygenasen dar, die die Ketosäuren für den Citratzyklus produzieren.

*Phanerochaete chrysosporium* bildet keine Laccasen für die Lignin-Depolymerisation (Hatakka 1994, Henriksson et al. 2000, Kirk et al. 1987, Kirk et al. 1998).

Zusätzlich kann der Pilz extrazellulär Pektin abbauen (Abb. 1.8). Pektine sind komplexe, stark verzweigte Heteropolysaccharide (Galakturane, Galaktane und Arabinane) in der Primärzellwand und der Mittellamelle der Pflanze, wo sie als interzellulärer Kitt dienen und eine Wasser regulierende und auch festigende Funktion ausüben. Pektine bestehen hauptsächlich aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verbundenen Galakturonsäure-Einheiten, die eine oxidierte Form der D-Galaktose darstellen (Kirk et al. 1998, Schmidt 2006). **Galaktosidasen** katalysieren die Spaltung der endständigen Galaktose der Pektine.

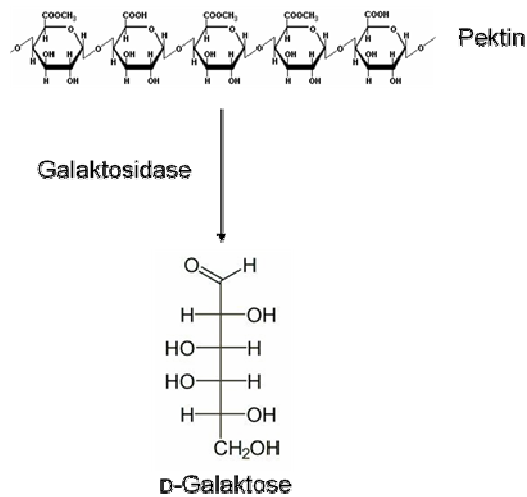


Abb. 1.8: Pektin-Abbau bei *Phanerochaete chrysosporium*

Schließlich produziert *Phanerochaete chrysosporium* extrazelluläre **Proteasen**. Ihre Aktivität kann in 2 Typen unterteilt werden: Die 1. steigt während der aktiven Wachstumsphase am 2. Tag und fällt am 4. Die 2. Aktivitätsphase erscheint am Tag 8 aufgrund einer ansteigenden Ligninase-Aktivität während des späten sekundären Metabolismus' und wird durch Kohlenstoffmangel stimuliert (Dosoretz et al. 1990). Den Proteinasen werden verschiedene Aufgaben zugeschrieben: Zum einen besitzen sie regulatorische Funktionen, vor allem die Aspartatproteasen, die die Endoglucanasen des Cellulose-Abbausystems aktivieren. Darüber hinaus bauen die Proteinasen, insbesondere die Chitinasen, alterndes Mycel ab und führen dem Pilz so wieder Aminosäuren zu (Staszczak et al. 1996). Zum anderen bewirken die Proteasen während des späten sekundären Metabolismus' ein Abfallen der Lignin-Peroxidase-Aktivität, wodurch der Stickstoff wahrscheinlich aus den bereits sekretierten Proteinen recycelt wird (Balachandra Dass et al. 1995).

## 2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung des lignocellulolytischen Proteoms von *Phanerochaete chrysosporium* mit Hilfe der Massenspektrometrie. Dabei soll der Einfluss des natürlichen Substrats, die Laubholzart Rotbuche (*Fagus sylvatica*) und die Nadelholzart Gemeine Fichte (*Picea abies*), auf die Proteinexpression der Lignocellulose abbauenden Proteine verglichen werden.

Das Vorhaben soll in folgenden Schritten verwirklicht werden:

1. Modifizierung und Vervollständigung des Hemicellulose-Abbau- und Lignin-Depolymerisationssystems
2. Erstellung eines Pektin-Degradationssystems
3. Ergänzung des Cellulose-Abbausystems und der proteolytischen Proteine
4. Annotation der detektierten, bezüglich ihrer Funktion bisher noch unbekannt Proteine über Rotbuchen- und Fichtenholz
5. Erstellung eines detaillierten hypothetischen Schemas des Degradationssystems von *Phanerochaete chrysosporium* auf der Grundlage des Lignocellulose-Abbauschemas bei Weißfäulepilzen nach Henriksson et al. (2000), Leonowicz et al. (1999) und Peters (2004)
6. Vergleich der exprimierten lignocellulolytischen Proteine über *Fagus sylvatica* und *Picea abies*
7. Erweiterung und Modifizierung der Protokolle zur Kultivierung, Protein-Extraktion, 1D-PAGE und zum Protein-in-Gel-Verdau.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Kulturmedien

Die unten beschriebenen Medien wurden für die Anzucht von *Phanerochaete chrysosporium* verwendet.

##### **stationäre, untergetauchte Oberflächen-Flüssigkultur verändert nach Tien et al. (1988):**

Basal-III-Medium (Filter sterilisiert) (s. u.)	100 ml
10% Glucose (autoklaviert)	100 ml
0,1 M 2,2-Dimethylsuccinat, pH 4,2 (autoklaviert)	100 ml
Thiamin (100 mg / Liter Stocklösung, Filter sterilisiert)	10 ml
Ammoniumtartrat (8 g / Liter Stocklösung, autoklaviert)	25 ml
Myzel-Suspension	100 ml
Veratrylalkohol (3,4-Dimethoxybenzaldehyd)	
(0,4 M Stocklösung, Filter sterilisiert)	100 ml
<u>Spurenelementlösung (Filter sterilisiert) (s. u.)</u>	<u>60 ml</u>

ad 1,0 l Aqua dest.

##### **Basal-III-Medium nach Tien et al. (1988):**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g
MgSO <sub>4</sub>	5 g
CaCl <sub>2</sub>	1 g
<u>Spurenelementlösung (Filter sterilisiert) (s. u.)</u>	<u>100 ml</u>

ad 1,0 l Aqua dest.



**Spurenelementlösung nach Tien et al. (1988):**

MgSO <sub>4</sub>	3,0 g
MnSO <sub>4</sub>	0,5 g
NaCl	1,0 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
CoCl <sub>2</sub>	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
CuSO <sub>4</sub>	0,1 g
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	10,0 mg
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub>	10,0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10,0 mg
<u>Nitriлотriacetat</u>	<u>1,5 g</u>

ad 1,0 l Aqua dest.

**MOSb (Moser b) verändert nach Moser (1960):**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,0 g
NaNO <sub>3</sub>	0,6 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g
CaCl <sub>2</sub>	0,2 g
Glucose	20,0 g
Malz-Extrakt	20,0 g
Saccharose	20,0 g
Maltose	20,0 g
Pepton	4,0 g
Thiamin	0,1 g
Biotin	2,0 mg
Inosit	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub>	2,0 mg
FeCl <sub>3</sub>	20,0 mg
MnSO <sub>4</sub>	10,0 mg
<u>Agar-Agar</u>	<u>40,0 g</u>

ad 2,0 l Aqua dest.

### **MYP (malt yeast pepton) nach Bandoni (1972):**

Malz-Extrakt	7,0 g
Pepton	1,0 g
Hefe-Extrakt	0,5 g
<u>Agar-Agar</u>	<u>15,0 g</u>

ad 1,0 l Aqua dest.

Das MOSb- und MYP-Medium wird für 20 min bei 120°C autoklaviert.

### **3.1.2 Puffer und Lösungen**

Nachfolgend ist die Zusammensetzung der benötigten Lösungen bzw. Puffer aufgeführt:

#### **kolloidale Coomassie-Brillant-Blau-G-250-Färbelösung:**

Coomassie-Brillant-Blau G-250	0,1%
Phosphorsäure	2% (w/v)
Aluminiumsulfat	5% (w/v)

für 1,0 l:

#### **Lösung A:**

Phosphorsäure (85%)	23,5 ml
<u>Aluminiumsulfat x 18 H<sub>2</sub>O</u>	<u>50,0 g</u>

ad 800 ml Aqua dest.

#### **Lösung B:**

<u>Coomassie-Brillant-Blau G-250</u>	<u>1,0 g</u>
--------------------------------------	--------------

ad 20 ml Aqua dest.

#### **Lösung C:**

20 ml von Lösung B in Lösung A langsam zutropfen, ad 1,0 l Aqua dest.

## **3.2 Kultivierungsmethoden**

### **3.2.1 Anzucht der Kulturen**

Für das Vorhaben wurde der *Phanerochaete chrysosporium*-Stamm ATCC 34541 (Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) auf MYP (malt yeast pepton)-Medium (Bandoni 1972) bei Raumtemperatur und 37°C angezüchtet und alle 4 Wochen überimpft. Um die Reinkultur für längere Zeit aufbewahren zu können, wurde diese auf Moser b-Medium (Moser 1960) in Reagenzgläsern (mit Presswatte-Stopfen) überführt und bei 10,5°C im Dunkeln in einer Klimakammer gelagert. Zur dauerhaften Kultivierung muss diese alle 2 Jahre überimpft werden.

*Phanerochaete chrysosporium* wurde sowohl auf Fest- als auch in Flüssigkultur nach Abbas et al. (2005) angezüchtet:

Für das Wachstum auf Festkulturen wurde der Pilz zunächst in 200 ml-Erlenmeyer-Kolben mit 20 g Hirse, 10 g Weizenkleien und 30 ml Wasser, zum Schutz vor Austrocknung und Kontamination mit Parafilm verschlossen, bei 37°C für 10 Tage kultiviert. Mit dieser Vorkultur konnten Polypropylen-Wachstumsbeutel bzw. Weckgläser mit 255 g Holzchips (Rotbuche (*Fagus sylvatica*) und Gemeine Fichte (*Picea abies*)), 30 g Hirse, 15 g Weizenkleie und 300 ml destilliertem deionisiertem Wasser inokuliert und ebenfalls bei 37°C für 6-8 Wochen angezüchtet werden.

Die mit dem destillierten deionisierten Wasser versetzte Hirse und Weizenkleie sowie die Holzchips wurden vor der Inokulation autoklaviert. Besonders die Fichtenholzchips wurden durch zweimaliges Autoklavieren extrahiert, um braune Inhaltsstoffe, wie z. B. Phenole oder Terpene, die das Pilzwachstum hemmen können, zu entfernen. Dazu wurden etwa 5 Volumen destilliertes deionisiertes Wasser zu den Holzchips gegeben und 30 min autoklaviert, das braunefärbte Wasser dekantiert und dieser Vorgang ein weiteres Mal wiederholt. Danach konnte das Holz bei 20°C und Umluft in einem Trockenschrank entfeuchtet werden.

Für die Flüssigkultur (stationäre, untergetauchte Oberflächen-Flüssigkultur) wurde *Phanerochaete chrysosporium*-Myzel in 200 ml-Erlenmeyerkolben mit einer Spurenelementlösung (10 ml Stickstoff-Mangelmedium) (Tien et al. 1988; Abbas et al. 2005; Sato et al. 2007) und 0,1 g Rotbuchen- bzw. Fichten-Holzpudder (vorbehandelt wie die Holzchips für die Festkulturen und mit einer Scheibenschwingmühle zu Holzpudder zerkleinert) in jeweils 10 Ansätzen zweimal reproduzierend bei 37°C 6-9 bzw. 21 Tage angezüchtet und am 2. und 5. Tag mit Wasser gesättigter Sauerstoff übergeleitet. Dafür wurde eine neue Apparaturanordnung etabliert, bei der der Sauerstoff durch mehrere Waschflaschen (zur Sättigung mit Wasser) über ein Schlauchsystem in die im Kulturschrank befindlichen, mit Gummistopfen verschlossenen Kulturkolben und von da wieder aus dem Kulturschrank heraus in einen Abzug geleitet wird (Abb. 3.1). Datalogger überprüften die Temperatur im Kulturschrank und in einem Kulturkolben.



Abb. 3.1: Flüssigkulturen im Kulturschrank bei 37°C und Wasser gesättigtem Sauerstoff

### **3.3 molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Protein-Extraktion (nach Abbas et al. 2005; Sato et al. 2007; Millipore 2007)**

Um die Kulturen zu ernten, wurden diese zum Trennen der extrazellulären Proteine vom Myzelium und dem Holzpuder durch ein Frischkäsetuch gegossen und 30 min bei 8000 g und 4°C zentrifugiert. Zum Konzentrieren (100-fach) der Proben wurde der extrazelluläre Proteine enthaltende Überstand (ca. 7-9 ml) auf einen 10-kDa-Amicon-Filter gegeben und 30-35 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Das Retentat (Flüssigkeit über dem Filter, ca. 200-300 µl) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 30-45 mg Trichloressigsäure (15% w/v) zum Entfernen der Salze und zur Proteinfällung hinzugegeben. Die Proben wurden für 30 min auf Eis gestellt und im Anschluss 16 min bei 13000 g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das Pellet mit 1000 µl gekühltem Aceton gewaschen und 3 min wieder bei 13000 g und 4°C zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge 15 min getrocknet, die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### **3.3.2 1D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D-PAGE)**

Das erhaltene Pellet jeder Probe wurde in 50 µl Mastermix, bestehend aus 25 µl NuPAGE LDS Probenpuffer, 5 µl DTT (1 M) und 20 µl Aqua bidest., unter vorsichtigem Vortexen gelöst, 10 min bei 70°C erhitzt und danach kurz wieder herunter zentrifugiert. Sollte beim Resuspendieren ein gelber Farbumschlag erfolgen, muss 1 µl gesättigte TRIS-Lösung zur TCA-Fällung (Farbwechsel zu grün) hinzugegeben werden.

Für die 1D-PAGE wurde ein NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Mini-Gel und 1x NuPAGE SDS Laufpuffer (50 ml 20x NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer mit 950 ml dH<sub>2</sub>O) verwendet. Die äußere Gel-Kammer wurde mit 600 ml, die innere mit 200 ml Puffer und 500 µl NuPAGE Antioxidans zur Demethylierung der Proben befüllt. Auf das Gel wurden 5-10 µl der Proben (2 µl bei sehr starken und bis zu 15 µl bei sehr schwachen Konzentrationen), 3 µl des Proteingrößenstandards (Page Ruler Unstained Protein Ladder, SM0661, Fermentas) und 5 µl des Probenpuffers in die leeren Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 50 min bei 200 V und 30 mA. Im Anschluss wurden die Polyacrylamid-Gele zum Eliminieren von SDS und anderen störenden Komponenten 90 sec in dH<sub>2</sub>O in der Mikrowelle erhitzt und nach 10-minütigem Schwenken das Wasser entfernt. Die Färbung erfolgte in einer kolloidalen Coomassie-Brillant-Blau-G-250-Lösung für 2-3 h. Danach wurden die Gele mit dH<sub>2</sub>O überschichtet und auf einem Schüttler (GFL 3013) ca. 1 Woche entfärbt. Die Photodokumentation wurde mit einem Gel Jet Imager (INTAS) durchgeführt.

### 3.3.3 Protein-in-Gel-Verdau und nano-LC-ESI-MS/MS

Der In-Gel-Verdau von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte nach einem modifizierten und gekürzten Protokoll nach Shevchenko et al. (1996), bei dem die im Gel denaturierten Proteine nicht entfärbt, die Disulfidbrücken nicht durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) reduziert und die freien Cysteinreste nicht durch Carbamidomethylierung mit Iodacetamid blockiert werden. Die folgenden Schritte wurden unter einer Clean Bench durchgeführt, um eine Proteinkontamination zu vermeiden.

Alle Protein-Gelbanden einer Probe wurden auf einer Glasplatte entweder mit einem Skalpell oder die gesamte Spur mit einer Gelstanze mit 22 Kompartimenten derselben Größe ausgeschnitten und jeweils in ein selbst hergestelltes Reaktionsgefäß (Bertinetti et al. 2009) (Abb. 3.2) überführt. Bei einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000 g wurden die Gelstücke durch die 10 µl-Pipettenspitze gedrückt und dadurch gut zerkleinert. Die Proben wurden jeweils mit 25-35 µl Trypsin-Lösung (10 ng/µl Trypsin (Promega) in 50 mM Ammoniumbicarbonatpuffer, pH 8,0) überschichtet und 1-2,5 h bei 1050 rpm und 50°C in einem Thermomixer (5436, Eppendorf) inkubiert. Im Anschluss an den Verdau mit der Serin-Protease Trypsin, die die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Lysin und Arginin spezifisch spaltet, wurden die Proben 10 min bei 13000 g zentrifugiert und zum Überstand 30-35 µl 0,3% (v/v) Ameisensäure hinzugegeben. Die sich anschließenden Messungen mit einem Elektrospray-Ionisations-(ESI-)Massenspektrometer (4000 Q Trap, Applied Biosystems) und die vorherige Auftrennung mit Hilfe einer nano-Flüssigchromatographie (nano-LC 1D Plus, Eksigent) geschahen durch Oliver Bertinetti (Universität Kassel, Fachgebiet Biochemie).

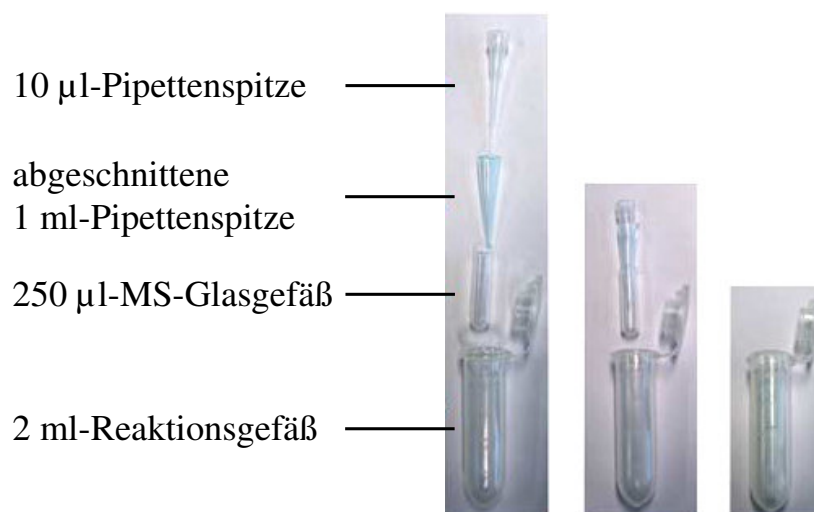


Abb. 3.2: Für den Protein-in-Gel-Verdau verwendete, selbst hergestellte Reaktionsgefäße

### **3.3.4 Identifizierung der Proteine mit Hilfe von Genom- und Proteindatenbanken**

Die Identifizierung der isolierten Proteine erfolgte durch Vergleich der erhaltenen Molekulargewichte der Peptide mit den 6 verschiedenen Datenbanken

- whiterot1 v2.0, das *Phanerochaete-chrysosporium*-Genom enthaltend,
- UniProtKB / Swiss-Prot,
- KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes),
- KOG (Clusters of eukaryotic Orthologous Groups),
- GO (the Gene Ontology) und
- ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Server

und mit BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase) zur einheitlichen Benennung und Klassifizierung der Proteine mittels einem numerischen EC-(Enzyme Commission-)Nummer-Klassifikationssystem.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Fermentierung

Im Folgenden werden die methodischen Ergebnisse dieses Vorhabens dargestellt.

*Phanerochaete chrysosporium* wurde sowohl in Fest- als auch in Flüssigkultur nach einem Protokoll von Abbas et al. (2005) angezchtet. Für die Kultivierung von *Phanerochaete chrysosporium* in Festkultur ist nach 6-8 Wochen ein mäßiges Wachstum punktuell auf den Rotbuchen- und Fichten-Holzchips und größtenteils auf dem Plastikbeutel zu erkennen (Abb. 4.1, links), wobei der Pilz statt des Holzes den Polypropylenbeutel abbaute (Abb. 4.2). Auch eine Anzucht in Glasgefäßen zeigte ein geringes Wachstum auf den Holzchips, ein Abscheiden des Wassers an der Glaswand und ein anschließendes Absterben des Pilzes (Abb. 4.1, rechts).

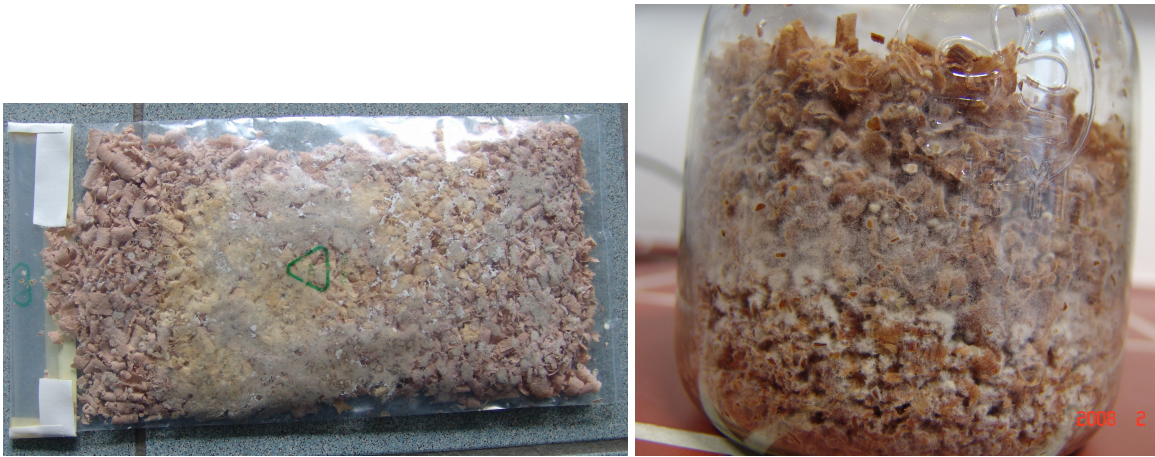


Abb. 4.1: Für die Festkultur verwendete Polypropylen-Wachstumsbeutel (links) und Fermentation im Glasgefäß (rechts)

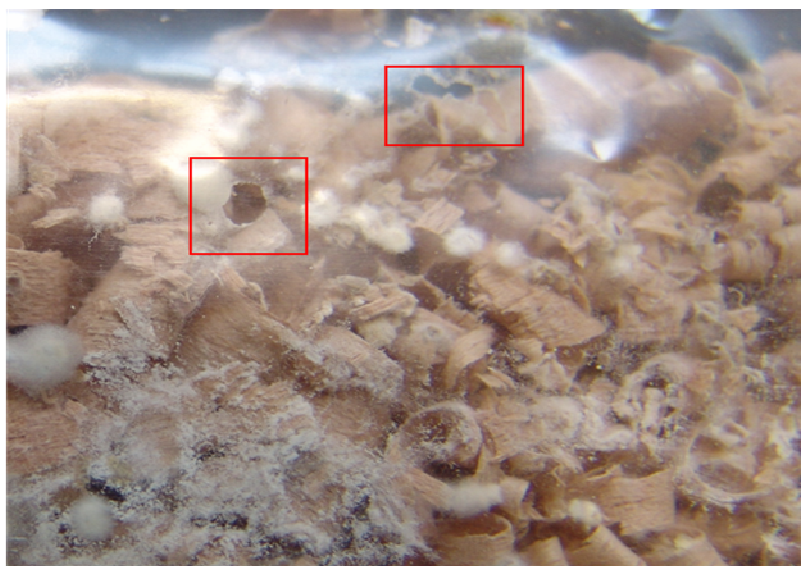


Abb. 4.2: Festkultur im Polypropylen-Wachstumsbeutel, der vom Pilz abgebaut wurde (siehe Markierung)



Deshalb wurde eine Fermentierung von *Phanerochaete chrysosporium* in Flüssigkultur in Erlenmeyerkolben mit einer Spurenelementlösung (Tien et al. 1988; Abbas et al. 2005; Sato et al. 2007) und Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder bevorzugt. Dafür wurde eine neue Apparaturanordnung mit Waschflaschen (zur Sättigung des zugeleiteten Sauerstoffs mit Wasser) und einem Schlauchsystem zu den im Kulturschrank befindlichen Kulturkolben etabliert. Die Flüssig- zeigte im Gegensatz zur Festkultur ein sehr gutes Pilzwachstum. Das Protokoll zur Fermentierung konnte optimiert (Veränderung der Zusammensetzung der Spurenelementlösung, weniger häufiges Autoklavieren der Holzchips, Optimierung der Apparaturanordnung) und die Kultivierzeit auf 6 Tage verkürzt werden (Anzucht 1 Woche).

Weiterhin wurde neben dem genannten Stickstoff-Glucose-Mangelmedium (Spurenelementlösung, s. o.) ein Stickstoff-Glucose-Medium (Variation der Veratrylalkohol- und Glucose-Konzentration) verwendet, um ein größeres Spektrum des Cellulose-, Hemicellulose-, Pektin- und daraus resultierenden Zucker abbauenden Enzymkomplexes zu erhalten. Diese Variation zeigte allerdings keine zusätzliche Diversifizierung der isolierten cellulolytischen Proteine und wurde wieder verworfen.

Außerdem wurden die Flüssigkulturen mit Fichten- und Rotbuchen-Holzpuder für 3 Wochen angezchtet, um einen vollständigeren, extrazellulären, für die Ligninhydrolyse verantwortlichen Proteinkomplex, aber auch weitere cellulolytische und proteolytische Proteine isolieren zu können. Die Ligninase-Aktivität steigt während des späten sekundären 'Metabolismus' erst nach einer Wachstumszeit des Pilzes von 6-8 Tagen an.

Die Kulturen über Fichten- und Rotbuchen-Holzpuder, jeweils für 1 und 3 Wochen fermentiert, wurden zweimal reproduziert - einmal biologisch, bei dem die Anzuchten noch einmal in doppelter Ausfertigung kultiviert wurden, und einmal technisch, bei dem der 2. Ansatz der biologischen Reproduktion verwendet wurde.

Während der Kultivierung (1. Anzucht und biologische Reproduktion) überprüften Datalogger die Temperatur im Kulturschrank und in einem Kulturkolben. Die Messungen zeigten im Kulturschrank eine Schwankung zwischen 37,5°C und 38,5°C (Abb. 4.4 und 4.6) und im Kulturkolben zwischen 38°C und 38,5°C (Abb. 4.3 und 4.5) (jeweils 1. Anzucht und biologische Reproduktion).

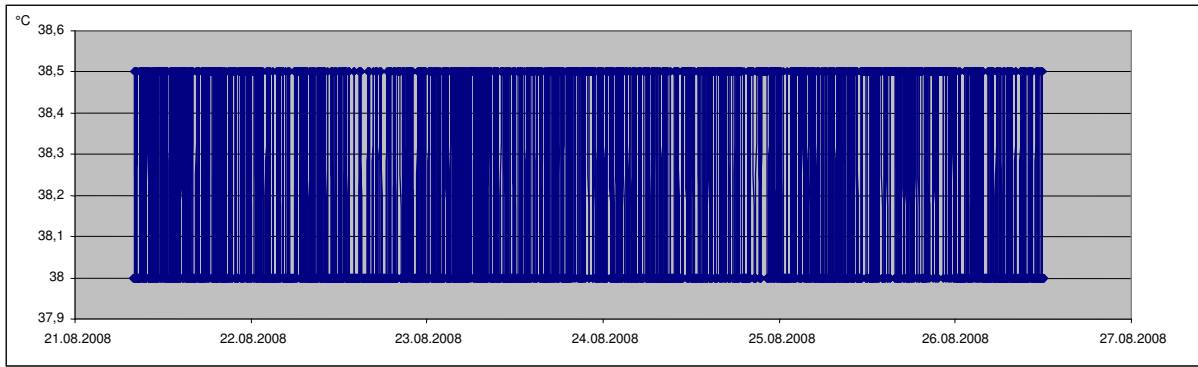


Abb. 4.3: Temperaturspanne während der 1. Anzucht von *Phanerochaete chrysosporium* im Kulturkolben (21.08.-26.08.2008)

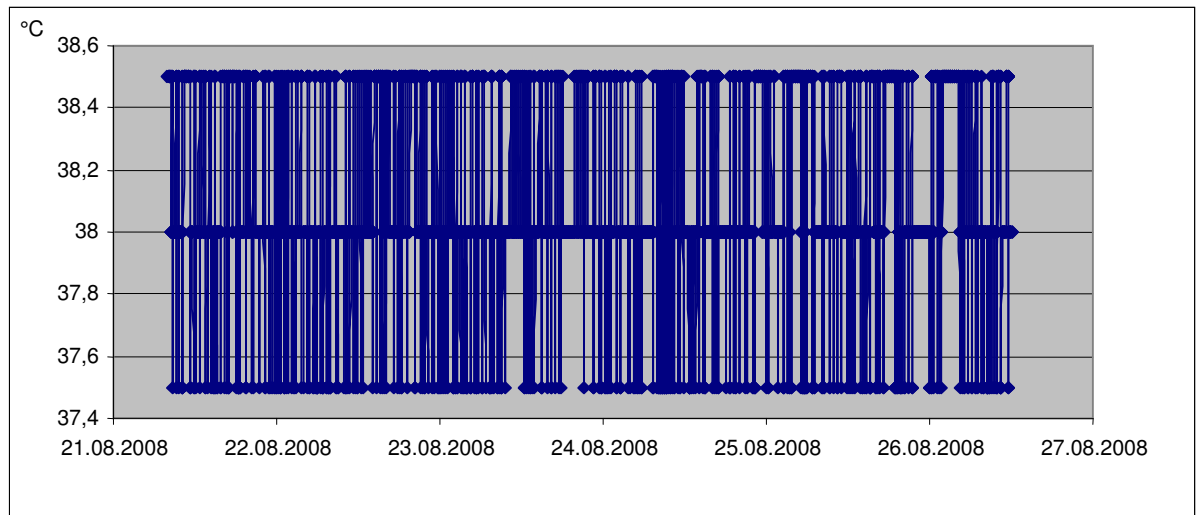


Abb. 4.4: Temperaturspanne während der 1. Anzucht von *Phanerochaete chrysosporium* im Kulturschrank (21.08.-26.08.2008)

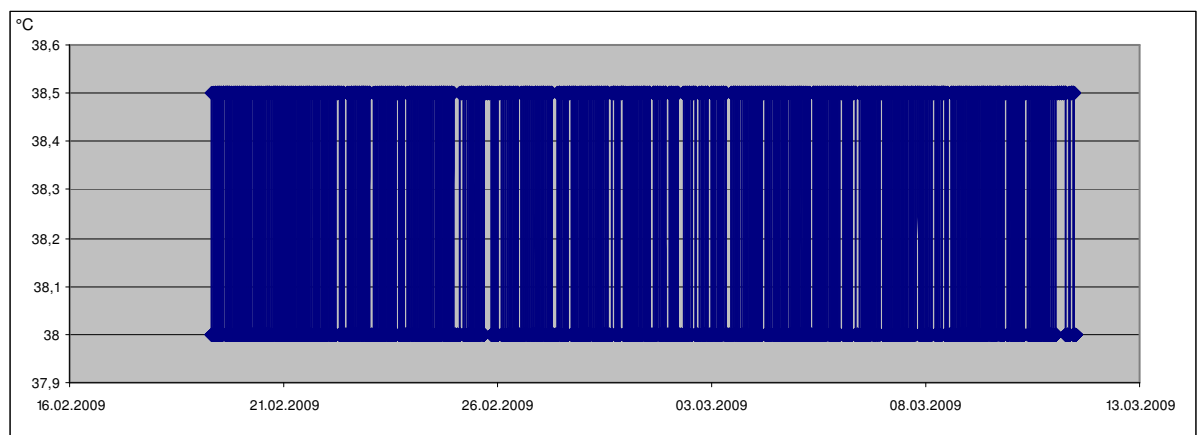


Abb. 4.5: Temperaturspanne während der biologischen Reproduktion von *Phanerochaete chrysosporium* im Kulturkolben (19.02.-11.03.2009)

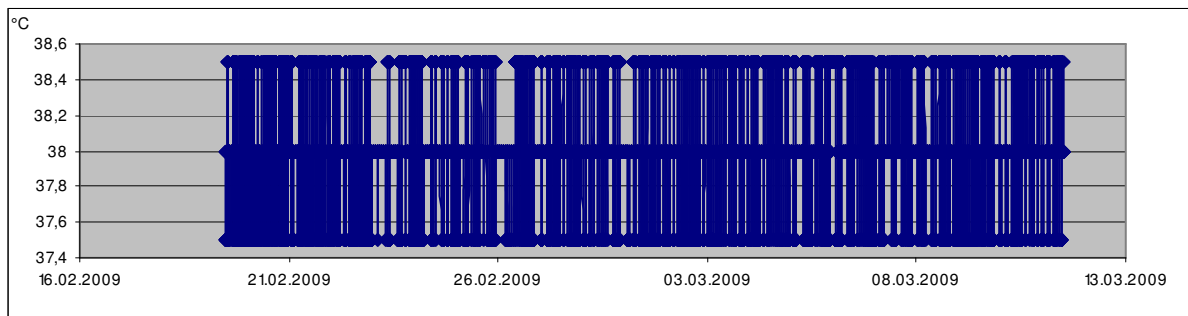


Abb. 4.6: Temperaturspanne während der biologischen Reproduktion von *Phanerochaete chrysosporium* im Kulturschrank (19.02.-11.03.2009)

#### 4.2 Isolierung des extrazellulären Proteoms, 1D-PAGE und Aufreinigung

Die methodischen Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

Die Protein-Extraktion musste ebenfalls für die sich anschließende 1D-PAGE optimiert werden. Dafür wurden die Zentrifugationszeiten für die 10-kDa-Amicon-Filter zum Konzentrieren der Proben verlängert und für das Waschen des Pellets mit gekühltem Aceton verkürzt.

Der Vergleich der für die Proteinauftrennung notwendigen 1D- mit der 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (1D- und 2D-PAGE) zeigte, dass die größeren methodischen Schwierigkeiten der 2D-PAGE bei Verwendung der 1D-PAGE umgangen werden können, nachdem diese für die Auftrennung der *Phanerochaete chrysosporium* spezifischen Proteine optimiert wurde (Zugabe einer gesättigten TRIS-Lösung zur TCA-Fällung zu den mit der Vakuumzentrifuge getrockneten Proben, Variation des Probenauftrags auf das PAGE und der Zeit und elektrischen Spannung während der Elektrophorese). Mit der zeitintensiveren 2D-PAGE kann nur eine Probe pro Gel analysiert werden. Soll der gesamte Proteinkomplex untersucht werden, können mit der 2D-PAGE keine low-copy-Proteine detektiert werden. Außerdem ist die 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in der Zahl und dem Typ der Proteine, die im Gel dargestellt werden sollen, begrenzt. Größere Proteine und solche unter pH 3 und über pH 10 werden nicht im Gel aufgetrennt.

Die charakteristischen Proteinbandenmuster der Flüssigkulturen (Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder, 1 bzw. 3 Wochen angezchtet) nach einer 1D-PAGE werden in der folgenden Abbildung 4.7 vergleichend gegenübergestellt.

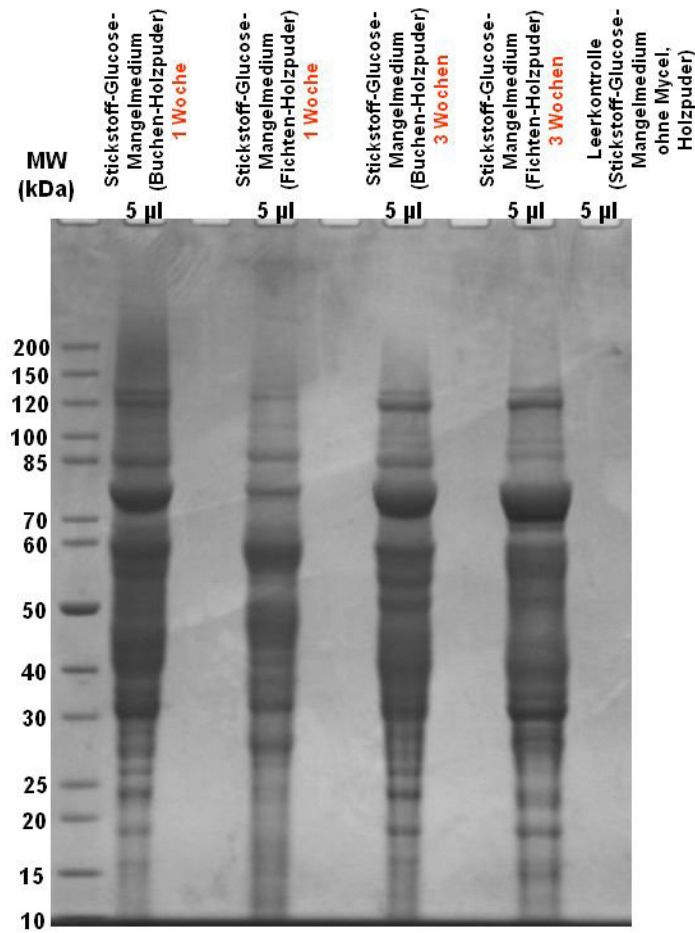


Abb. 4.7: 1D-PAGE der extrazellulären Proteine von *Phanerochaete chrysosporium* der Flüssigkultur mit Rotbuchen-Holzpunder (Tasche 2, 6) bzw. Fichten-Holzpunder (Tasche 4, 8), 1 bzw. 3 Wochen angezchtet, und eine Leerkontrolle mit Stickstoff-Glucose-Mangelmedium, Holzpunder und ohne Mycel (Tasche 9). Coomassie Blau-Färbung, MW = Molekulargewicht in kDa (Tasche 1)

Weiterhin werden vergleichend die Proteinbandenmuster der unterschiedlichen Flüssigkulturen Stickstoff-Glucose-Mangelmedium und Stickstoff-Glucose-Medium nach einer 1D-PAGE (Rotbuchen- und Fichten-Holzpunder, 1 Woche angezchtet) in der Abbildung 4.8 gezeigt. Dabei lassen die Kulturen im Stickstoff-Glucose-Medium keine signifikanten Banden auf dem Polyacrylamid-Gel erkennen.

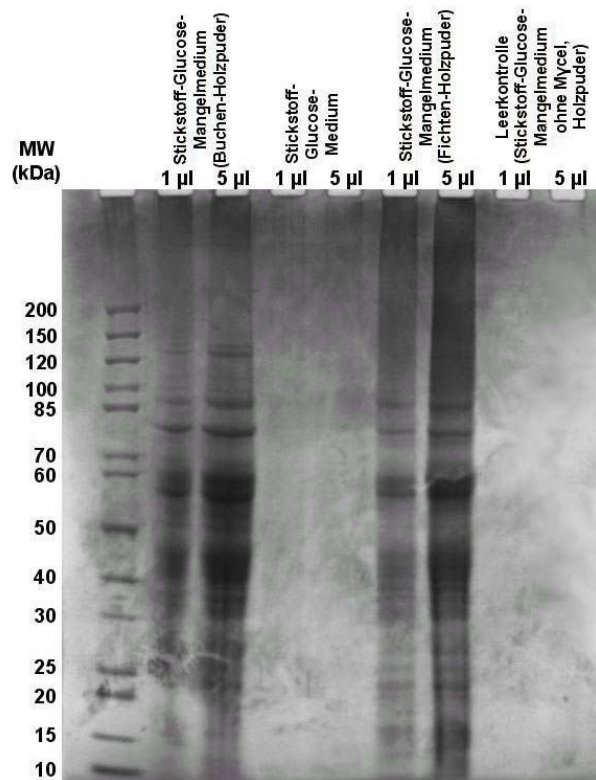


Abb. 4.8: 1D-PAGE der extrazellulären Proteine von *Phanerochaete chrysosporium* aus der Flüssigkultur mit Holzpunder (Rotbuche und Fichte) und Stickstoff-Glucose-Mangelmedium (Tasche 2, 3, 6, 7), Flüssigkultur mit Holzpunder und Stickstoff-Glucose-Medium (Tasche 4, 5) und eine Leerkontrolle mit Stickstoff-Glucose-Mangelmedium, Holzpunder und ohne Mycel (Tasche 8, 9). Das Gel wurde mit Coomassie Blau gefärbt. MW = Molekulargewicht in kDa (Tasche 1)

Die an die 1D-PAGE anschließende ESI-Massenspektrometrie und der Vergleich mit *Phanerochaete chrysosporium* unspezifischen und spezifischen Datenbanken zeigten eine Kontamination der Proben mit Keratin. Für die Reproduktion wurde daher zunächst die Extraktion der aufgetrennten Proteine in der 1D-PAGE optimiert. Deshalb wurden nicht mehr einzelne signifikante Banden aus dem Polyacrylamid-Gel, sondern die gesamten Lanes (Spuren) mit einer speziell angefertigten „Stanze“ mit 22 Kompartimenten derselben Größe zur besseren Vergleichbarkeit ausgeschnitten, so dass nach Massenspektrometrie und Abgleich mit den Datenbanken der extrazelluläre Lignin-Depolymerisations-, oxidative und hydrolytische Cellulose-, Hemicellulose- und Pektin-Proteinkomplex und die proteolytischen Proteine diversifizierter unterschieden werden konnten.

Um die Kontamination der Proben mit Keratin zu verringern bzw. zu eliminieren, wurden die Protokolle zur Kultivierung von *Phanerochaete chrysosporium*, Gewinnung des Holzpuanders

und Isolierung der Proteine überprüft und die Kulturmedien ausgetauscht, das Holzpuder erneut hergestellt und das Frischkäsetuch zum Filtrieren der Kulturen mit Proteasen behandelt. Die anschließenden Isolierungen und massenspektrometrischen Analysen zeigten jedoch eine nur geringe Reduzierung des Keratins. Nach weiteren Recherchen stellte sich heraus, dass eine solche Kontamination ein grundsätzliches methodisches Problem bei extrazellulären Proteindeterminationen darstellt. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand ist allenfalls eine Reduzierung von Keratin möglich, nicht jedoch seine vollständige Entfernung.

#### **4.3 Identifizierung der Proteine mit Hilfe von Genom- und Proteindatenbanken**

Für die Identifizierung der isolierten Proteine wurden die Proteinhits mit der *Phanerochaete chrysosporium* spezifischen Datenbank whiterot1 v2.0 abgeglichen (Abb. 4.9, S. 32).

Die Ergebnisse je Datensatz (über Rotbuchen- bzw. Fichten-Holzpuder 1 bzw. 3 Wochen angezüchtet) wurden auf sich mehrfach wiederholende Hits je Protein überprüft und jenes mit der besten prozentualen Absicherung (Konsensus aus experimentell ermitteltem Molekulargewicht (kDa), theoretischem Molekulargewicht (kDa), Score und Queries matched) ausgewählt.

Für jeden Proteinhit wurde mit der Protein id aus der Accession No. in der whiterot1-Datenbank eine Model-Suche gestartet, die einen Homologievergleich mit den Datenbanken UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO lieferte. Da die Genomsequenzen von *Phanerochaete chrysosporium* in der für den Pilz spezifischen Datenbank (whiterot1 v2.0) nicht annotiert sind, musste das nächstwahrscheinlichere Homologieergebnis der im vorigen Satz genannten Datenbanken gewählt werden. Handelte es sich bei dem Ergebnis nicht um ein *Phanerochaete chrysosporium* spezifisches Protein, wurde jenes des nächstverwandten Basidiomyceten bzw. Ascomyceten gewählt.

Proteinhits, die nicht von *Phanerochaete chrysosporium* stammten, wurden generell auf ihre Holz abbauende Funktion anhand der „Accession No.“ unter UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO geprüft. Besonders für solche Hits, die kein Protein des nächstverwandten Basidiomyceten (polyporoides Clade) lieferten, wurde zusätzlich im ExPASy Proteomics Server eine Model-Suche (Homologievergleich) gestartet. Da so viele verschiedene Datenbanken eine unterschiedliche Benennung und Klassifizierung der Proteine bedingen, wurde eine Einheitlichkeit mit Hilfe des numerischen EC-Nummer-Klassifikationssystems von BRENDA hergestellt.

Wurden keine homolog benannten Sequenzen anderer Organismen unter whiterot1 v2.0 angezeigt, wurde die wahrscheinlichste von *Phanerochaete chrysosporium* und der homologe Proteinname als „unbeschrieben“ gewählt. Auch diese Hits wurden im ExPASy Proteomics Server noch einmal auf Proteine nächstverwandter Basidiomyceten geprüft.

Lieferte die Model-Suche keine homologen Sequenzen, wurde „keine homologe Sequenz“ vermerkt.

Auch intrazelluläre Proteinhits wurden berücksichtigt und separat aufgeführt.

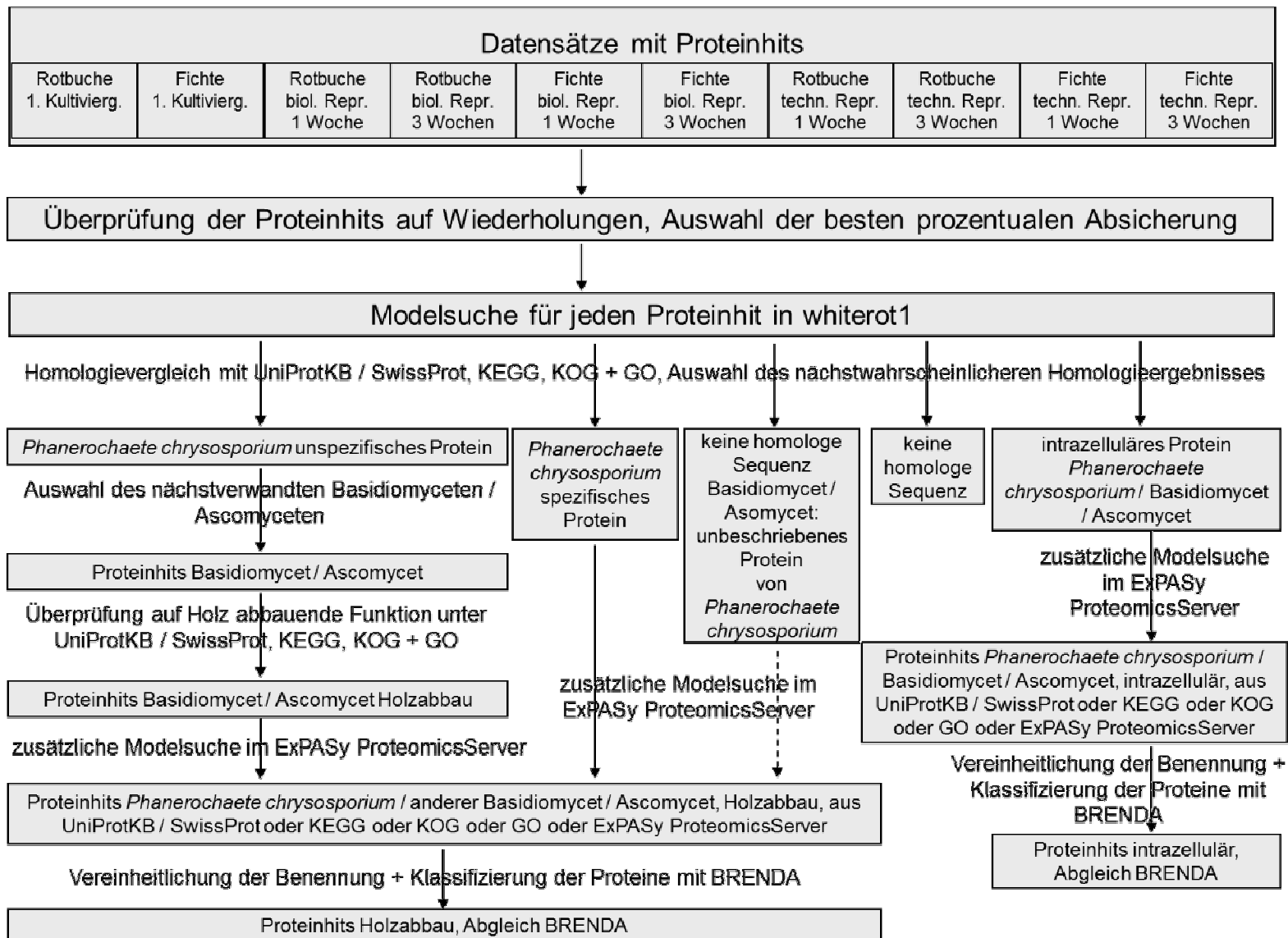


Abb. 4.9: Fließschema der Identifizierung der Proteine mit Hilfe von Genom- und Proteindatenbanken



Im Folgenden wird die Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzspuder 1 und 3 Wochen angezuchtet) je Datenbank durch Tortendiagramme dargestellt. Die sich funktionell wiederholenden Proteine je Datensatz wurden nicht zusammengefasst.

Mit Hilfe der Datenbank KEGG wurden 138 Proteine, mit ExPASy 327, KOG 1, GO 10 und SwissProt 628 Proteine erhalten, whiterot lieferte 223 nicht beschriebene Proteine (siehe Abb. 4.10).

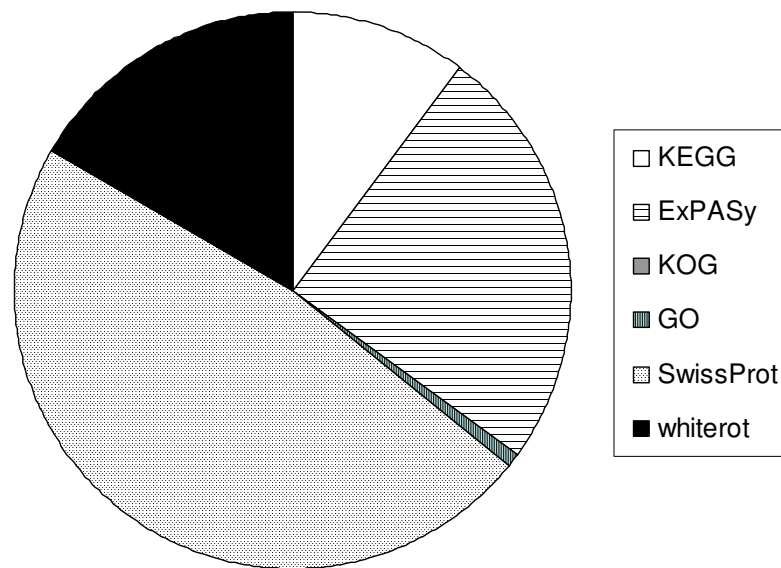


Abb. 4.10: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzspuder 1 und 3 Wochen angezuchtet) je Datenbank (KEGG, ExPASy, KOG, GO, SwissProt und whiterot)

Durch KEGG konnten 30 cellulolytische, 0 hemicellulolytische, 0 ligninolytische, 0 Pektin abbauende Proteine, 5 Proteasen, 4 nicht beschriebene und 99 extra- und intrazelluläre Stoffwechselproteine bestimmt werden (siehe Abb. 4.11).

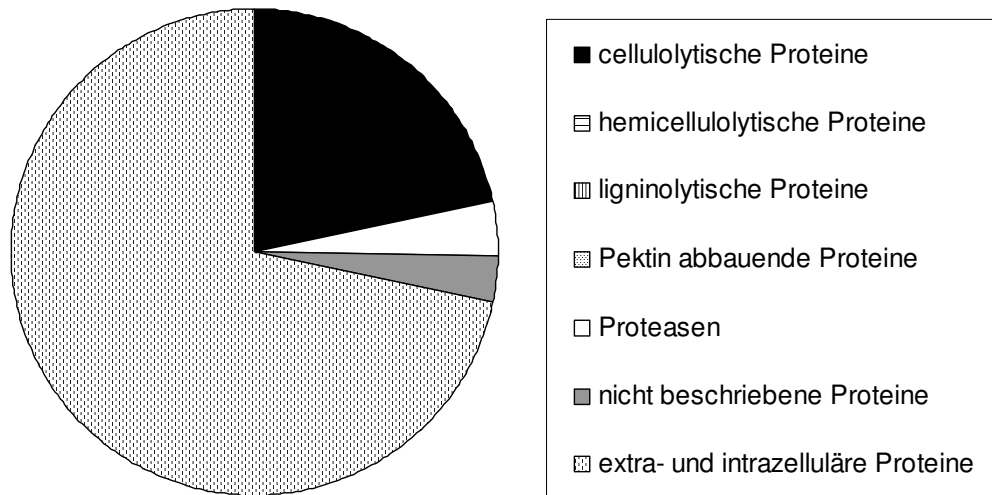


Abb. 4.11: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder 1 und 3 Wochen angezchtet) für die Datenbank KEGG

Mit Hilfe von ExPASy wurden 45 cellulolytische, 21 hemicellulolytische, 24 ligninolytische, 25 Pektin abbauende Proteine, 103 Proteasen, 71 nicht beschriebene und 38 extra- und intrazelluläre Stoffwechselproteine gefunden (siehe Abb. 4.12).

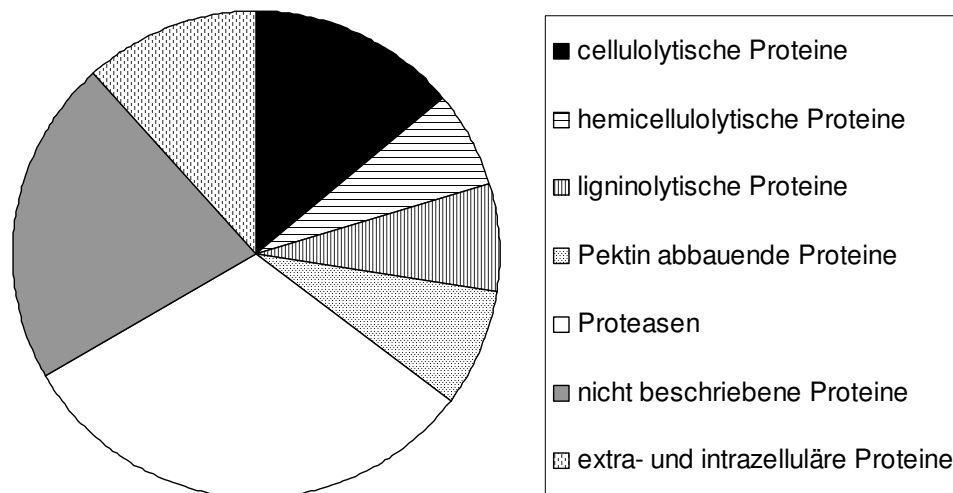


Abb. 4.12: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpufer 1 und 3 Wochen angezüchtet) für die Datenbank ExPASy

Durch KOG wurde ein nicht beschriebenes Protein erhalten (siehe Abb. 4.13).

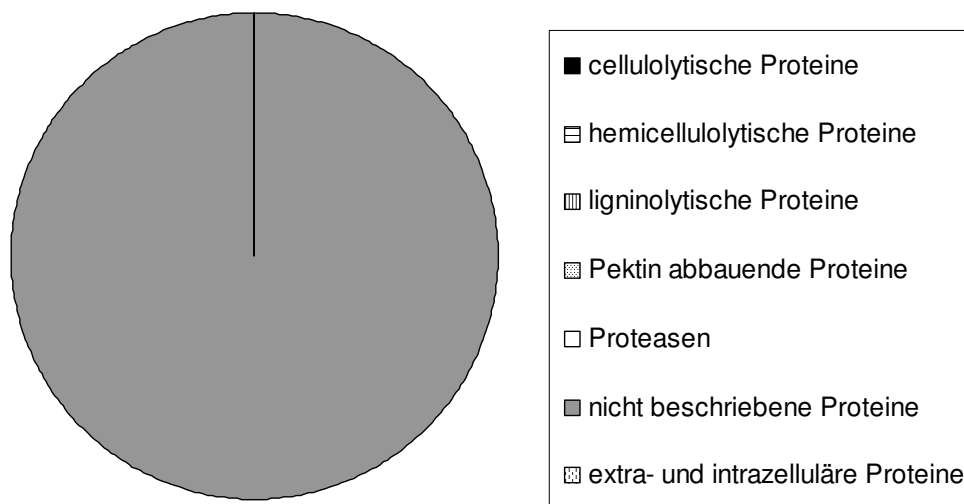


Abb. 4.13: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpufer 1 und 3 Wochen angezüchtet) für die Datenbank KOG

Mit Hilfe von GO konnten 1 cellulolytisches, 0 hemicellulolytische, 1 ligninolytisches, 0 Pektin abbauende Proteine, 7 Proteasen, 0 nicht beschriebene und 1 intrazelluläres Stoffwechselprotein bestimmt werden (siehe Abb. 4.14).

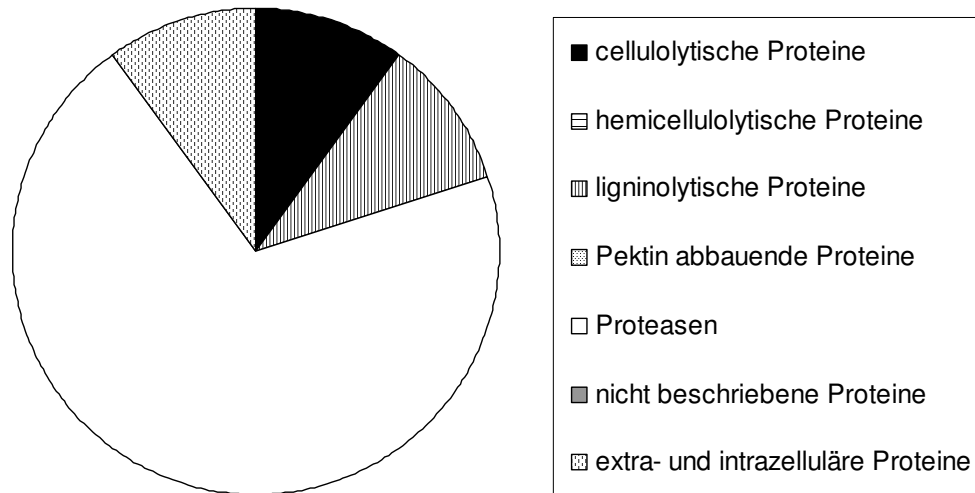


Abb. 4.14: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpufer 1 und 3 Wochen angezchtet) für die Datenbank GO

Durch SwissProt wurden 295 cellulolytische, 81 hemicellulolytische, 57 ligninolytische, 55 Pektin abbauende Proteine, 86 Proteasen, 0 nicht beschriebene und 54 extra- und intrazelluläre Stoffwechselproteine gefunden (siehe Abb. 4.15).

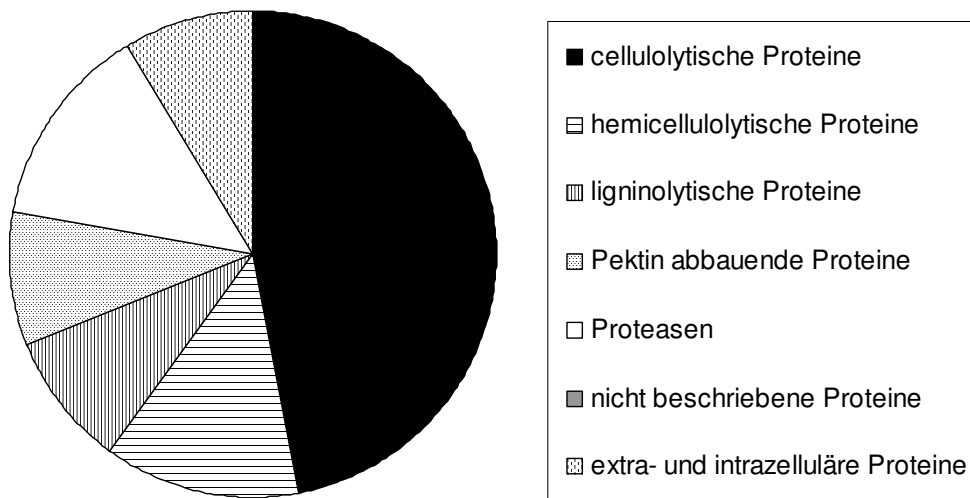


Abb. 4.15: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpufer 1 und 3 Wochen angezüchtet) für die Datenbank SwissProt

Mit Hilfe von whiterot konnten 223 nicht beschriebene Proteine erhalten werden (siehe Abb. 4.16).

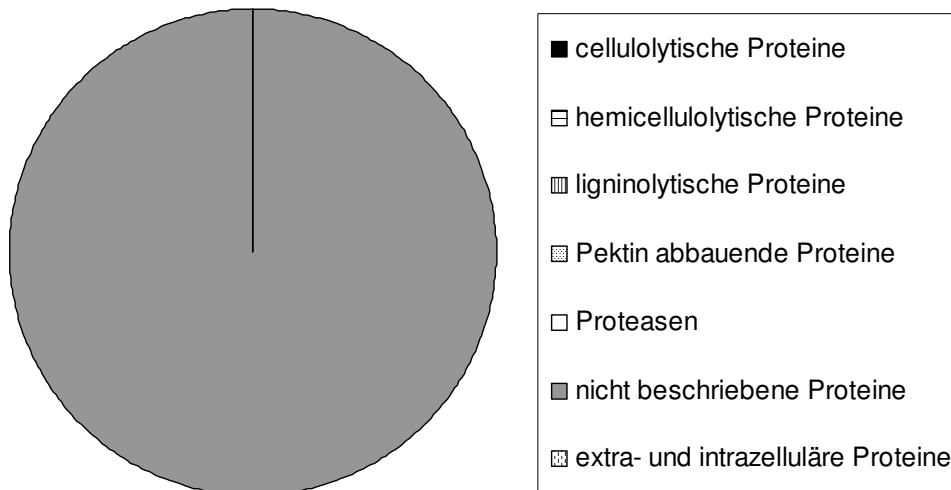


Abb. 4.16: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpufer 1 und 3 Wochen angezüchtet) für die Datenbank whiterot

#### 4.4 Charakterisierung des Proteoms von *Phanerochaete chrysosporium*

Das zusammengefasste funktionelle Proteom der extrazellulären Proteine von *Phanerochaete chrysosporium* über Fichten-Holzpuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen umfasste 18 cellulolytische, 12 ligninolytische, 5 hemicellulolytische, 6 Pektin degradierende, 8 proteolytische, 3 Chitin abbauende, aber auch 68 unbeschriebene, bezüglich ihrer Funktion unbekannte Proteine (siehe Abb. 4.17).

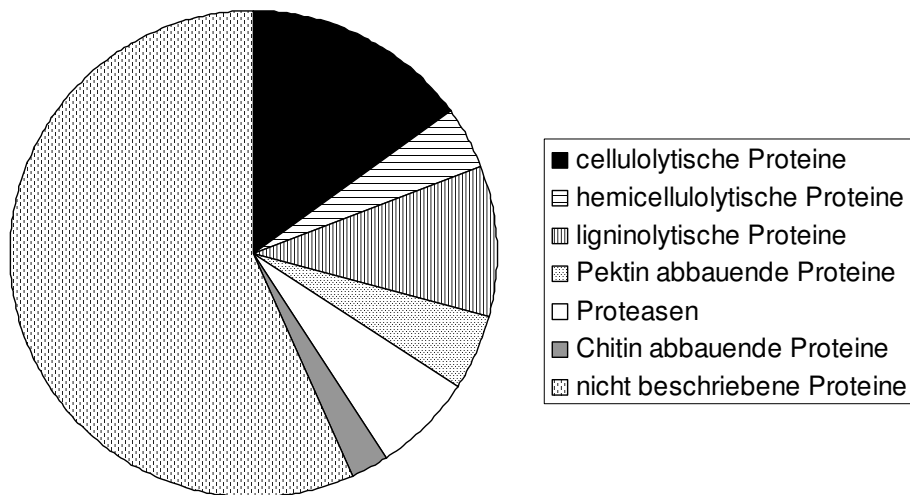


Abb. 4.17: Zusammengefasster funktioneller Proteomdatensatz von *Phanerochaete chrysosporium* über Fichten-Holzpuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen

Der zusammengefasste funktionelle Proteomdatensatz von *Phanerochaete chrysosporium* der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen über Rotbuchen-Holzpuder beinhaltete 20 cellulolytische, 14 ligninolytische, 5 hemicellulolytische, 7 Pektin degradierende, 6 proteolytische, 3 Chitin abbauende und 58 unbeschriebene Proteine (siehe Abb. 4.18).

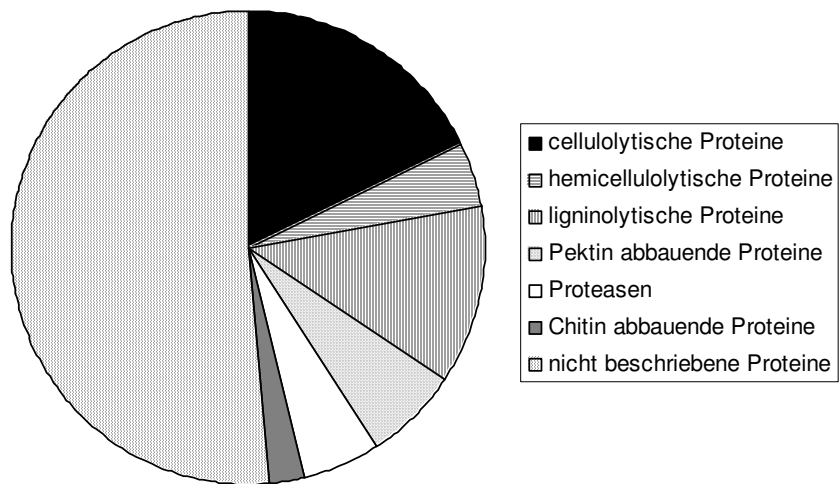


Abb. 4.18: Zusammengefasster funktioneller Proteomdatensatz von *Phanerochaete chrysosporium* über Rotbuchen-Holzspuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen

Abb. 4.19 lässt erkennen, dass der zusammengefasste funktionelle Proteomdatensatz von *Phanerochaete chrysosporium* über Rotbuchen- und Fichten-Holzspuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen keine signifikanten Unterschiede zeigt.

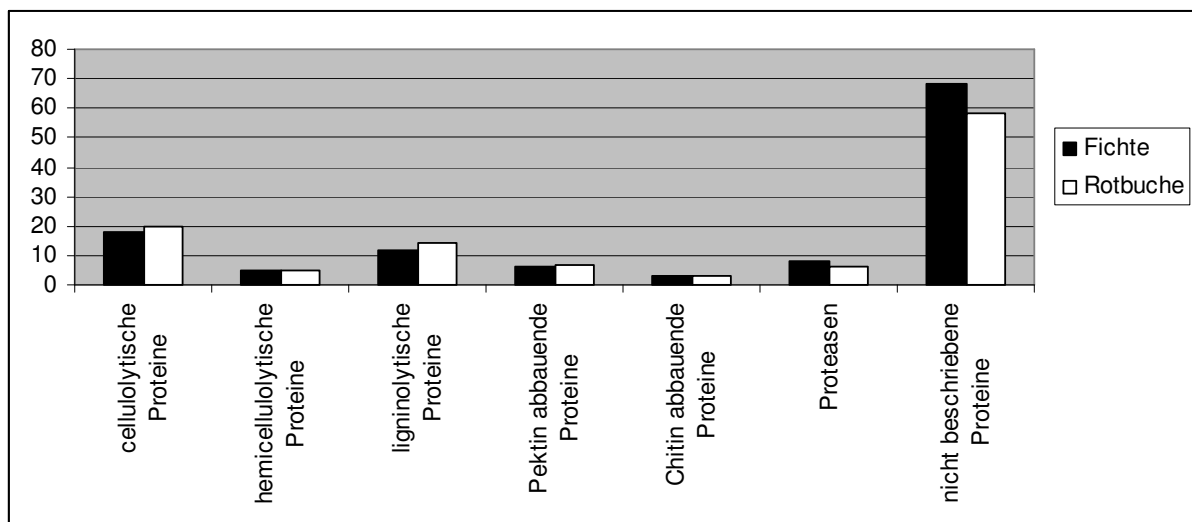


Abb. 4.19: Zusammengefasster funktioneller Proteomdatensatz von *Phanerochaete chrysosporium* über Fichten- und Rotbuchen-Holzspuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen im Vergleich

Im Folgenden sollen die ausführlicheren Datensätze der homologen Proteinnamen über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion zusammengefasst) beschrieben werden.

Über Rotbuchen-Holzpuder (siehe auch Abb. 4.20) wurden 46 cellulolytische homologe Proteine (16 Cellobiasen, 18 Endo- und 9 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase, 2 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) detektiert, wobei tendenziell mehr in der 1. Woche der Anzucht gefunden werden konnten. Außerdem wurden 12 hemicellulolytische, 10 ligninolytische und ebenfalls 10 Pektin abbauende homologe Proteine gemessen. Weiterhin konnten 6 Chitinasen und bis zu 23 Proteasen (deutlich mehr in der dreiwöchigen Anzucht) erhalten werden. Schließlich wurden 43 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 25 weitere extra- und auch intrazelluläre Stoffwechselproteine detektiert. 35 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen konnten mithilfe des ExPASy Proteomics Servers annotiert werden.

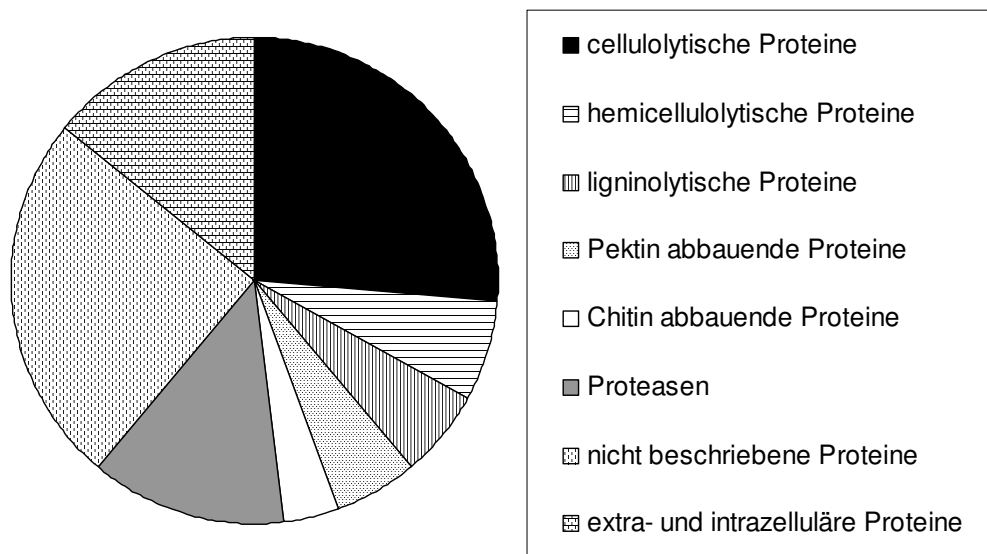


Abb. 4.20: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion zusammengefasst)

Über Fichten-Holzpuder (siehe Abb. 4.21) wurden 44 cellulolytische homologe Proteine (14 Cellobiasen, 16 Endo- und 11 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase, 2 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) gemessen, wobei auch hier mehr in der 1. Anzuchtswuche detektiert werden konnten. Weiterhin wurden 11 hemicellulolytische, 11



ligninolytische und 10 Pektin abbauende homologe Proteine gefunden. Außerdem wurden 5 Chitinasen und bis zu 20 Proteasen (mit deutlich mehr Proteinsequenzen in der dreiwöchigen Anzucht) gemessen. 51 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 29 weitere extra- und auch intrazelluläre Stoffwechselproteine wurden ebenfalls erhalten. Schließlich konnten 35 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen mittels ExPASy Proteomics Server annotiert werden.

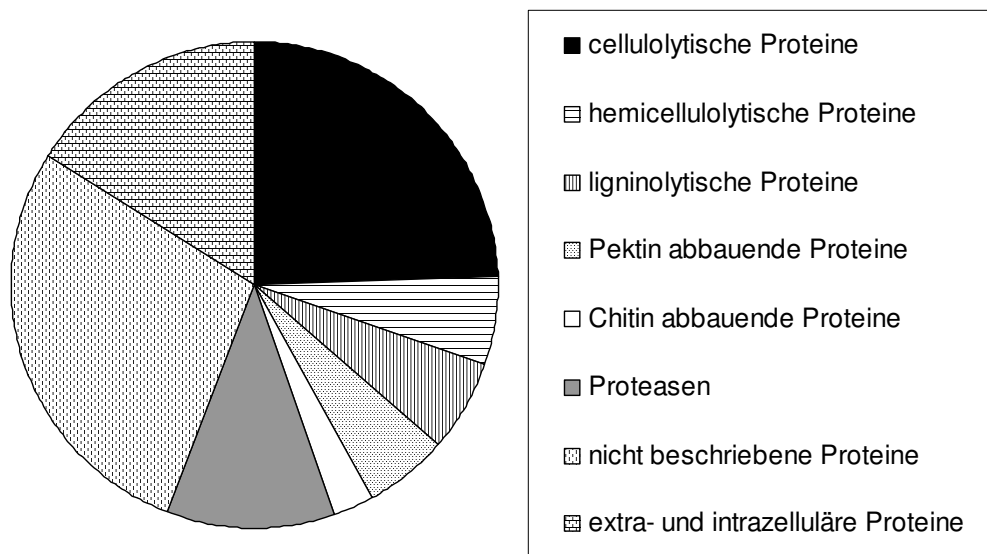


Abb. 4.21: Proteom über Fichten-Holzpuder (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion zusammengefasst)

Insgesamt ist festzustellen, dass zwischen den Kulturen über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder während 1 und 3 Wochen der Anzucht keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen sind (Abb. 4.22).

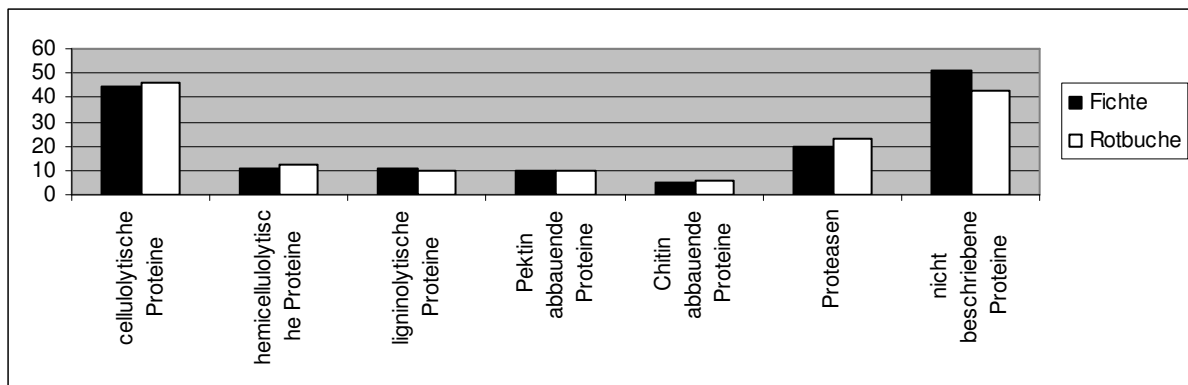


Abb. 4.22: Proteom von *Phanerochaete chrysosporium* über Fichten- und Rotbuchen-Holzpuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen im Vergleich

Den größten Zeitaufwand – ca.  $\frac{1}{4}$  der Bearbeitungszeit für diese Studie – nahmen die Charakterisierung und Annotation der insgesamt ca. 10.000 Proteinsequenzen (Größenordnung vor Eliminierung der sich mehrfach wiederholenden Hits je Protein und der Auswahl jener mit der besten prozentualen Absicherung) mit Hilfe der oben genannten Datenbanken in Anspruch, für die keine Software zur Auswertung genutzt werden konnte.

In den folgenden Tabellen sollen die erhaltenen Proteine aus der Flüssigkultur über Rotbuchen- bzw. Fichten-Holzpuder nach 1 bzw. 3 Wochen der Anzucht für die 1. Kultivierung, biologische und technische Reproduktion zusammenfassend dargestellt werden. Die homologen Proteinnamen (1. Spalte) sind nach ihrer Funktion (erkennbar in der letzten Spalte) sortiert und zur besseren Übersichtlichkeit jede zweite Zugehörigkeit zum entsprechenden Degradationssystem grau eingefärbt. Weiterhin ist zu jeder Proteinsequenz die experimentell ermittelte Bandengröße auf dem 1D-PAGE (2. Spalte), das theoretische Molekulargewicht (3. Spalte), die gewählte Datenbank (4. Spalte), die Homologiewahrscheinlichkeit (5. Spalte) und der zugehörige Organismus (6. Spalte) erwähnt. Wurde kein Organismus vermerkt, handelt es sich um eine Proteinsequenz von *Phanerochaete chrysosporium*.

Auch bei Vergleich der einzelnen Proteingruppen von *Phanerochaete chrysosporium* zeigt Abb. 4.23, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder und während 1 und 3 Wochen der Anzucht zu verzeichnen sind.

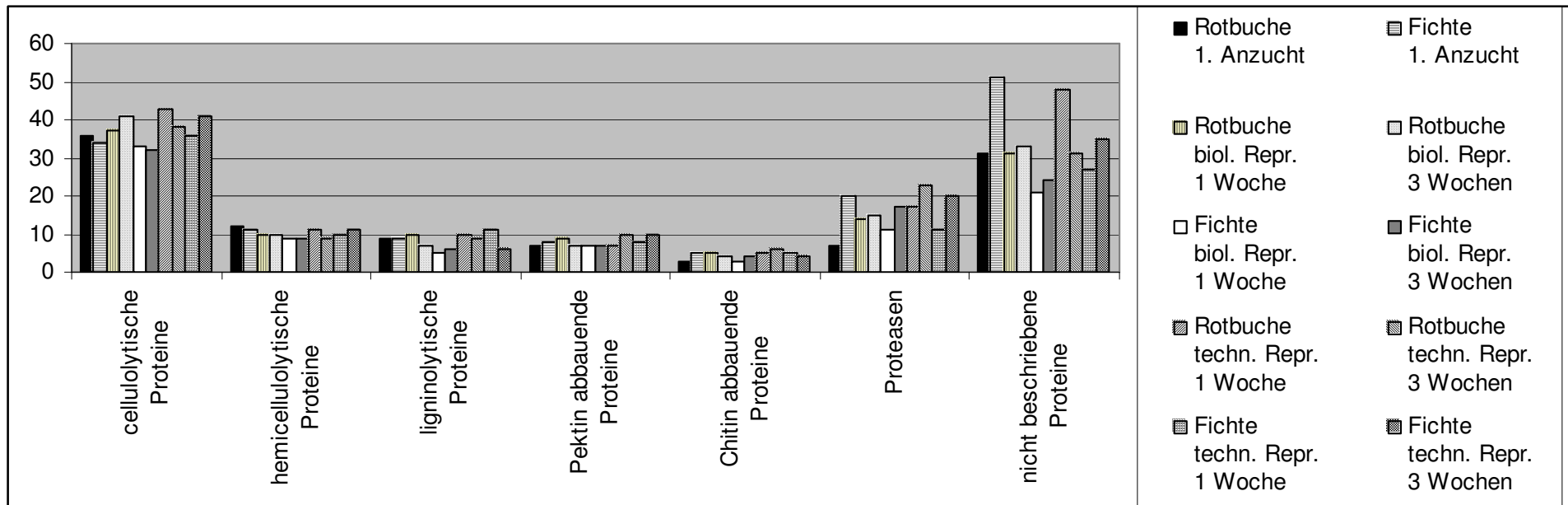


Abb. 4.23: Cellulolytische, hemicellulolytische, ligninolytische, Pektin und Chitin abbauende Proteine, Proteasen und nicht beschriebene Proteine von *Phanerochaete chrysosporium* über Fichten- und Rotbuchen-Holzpuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen im Vergleich

#### **4.4.1 Proteom über Rotbuchen-Holzpuder, 1. Kultivierung**

Über Rotbuchen-Holzpuder, 1. Kultivierung (siehe Abb. 4.24 und Tab. 4.1), wurden 36 cellulolytische homologe Proteine (16 Cellobiasen, 9 Endo- und 8 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase, 2 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) detektiert. Außerdem wurden 12 hemicellulolytische, 9 ligninolytische und 7 Pektin abbauende homologe Proteine gemessen. Weiterhin konnten 3 Chitinasen und 7 Proteasen erhalten werden. Schließlich wurden 31 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 25 weitere intrazelluläre Stoffwechselproteine detektiert. 39 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen konnten mithilfe des ExPASy Proteomics Servers annotiert werden.

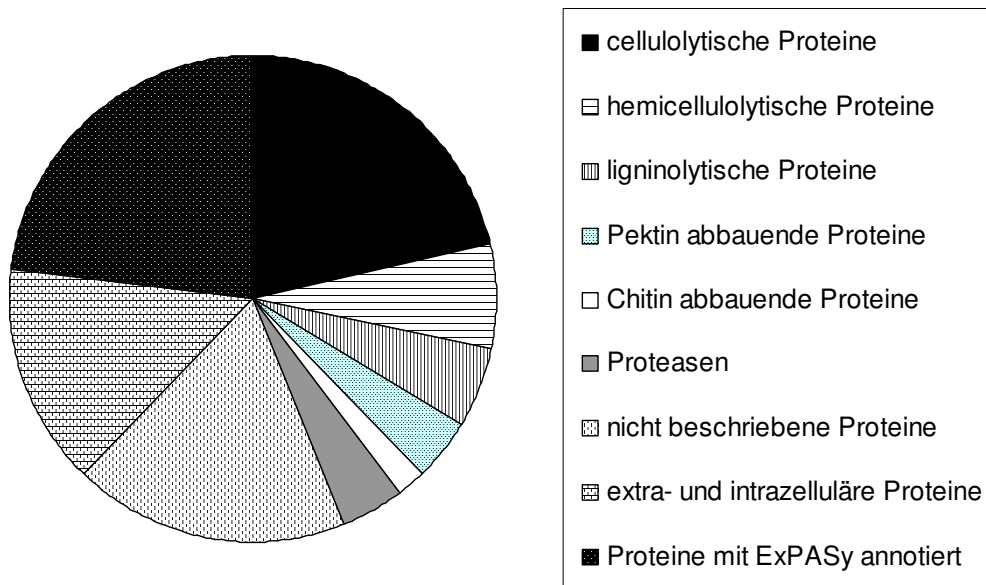


Abb. 4.24: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (1. Kultivierung)

Tab. 4.1: Extrazellulärer Proteinkomplex über Rotbuchen-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Alpha-glucosidase	54	101889	ExPASy	67	Postia placenta	cellobiase
Glucoamylase S1/S2 precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase) (1,4-alpha-D-glucan glucohydrolase)	44	57682	Swissprot	22	Saccharomyces cerevisiae	cellobiase
putative alpha-1,2-mannosidase	110	67573	eukKEGG	23	Candida albicans SC5314	cellobiase
Alpha-N-arabinofuranosidase A precursor (Arabinosidase A)	72	55288	Swissprot	29	Aspergillus niger	cellobiase
Glucoamylase S1/S2 precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase) (1,4-alpha-D-glucan glucohydrolase)	30	102388	Swissprot	14	Saccharomyces cerevisiae	cellobiase
Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor	58	59472	Swissprot	36	Penicillium citrinum	cellobiase
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	52	40767	ExPASy	86		cellobiase
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	77	84367	Swissprot	41	Cochliobolus carbonum	cellobiase
putative alpha-1,2-mannosidase	95	80636	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	77	103623	Swissprot	43	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Beta-glucosidase	95	86794	ExPASy	47	Aspergillus clavatus	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	95	85424	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Beta-mannosidase precursor	130	100623	Swissprot	36	Aspergillus niger	cellobiase
Glucoamylase precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	56	60763	Swissprot	49	Aspergillus shirousami	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	95	87957	Swissprot	45	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Acid trehalase	115	72696	ExPASy	63	Laccaria bicolor	cellobiase
Cellobiose dehydrogenase precursor	85	81957	Swissprot	100		Cellobiose dehydrogenase
Glycolipid anchored surface protein 1 precursor (Glycoprotein GP115) 1,3-beta-glucanosyltransferase GAS1	72	58041	Swissprot	36	Saccharomyces cerevisiae	Cellulose degr.
Polysaccharide lyase family 8 protein	110	92319	ExPASy	55	Laccaria bicolor	Cellulose degr.
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	44	42810	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase 3 precursor	46	49208	Swissprot	47	Humicola insolens	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	42	39566	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	27	26345	Swissprot	41	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
putative glucanase precursor	30	33316	eukKEGG	43	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	25	23647	Swissprot	35	Hypocrea jecorina	endoglucanase
putative glucanase precursor	32	33839	KEGG	44	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	50	49161	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	40	33566	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Exocellobiohydrolase II	37	24518	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	58	54852	Swissprot	99		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	58	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	37	---	Swissprot	41	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	52	48387	Swissprot	65	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exoglucanase I precursor (Exocellobiohydrolase I)	110	89570	Swissprot	44	Aspergillus aculeatus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54	53807	Swissprot	78		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	58	58105	Swissprot	79		exoglucanase

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	40	31039	Swissprot	63	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Beta-1,4-endoxylanase	46	37715	ExPASy	45	Thermobifida alba	Hemicellulose degr.
Beta-xylosidase	85	83794	ExPASy	58	Postia placenta	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	48	---	Swissprot	68	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Cinnamoyl esterase)	42	35564	Swissprot	47	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	44	30521	Swissprot	45	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase B precursor	30	30405	Swissprot	62	Emericella nidulans	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	48	43543	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	44	42313	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	40	37662	Swissprot	61	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Crystal protein (similarity to type-B carboxylesterase/lipase family)	52	61924	ExPASy	49	Coprinopsis cinerea	hydrolase
Candidate carboxylesterase from carbohydrate esterase family CE10	77	55971	ExPASy	61	Postia placenta	hydrolase
Phytase (Fragment) (Signal, Hydrolase, extracellular region, acid phosphatase activity)	72	60383	ExPASy	61	Laccaria bicolor	hydrolase
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	44	39867	Swissprot	82		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	44	40090	Swissprot	100		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	44	39961	Swissprot	90		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	44	39504	Swissprot	100		Lignin depol.
Glyoxal oxidase precursor	58	59130	ExPASy	95		Lignin depol.
Aryl-alcohol oxidase (lignin degradation, production of hydrogen peroxide as glyoxal oxidase by Pleurotus eryngii)	72	63453	ExPASy	46	Pleurotus eryngii	Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	44	39532	Swissprot	100		Lignin depol.
Oxalate decarboxylase	52	48270	ExPASy	62	Dichomitus squalens	(Lignin depol.) intrazellulär

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Galactan 1,3-beta-galactosidase precursor	46	49095	ExPASy	67		Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	120	113326	Swissprot	24	Aspergillus niger	Pectin degr.
Rhamnogalacturonase A precursor (RGase A); polygalacturonase	52	44279	Swissprot	52	Aspergillus aculeatus	Pectin degr.
Alpha-galactosidase precursor (Melibiase) (Alpha-D-galactoside galactohydrolase)	56	47676	Swissprot	47	Zygosaccharomyces cidri	Pectin degr.
Alpha-galactosidase precursor	60	41881	ExPASy	49	Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	110	109766	Swissprot	36	Aspergillus niger	Pectin degr.
Galactose-1-epimerase	48	38280	ExPASy	57	Coprinopsis cinerea	Pectin degr.
N-acetylhexosaminidase	60	46948	ExPASy	64	Postia placenta	Chitinase
Chitinase A1 precursor	67	42777	Swissprot	24	Bacillus circulans	Chitinase
Chitinase 1 precursor	52	54884	Swissprot	48	Aphanocladium album	Chitinase
Aspartic peptidase A1	60	59619	ExPASy	32	Laccaria bicolor	protease
Aspartic protease precursor	32	44214	ExPASy	37	Phaffia rhodozyma	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25	21680	Swissprot	54	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25	26613	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Subtilisin-like protease precursor	85	87528	ExPASy	54	Pleurotus ostreatus	protease
Subtilisin-like protease (Fragment)	95	93327	ExPASy	92		protease
Insulin-degrading enzyme (metalloendopeptidase activity)	120	113027	ExPASy	39	Coprinopsis cinerea	protease
undescribed	72	49702	whiterot1	100		undescribed
undescribed	37	78355	whiterot1	73		undescribed
undescribed	42	39807	whiterot1	94		undescribed
undescribed	15	14173	whiterot1	100		undescribed
undescribed	60	79311	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27	30169	whiterot1	100		undescribed
undescribed	15	17888	whiterot1	74		undescribed
undescribed	52	48910	whiterot1	100		undescribed
undescribed	30	---	whiterot1	80		undescribed
undescribed	67	59629	whiterot1	100		undescribed
undescribed	83	83094	whiterot1	100		undescribed
undescribed	50	44266	whiterot1	60		undescribed
undescribed	95	83821	whiterot1	74		undescribed
undescribed	60	31633	whiterot1	52		undescribed
undescribed	40	40003	whiterot1	38		undescribed
undescribed	52	---	whiterot1	27		undescribed
undescribed	115	68256	whiterot1	88		undescribed
undescribed	115	66583	whiterot1	95		undescribed
undescribed	110	108806	whiterot1	98		undescribed
undescribed	83	77676	whiterot1	97		undescribed
undescribed	72	75331	whiterot1	97		undescribed
Putative uncharacterized protein	26	80641	ExPASy	31	Coprinopsis cinerea	-
Predicted protein	42	---	ExPASy	45	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	25	90937	ExPASy	31	Coprinopsis cinerea	-
Predicted protein	72	55135	ExPASy	70	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	60	54587	ExPASy	53	Schizophyllum commune	-
Putative uncharacterized protein	50	49987	ExPASy	43	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	48	58806	ExPASy	64	Postia placenta	-
no homologous sequence	115	78144	-	-	-	-
no homologous sequence	27	13486	-	-	-	-
no homologous sequence	95	65049	-	-	-	-

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Ubiquitin	9	18108	ExpASy	83	Coprinopsis cinerea	intracellular
Membrane anchored protein in TolA-TolQ-TolR complex	77	47509	ExpASy	26	Escherichia coli	intracellular
RNA binding protein, putative	44	23855	ExpASy	28	Trichophyton verrucosum	intracellular
putative cycloisomerase 2 family protein	40	37061	eukKEGG	26	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Lipase 2 precursor (Lipase II) (GCL II)	67	54031	Swissprot	26	Galactomyces geotrichum	intracellular
Putative uncharacterized protein (similar to mucin)	25	129972	ExpASy	32	Schizophyllum commune H4-8	intracellular
hypothetical coiled-coil protein (RNA binding)	77	120122	eukKEGG	32	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
SPC3; signal peptidase subunit	44	41108	eukKEGG	50	Candida albicans SC5314	intracellular
ubi4-ubiquitin family protein	9	42734	eukKEGG	99	Eremothecium gossypii	intracellular
large subunit ribosomal protein L40e	9	14500	eukKEGG	95	Eremothecium gossypii	intracellular
Midasin; regulation of transcription, DNA-dependent	130	535975	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	intracellular
Pre-mRNA-processing-splicing factor	27	145418	ExpASy	95	Coprinopsis cinerea	intracellular
CBS (cystathionine beta synthase) domain-containing protein (catalytic activity)	27	39927	ExpASy	69	Coprinopsis cinerea	intracellular
Ubiquitin	9	43095	ExpASy	100		intracellular
HSL1; negative regulator of swe1 kinase; Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning (KOG description)	52	29845	eukKEGG	61	Candida albicans SC5314	intracellular
Lipase 4 precursor	54	---	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
Lipase 4 precursor	54	51401	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
Kinesin-like protein klpA (Cytoskeleton - KOG description)	44	38758	Swissprot	60	Emericella nidulans	intracellular
Pc18g02250 protein (strong similarity to polyamine oxidase PAO -Zea mays)	26	55523	ExpASy	42	Penicillium chrysogenum	intracellular
cta1; catalase	60	61627	KEGG	50	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Putative uncharacterized protein (nucleic acid binding)	26	35443	ExpASy	72	Schizophyllum commune	intracellular
Elongation Factor 1-Alpha (EF-1-Alpha) (Translation, ribosomal structure and biogenesis)	58	50052	Swissprot	96	Schizophyllum commune	intracellular
NADPH oxidase A (Membrane, electron carrier activity)	44	62745	ExpASy	79	Laccaria bicolor	intracellular
putative membrane transporter	46	58367	KEGG	35	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
SEC7; guanine nucleotide exchange protein for ADP-robosylation factor; (Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport - KOG description)	25	211538	KEGG	38	Candida albicans	intracellular



#### **4.4.2 Proteom über Fichten-Holzpuder, 1. Kultivierung**

Über Fichten-Holzpuder, 1. Kultivierung (siehe Abb. 4.25 und Tab. 4.2), wurden 34 cellulolytische homologe Proteine (11 Cellobiasen, 12 Endo- und 8 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase, 2 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) gemessen. Weiterhin wurden 11 hemicellulolytische, 9 ligninolytische und 8 Pektin abbauende homologe Proteine gefunden. Außerdem wurden 5 Chitinasen und 20 Proteasen detektiert. 51 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 29 weitere extra- und auch intrazelluläre Stoffwechselproteine wurden ebenfalls erhalten. Schließlich konnten 49 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen mittels ExPASy Proteomics Server annotiert werden.

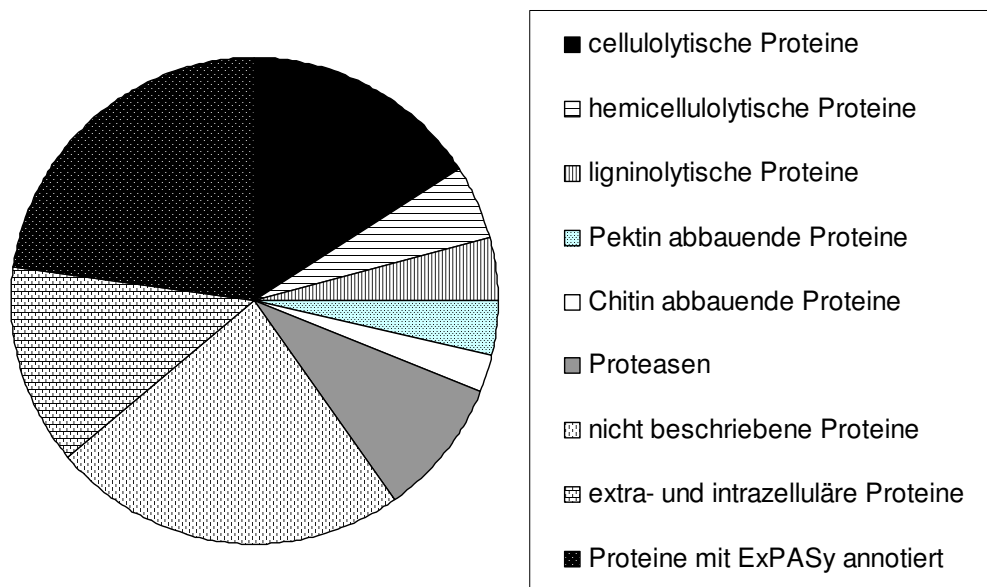


Abb. 4.25: Proteom über Fichten-Holzpuder (1. Kultivierung)

Tab. 4.2: Extrazellulärer Proteinkomplex über Fichten-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Alpha-glucosidase	58	101889	ExpASy	67	Postia placenta	cellobiase
Alpha-N-arabinofuranosidase A precursor (Arabinosidase A)	77	55288	Swissprot	29	Aspergillus niger	cellobiase
Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor	60	59472	Swissprot	36	Penicillium citrinum	cellobiase
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	82	84367	Swissprot	41	Cochliobolus carbonum	cellobiase
putative alpha-1,2-mannosidase	100	80636	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	80	103623	Swissprot	43	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Beta-glucosidase	100	86794	ExpASy	47	Aspergillus clavatus	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	100	85424	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Beta-mannosidase precursor	100	100623	Swissprot	36	Aspergillus niger	cellobiase
Glucosylase precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	60	60763	Swissprot	49	Aspergillus shirousami	cellobiase
Acid trehalase	130	72696	ExpASy	63	Laccaria bicolor	cellobiase
Cellobiose dehydrogenase precursor	90	81957	Swissprot	100		Cellobiose dehydrogenase
Glycolipid anchored surface protein 1 precursor (Glycoprotein GP115) 1,3-beta-glucanosyltransferase GAS1	77	58041	Swissprot	36	Saccharomyces cerevisiae	Cellulose degr.
1,3-beta-glucan synthase component bgs4 (1,3-beta-D-glucan-UDP glucosyltransferase)	33	207162	Swissprot	53	Schizosaccharomyces pombe	Cellulose degr.
Endoglucanase 3 precursor	48	49208	Swissprot	47	Humicola insolens	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	42	39566	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25	26968	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	28	26345	Swissprot	41	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
putative glucanase precursor	33	33316	eukKEGG	43	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	48	34496	Swissprot	37	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	25	23647	Swissprot	35	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	42	32739	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	38	32495	Swissprot	39	Hypocrea jecorina	endoglucanase
putative glucanase precursor	33	33839	KEGG	44	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	52	49161	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	38	33566	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Exocellobiohydrolase II	38	24518	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	58	54852	Swissprot	99		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	58	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	58	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	38	---	Swissprot	41	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	56	48387	Swissprot	65	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	52	53807	Swissprot	78		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	58	58105	Swissprot	79		exoglucanase
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	38	31039	Swissprot	63	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Beta-1,4-endoxylanase	45	37715	ExpASy	45	Thermobifida alba	Hemicellulose degr.
Beta-xylosidase	90	83794	ExpASy	58	Postia placenta	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	33	35193	Swissprot	68	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Cinnamoyl esterase)	42	35564	Swissprot	47	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	42	30521	Swissprot	45	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase B precursor	33	30405	Swissprot	62	Emericella nidulans	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	45	43543	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	42	42313	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	42	37662	Swissprot	61	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Candidate carboxylesterase from carbohydrate esterase family CE10	77	55971	ExpASy	61	Postia placenta	hydrolase

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	48	39867	Swissprot	82		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	45	40090	Swissprot	100		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	45	39961	Swissprot	90		Lignin depol.
Ligninase H2 precursor (Diarylpropane peroxidase) (Lignin peroxidase) (LG4)	42	39450	Swissprot	99		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	45	39504	Swissprot	100		Lignin depol.
Glyoxal oxidase precursor	62	59130	ExPASy	95		Lignin depol.
Aryl-alcohol oxidase (lignin degradation, production of hydrogen peroxide as glyoxal oxidase by <i>Pleurotus eryngii</i> )	77	63453	ExPASy	46	<i>Pleurotus eryngii</i>	Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	45	39532	Swissprot	100		Lignin depol.
Oxalate decarboxylase	50	48270	ExPASy	62	<i>Dichomitus squalens</i>	(Lignin depol.) intrazellulär
Galactan 1,3-beta-galactosidase precursor	50	49095	ExPASy	67		Pectin degr.
Exopolygalacturonase precursor (ExoPG) (Galacturan 1,4-alpha-galacturonidase) (Poly(1,4-alpha-D-galacturonide)galacturonohydrolase)	58	23367	Swissprot	29	<i>Cochliobolus carbonum</i>	Pectin degr.
Exopolygalacturonase precursor (ExoPG) (Galacturan 1,4-alpha-galacturonidase)	72	32195	Swissprot	47	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	130	113326	Swissprot	24	<i>Aspergillus niger</i>	Pectin degr.
Rhamnogalacturonase A precursor (RGase A); polygalacturonase	45	44279	Swissprot	52	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Pectin degr.
Alpha-galactosidase precursor (Melibiase) (Alpha-D-galactoside galactohydrolase)	60	47676	Swissprot	47	<i>Zygosaccharomyces cidri</i>	Pectin degr.
Pectinesterase precursor (Pectin methylesterase)	42	35997	Swissprot	39	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Pectin degr.
Galactose-1-epimerase	38	38280	ExPASy	57	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Pectin degr.
N-acetylhexosaminidase	69	46948	ExPASy	64	<i>Postia placenta</i>	Chitinase
Chitinase A1 precursor	60	42777	Swissprot	24	<i>Bacillus circulans</i>	Chitinase
Chitinase 1 precursor	33	31508	Swissprot	49	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	Chitinase
Chitinase 1 precursor	52	54884	Swissprot	48	<i>Aphanocladium album</i>	Chitinase
Putative uncharacterized protein (Hypothetical protein that contains an Interpro domain comprising a chitinase active site)	28	30358	ExPASy	75	<i>Postia placenta</i>	Chitinase

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
putative amidase	69	55215	eukKEGG	36	Schizosaccharomyces pombe	hydrolase/protease
Carboxypeptidase cpdS precursor	62	57748	Swissprot	40	Aspergillus saitoi	protease
Putative uncharacterized protein (Aspartyl protease, aspartic-type endopeptidase activity)	72	59619	ExPASy	32	Coprinopsis cinerea	protease
stress response protein rds1p						
Peptidase M, neutral zinc metallopeptidases, zinc-binding site	50	34483	eukKEGG	30	Schizosaccharomyces pombe	protease
Polyporoepsin (Aspartic proteinase)	38	45901	Swissprot	62	Irpex lacteus	protease
Putative aspartyl protease	38	42856	ExPASy	59	Nidula niveotomentosa	protease
Putative aspartyl protease	52	41008	ExPASy	53	Nidula niveotomentosa	protease
Aspartic protease precursor	38	44784	ExPASy	34	Phaffia rhodozyma	protease
Aspartic protease precursor	33	44214	ExPASy	37	Phaffia rhodozyma	protease
Tripeptidyl peptidase A	45	59059	ExPASy	46	Coprinopsis cinerea	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25	26781	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25	27153	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Aspartic peptidase A1	42	36918	ExPASy	72	Laccaria bicolor	protease
ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2; Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin (GO Description)	52	64076	KEGG	28	Dictyostelium discoideum	protease
Family S53 protease	38	57596	ExPASy	56		protease
Subtilisin-like protease precursor	90	87528	ExPASy	54	Pleurotus ostreatus	protease
20S proteasome component Y13 (endopeptidase activity)	77	34439	KEGG	55	Candida albicans SC5314	protease
Subtilisin-like protease (Fragment)	90	93327	ExPASy	92		protease
Polyporoepsin (Aspartic proteinase)	38	44134	Swissprot	75	Irpex lacteus	protease
Polyporoepsin (Aspartic proteinase)	38	41208	Swissprot	64	Irpex lacteus	protease

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
undescribed	77	49702	whiterot1	100		undescribed
undescribed	17	51852	whiterot1	100		undescribed
undescribed	28	28790	whiterot1	100		undescribed
undescribed	42	72335	whiterot1	82		undescribed
undescribed	45	78355	whiterot1	73		undescribed
undescribed	42	39807	whiterot1	94		undescribed
undescribed	17	14173	whiterot1	100		undescribed
undescribed	33	79311	whiterot1	100		undescribed
undescribed	28	30169	whiterot1	100		undescribed
undescribed	17	17888	whiterot1	74		undescribed
undescribed	52	48910	whiterot1	100		undescribed
undescribed	33	---	whiterot1	80		undescribed
undescribed	72	59629	whiterot1	100		undescribed
undescribed	52	44266	whiterot1	60		undescribed
undescribed	90	148152	whiterot1	43		undescribed
undescribed	100	83821	whiterot1	74		undescribed
undescribed	69	31633	whiterot1	52		undescribed
undescribed	45	39123	whiterot1	24		undescribed
undescribed	69	32799	whiterot1	42		undescribed
undescribed	69	32592	whiterot1	40		undescribed
undescribed	82	62237	whiterot1	88		undescribed
undescribed	10	82426	whiterot1	87		undescribed
undescribed	56	---	whiterot1	27		undescribed
undescribed	19	---	whiterot1	35		undescribed
undescribed	100	68710	whiterot1	36		undescribed
undescribed	19	67470	whiterot1	84		undescribed
undescribed	90	66159	whiterot1	92		undescribed
undescribed	130	108806	whiterot1	98		undescribed
undescribed	28	27395	whiterot1	51		undescribed
undescribed	82	77676	whiterot1	97		undescribed
undescribed	19	20891	whiterot1	100		undescribed
undescribed	69	53831	whiterot1	94		undescribed
undescribed	77	75331	whiterot1	97		undescribed
Predicted protein	56	35873	ExPASy	59	Laccaria bicolor	-
Putative uncharacterized protein (Fragment)	19	81840	ExPASy	54	Postia placenta	-
Predicted protein	50	42242	ExPASy	51	Laccaria bicolor	-
Predicted protein	72	55135	ExPASy	70	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	69	54587	ExPASy	53	Schizophyllum commune	-
Predicted protein	48	51228	ExPASy	26	Laccaria bicolor	-
Predicted protein	130	98345	ExPASy	50	Laccaria bicolor	-
Putative uncharacterized protein	90	213436	ExPASy	23	Aspergillus terreus	-
Predicted protein	82	131234	ExPASy	51	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	52	49987	ExPASy	43	Postia placenta	-
Predicted protein	42	111041	ExPASy	43	Postia placenta	-
Predicted protein	77	---	ExPASy	36	Laccaria bicolor	-
Putative uncharacterized protein	52	58806	ExPASy	64	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	100	16480	ExPASy	70	Schizophyllum commune	-
Putative uncharacterized protein	58	45304	ExPASy	54	Postia placenta	-
no homologous sequence	100	78144	-	-	-	-
no homologous sequence	28	13486	-	-	-	-
no homologous sequence	100	65049	-	-	-	-

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Predicted protein (DNA binding)	19	118195	ExpASy	50	Laccaria bicolor	intracellular
Putative uncharacterized protein (DNA binding)	45	36621	ExpASy	28	Cryptococcus neoformans	intracellular
NOP13; Nucleolar Protein 13	45	52929	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	intracellular
putative cytoskeleton assembly control protein	52	---	eukKEGG	22	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Lipase precursor (Triacylglycerol lipase)						
Lipid transport and metabolism (KOG description)	28	31411	Swissprot	28	Rhizomucor miehei	intracellular
Membrane anchored protein in ToIA-ToIQ-ToIR complex	56	47509	ExpASy	26	Escherichia coli	intracellular
Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family	42	38990	eukKEGG	31	Candida albicans SC5314	intracellular
Predicted protein (protein serine/threonine kinase activity)	56	58211	ExpASy	24	Postia placenta	intracellular
undescribed (Zn-finger (General function prediction only - KOG description))	72	---	KOG	-	-	(general)
Gas(Growth arrest-specific)1-like protein [Gks1]	17	24463	ExpASy	28	Dactylellina haptotyla	intracellular
Polyprotein (Fragment) (RNA-dependent DNA replication, ribonuclease H activity)	140	58723	ExpASy	33		intracellular
putative peroxisomal membrane protein	38	---	eukKEGG	32	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
T19N8.7; glycine-rich protein (RNA processing and modification - KOG description)	130	33545	ExpASy	14	Arabidopsis thaliana	intracellular
putative cycloisomerase 2 family protein	42	37061	eukKEGG	26	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Ribonuclease U2 (RNase U2)	38	14895	Swissprot	56	Ustilago sphaerogena	intracellular
Lipase 2 precursor (Lipase II) (GCL II)	60	54031	Swissprot	26	Galactomyces geotrichum	intracellular
Dynein heavy chain, cytosolic (DYHC) (Cytoskeleton)	42	---	Swissprot	49	Emericella nidulans	intracellular
D-lactonohydrolase-like protein	52	45650	ExpASy	58	Poria monticola	hydrolase/protease
Midasin; regulation of transcription, DNA-dependent	140	535975	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	intracellular
Lipase 4 precursor	58	---	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
purine nucleoside permease	45	36601	eukKEGG	47	Candida albicans SC5314	intracellular
Lipase 4 precursor	58	51401	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
Predicted protein nucleus, transcription regulator activity	77	28906	ExpASy	50	Laccaria bicolor	intracellular
cta1; catalase	69	61627	KEGG	50	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
transcriptional accessory protein	72	---	KEGG	40	Candida albicans SC5314	intracellular
DAG7; riboflavin aldehyde-forming enzyme (raf); formation of mycelial aggregates; response to drug	19	12090	KEGG	55	Candida albicans SC5314	intracellular
Dehydrogenase E1 and transketolase domain-containing protein 1 (mitochondrion, citric acid cycle)	90	96350	ExpASy	60	Coprinopsis cinerea	intracellular
Putative uncharacterized protein nucleic acid binding, RNA binding	72	35443	ExpASy	72	Schizophyllum commune	intracellular
SEC7; guanine nucleotide exchange protein for ADP-robosylation factor; (Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport - KOG description)	10	211538	KEGG	38	Candida albicans	intracellular

#### **4.4.3 Proteom über Rotbuchen-Holzpuder, biologische Reproduktion, 1 Woche Anzucht**

Über Rotbuchen-Holzpuder, während der biologischen Reproduktion und 1 Woche der Anzucht (siehe Abb. 4.26 und Tab. 4.3), wurden 37 cellulolytische homologe Proteine (13 Cellobiasen, 14 Endo- und 9 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase) detektiert. Außerdem wurden 10 hemicellulolytische, 10 ligninolytische und 9 Pektin abbauende homologe Proteine gemessen. Weiterhin konnten 5 Chitinasen und 14 Proteasen erhalten werden. Schließlich wurden 31 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 27 weitere intrazelluläre Stoffwechselproteine detektiert. 28 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen konnten mithilfe des ExPASy Proteomics Servers annotiert werden.

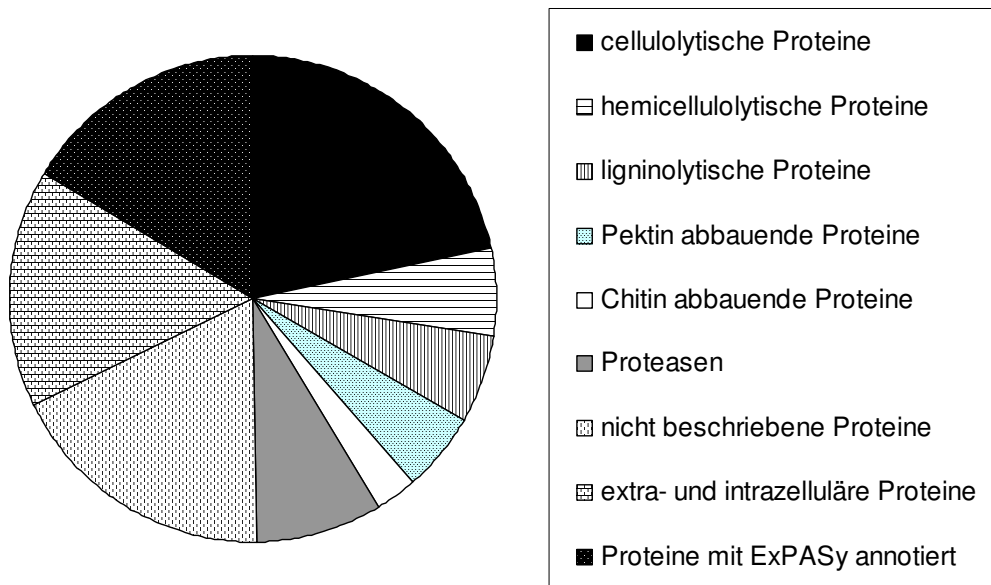


Abb. 4.26: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (biologische Reproduktion, 1 Woche Anzucht)

Tab. 4.3: Extrazellulärer Proteinkomplex über Rotbuchen-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Alpha-glucosidase	54-59	101889	ExPASy	67	Postia placenta	cellobiase
putative alpha-1,2-mannosidase	85-105	67573	eukKEGG	23	Candida albicans SC5314	cellobiase
Alpha-N-arabinofuranosidase A precursor (Arabinosidase A)	59-70	55288	Swissprot	29	Aspergillus niger	cellobiase
Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor	54-59	59472	Swissprot	36	Penicillium citrinum	cellobiase
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	70-77	84367	Swissprot	41	Cochliobolus carbonum	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	70-77	103623	Swissprot	43	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Beta-glucosidase	85-105	86794	ExPASy	47	Aspergillus clavatus	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	85-105	85424	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Beta-mannosidase precursor	105-130	100623	Swissprot	36	Aspergillus niger	cellobiase
Glucoamylase precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	54-59	60763	Swissprot	49	Aspergillus shirousami	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	105-130	87957	Swissprot	45	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	50-54	47694	ExPASy	84		cellobiase
Acid trehalase	85-105	72696	ExPASy	63	Laccaria bicolor	cellobiase
Cellobiose dehydrogenase precursor	77-85	81957	Swissprot	100		Cellobiose dehydrogenase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	40-46	42810	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase 3 precursor	46-50	49208	Swissprot	47	Humicola insolens	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	34-40	35913	Swissprot	31	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	30-34	39566	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25-27	26968	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25-27	26345	Swissprot	41	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
putative glucanase precursor	30-34	33316	eukKEGG	43	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	40-46	34496	Swissprot	37	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	20-25	23647	Swissprot	35	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	34-40	32739	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	40-46	32495	Swissprot	39	Hypocrea jecorina	endoglucanase
putative glucanase precursor	30-34	33839	KEGG	44	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	46-50	49161	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	34-40	33566	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Exocellobiohydrolase II	34-40	24518	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	54852	Swissprot	99		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	30-34	23203	Swissprot	41	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	46-50	48387	Swissprot	65	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exoglucanase I precursor (Exocellobiohydrolase I)	85-105	89570	Swissprot	44	Aspergillus aculeatus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	46-50	53807	Swissprot	78		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	58105	Swissprot	79		exoglucanase



Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	25-27	31039	Swissprot	63	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Beta-1,4-endoxylanase	40-46	37715	ExPASy	45	Thermobifida alba	Hemicellulose degr.
Beta-xylosidase	77-85	83794	ExPASy	58	Postia placenta	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	30-34	35193	Swissprot	68	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Cinnamoyl esterase)	46-50	35564	Swissprot	47	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	30-34	30521	Swissprot	45	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase B precursor	30-34	30405	Swissprot	62	Emericella nidulans	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	46-50	43543	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	46-50	42313	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	40-46	37662	Swissprot	61	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	40-46	39867	Swissprot	82		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	40-46	40090	Swissprot	100		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	40-46	39961	Swissprot	90		Lignin depol.
Ligninase H2 precursor (Diarylpropane peroxidase) (Lignin peroxidase) (LG4)	40-46	39450	Swissprot	99		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	40-46	39504	Swissprot	100		Lignin depol.
Ligninase H8 precursor (Diarylpropane peroxidase) (Lignin peroxidase)	40-46	39575	Swissprot	100		Lignin depol.
Glyoxal oxidase precursor	54-59	59130	ExPASy	95		Lignin depol.
Ligninase B precursor (Diarylpropane peroxidase) (Lignin peroxidase)	40-46	39873	Swissprot	90		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	40-46	39532	Swissprot	100		Lignin depol.
Oxalate decarboxylase	46-50	48270	ExPASy	62	Dichomitus squalens	(Lignin depol.) intrazellulär
Galactan 1,3-beta-galactosidase precursor	46-50	49095	ExPASy	67		Pectin degr.
Polygalacturonase precursor (Pectinase)	46-50	39807	Swissprot	41	Aspergillus parasiticus	Pectin degr.
Exopolygalacturonase precursor (ExoPG) (Galacturan 1,4-alpha-galacturonidase)	59-70	32195	Swissprot	47	Aspergillus tubingensis	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	105-130	113326	Swissprot	24	Aspergillus niger	Pectin degr.
Rhamnogalacturonase A precursor (RGase A); polygalacturonase	50-54	44279	Swissprot	52	Aspergillus aculeatus	Pectin degr.
Pectinesterase precursor (Pectin methylesterase)	34-40	35997	Swissprot	39	Aspergillus tubingensis	Pectin degr.
Alpha-galactosidase precursor	59-70	41881	ExPASy	49	Hypocrea jecorina	Pectin degr.
Galactose-1-epimerase	46-50	38280	ExPASy	57	Coprinopsis cinerea	Pectin degr.
Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase (Endo-1,4-beta-galactanase)	30-34	36746	Swissprot	44	Corynascus heterothallicus	Pectin degr.
Chitinase 2 precursor	46-50	49199	Swissprot	42	Rhizopus microsporus var. oligosporus	Chitinase
N-acetylhexosaminidase	59-70	46948	ExPASy	64	Postia placenta	Chitinase
Chitinase 1 precursor	30-34	31508	Swissprot	49	Rhizopus microsporus var. oligosporus	Chitinase
Chitinase 1 precursor	50-54	54884	Swissprot	48	Aphanocladium album	Chitinase
Putative uncharacterized protein (Hypothetical protein that contains an Interpro domain comprising a chitinase active site)	27-30	30358	ExPASy	75	Postia placenta	Chitinase

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Carboxypeptidase cpdS precursor	54-59	57748	Swissprot	40	Aspergillus saitoi	protease
Putative aspartyl protease	34-40	42856	ExPASy	59	Nidula niveotomentosa	protease
Aspartic protease precursor	30-34	44784	ExPASy	34	Phaffia rhodozyma	protease
Aspartic protease precursor	30-34	44214	ExPASy	37	Phaffia rhodozyma	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	20-25	21680	Swissprot	54	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	12-15	26781	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	20-25	27153	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2; Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin (GO Description)	50-54	64076	KEGG	28	Dictyostelium discoideum	protease
Family S53 protease	85-105	57596	ExPASy	56		protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	20-25	26613	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Family S53 protease	34-40	59003	ExPASy	93		protease
Subtilisin-like protease precursor	77-85	87528	ExPASy	54	Pleurotus ostreatus	protease
Subtilisin-like protease (Fragment)	77-85	93327	ExPASy	92		protease
N,O-diacetyl muramidase, putative (lysozyme activity)	20-25	24457	ExPASy	63	Penicillium stipitatum	protease
undescribed	70-77	49702	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-30	32837	whiterot1	50		undescribed
undescribed	27-30	28790	whiterot1	100		undescribed
undescribed	40-46	78355	whiterot1	73		undescribed
undescribed	40-46	30801	whiterot1	94		undescribed
undescribed	15-18	14173	whiterot1	100		undescribed
undescribed	34-40	39208	whiterot1	100		undescribed
undescribed	25-27	79311	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-30	30169	whiterot1	100		undescribed
undescribed	15-18	17888	whiterot1	74		undescribed
undescribed	50-54	48910	whiterot1	100		undescribed
undescribed	59-70	59629	whiterot1	100		undescribed
undescribed	46-50	44266	whiterot1	60		undescribed
undescribed	85-105	83821	whiterot1	74		undescribed
undescribed	50-54	41236	whiterot1	100		undescribed
undescribed	85-105	66583	whiterot1	95		undescribed
undescribed; KOG1 198 - Zinc-binding oxidoreductase; Energy production and conversion	27-30	36205	whiterot1	91		undescribed
undescribed	105-130	108806	whiterot1	98		undescribed
undescribed	27-30	27395	whiterot1	51		undescribed
undescribed	77-85	77676	whiterot1	97		undescribed
undescribed	59-70	53831	whiterot1	94		undescribed
undescribed	70-77	75331	whiterot1	97		undescribed
Predicted protein	59-70	55135	ExPASy	70	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	59-70	54587	ExPASy	53	Schizophyllum commune	-
Putative uncharacterized protein	50-54	49987	ExPASy	43	Postia placenta	-
Predicted protein	27-30	22823	ExPASy	39	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	46-50	58806	ExPASy	64	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	20-25	45304	ExPASy	54	Postia placenta	-
no homologous sequence	25-27	24859	-	-	-	-
no homologous sequence	25-27	13486	-	-	-	-
no homologous sequence	85-105	78144	-	-	-	-

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
hypothetical serine-rich protein Carbohydrate transport and metabolism (KOG description)	25-27	19669	eukKEGG	36	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
hypothetical serine-rich protein Carbohydrate transport and metabolism (KOG description)	25-27	19669	eukKEGG	36	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
putative cytoskeleton assembly control protein Lipase precursor (Triacylglycerol lipase)	50-54	---	eukKEGG	22	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Lipid transport and metabolism (KOG description)	27-30	31411	Swissprot	28	Rhizomucor miehei	intracellular
Cytochrome c1 precursor Electron transport	105-130	90937	Swissprot	23	Paracoccus denitrificans	intracellular
Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family	34-40	38990	eukKEGG	31	Candida albicans SC5314	intracellular
Spore coat protein SP96	46-50	42242	eukKEGG	26	Dictyostelium discoideum	intracellular
Side tail fiber protein homolog from lambdoid prophage Rac; KOG4297 C-type lectin, Signal transduction mechanisms	15-18	24463	Swissprot	21	Escherichia coli	intracellular
Prespore protein Dp87 protein Sporulation	27-30	39881	eukKEGG	12	Dictyostelium discoideum	intracellular
vacuolar protein and homolog of Niemann Pick type C protein	18-20	18316	eukKEGG	34	Candida albicans SC5314	intracellular
putative cycloisomerase 2 family protein	34-40	37061	eukKEGG	26	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Lipase 2 precursor (Lipase II) (GCL II)	59-70	54031	Swissprot	26	Galactomyces geotrichum	intracellular
Gluconolactonase precursor (D-glucono-delta-lactone lactonohydrolase)	46-50	45650	Swissprot	29	Zymomonas mobilis	intracellular
Puromycin Resistance Protein PUR8 antibiotic biosynthetic process	12-15	70342	Swissprot	16	Streptomyces lipmanii	intracellular
Midasin; regulation of transcription, DNA-dependent	105-130	535975	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	intracellular
Polypeptide (Fragment) (integrase; reverse transcriptase; RNase H )	77-85	26883	ExPASy	70		intracellular
Lipase 4 precursor	50-54	---	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
Lipase 4 precursor	50-54	51401	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
Bile-salt-activated lipase precursor (BAL)	70-77	55971	Swissprot	24	Bos taurus	intracellular
Acyl-CoA-binding protein (ACBP)	12-15	11708	Swissprot	64	Homo sapiens	intracellular
riboflavin aldehyde-forming enzyme	12-15	9100	KEGG	32	Candida albicans SC5314	intracellular
phosphatidylinositol phosphate phosphatase; synaptojanin-like; protein transport	27-30	106624	KEGG	45	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Ubiquitin-activating enzyme E1 1 (Poly(A)+ RNA transport protein 3)	25-27	111606	Swissprot	60	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
putative 5' nucleotidase family protein; hydrolase activity	54-59	69168	KEGG	35	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
DAG7; riboflavin aldehyde-forming enzyme; response to drug	12-15	12090	KEGG	55	Candida albicans SC5314	intracellular
Choline dehydrogenase, mitochondrial precursor	59-70	63453	Swissprot	33	Mus musculus	intracellular
DNA polymerase delta large chain	34-40	---	KEGG	64	Schizosaccharomyces pombe	intracellular

#### **4.4.4 Proteom über Rotbuchen-Holzpufer, biologische Reproduktion, 3 Wochen**

##### **Anzucht**

Über Rotbuchen-Holzpufer, während der biologischen Reproduktion und 3 Wochen der Anzucht (siehe Abb. 4.27 und Tab. 4.4), wurden 41 cellulolytische homologe Proteine (11 Cellobiasen, 18 Endo- und 9 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase, 2 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) gemessen. Weiterhin wurden 10 hemicellulolytische, 7 ligninolytische und 7 Pektin abbauende homologe Proteine gefunden. Außerdem wurden 4 Chitinasen und 15 Proteasen detektiert. 33 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 19 weitere intrazelluläre Stoffwechselproteine wurden ebenfalls erhalten. Schließlich konnten 25 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen mittels ExPASy Proteomics Server annotiert werden.

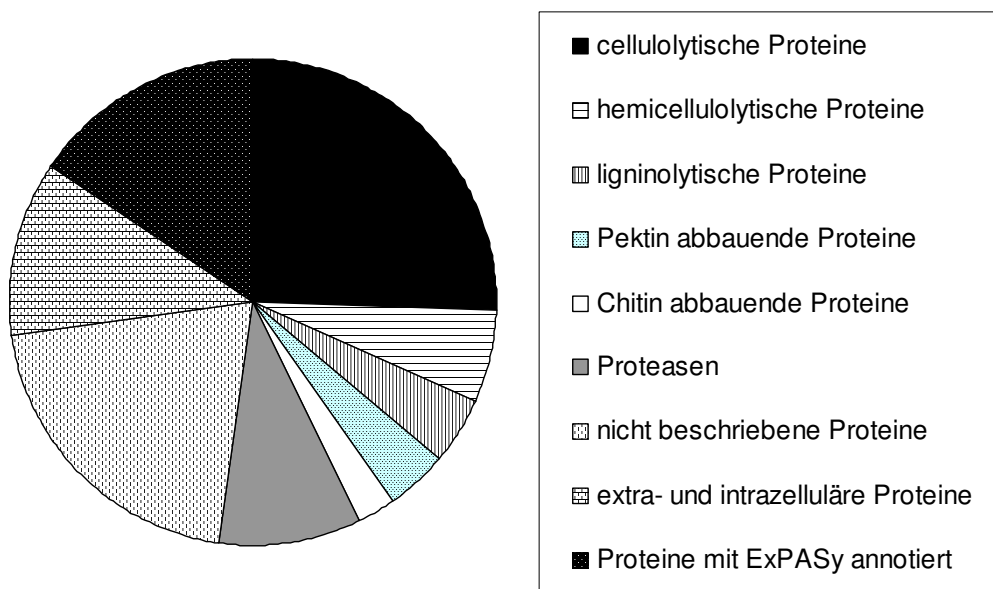


Abb. 4.27: Proteom über Rotbuchen-Holzpufer (biologische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht)

Tab. 4.4: Extrazellulärer Proteinkomplex über Rotbuchen-Holzpudder, 3 Wochen angezüchtet

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
putative alpha-1,2-mannosidase	105-130	67573	eukKEGG	23	Candida albicans SC5314	cellobiase
Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor	54-59	59472	Swissprot	36	Penicillium citrinum	cellobiase
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	77-85	84367	Swissprot	41	Cochliobolus carbonum	cellobiase
putative alpha-1,2-mannosidase	85-105	80636	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	70-77	103623	Swissprot	43	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Beta-glucosidase	85-105	86794	ExPASy	47	Aspergillus clavatus	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	85-105	85424	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Beta-mannosidase precursor	130-160	100623	Swissprot	36	Aspergillus niger	cellobiase
Glucosylase precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	50-54	60763	Swissprot	49	Aspergillus shirousami	cellobiase
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	50-54	47694	ExPASy	84		cellobiase
Acid trehalase	85-105	72696	ExPASy	63	Laccaria bicolor	cellobiase
Cellobiose dehydrogenase precursor	85-105	81957	Swissprot	100		Cellobiose dehydrogenase
Glycosyltransferase family 1 protein (Fragment)	34-40	47306	ExPASy	31	Schizophyllum commune	Cellulose degr.
Glycolipid anchored surface protein 1 precursor (Glycoprotein GP115) 1,3-beta-glucanosyltransferase GAS1	70-77	58041	Swissprot	36	Saccharomyces cerevisiae	Cellulose degr.
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	34-40	42810	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Alpha-N-arabinofuranosidase A precursor (Arabinosidase A)	70-77	55288	Swissprot	29	Aspergillus niger	endoglucanase
Endoglucanase 3 precursor	40-46	49208	Swissprot	47	Humicola insolens	endoglucanase
Arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase A precursor	30-34	32869	Swissprot	36	Aspergillus niger	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	34-40	39566	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25-27	26968	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	27-30	26345	Swissprot	41	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	34-40	34374	Swissprot	33	Hypocrea jecorina	endoglucanase
putative glucanase precursor	30-34	33316	eukKEGG	43	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	34-40	34496	Swissprot	37	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	25-27	23647	Swissprot	35	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	34-40	32739	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	27-30	32495	Swissprot	39	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Cellulose-growth-specific protein precursor	34-40	32098	Swissprot	64	Agaricus bisporus	endoglucanase
Cellulose-growth-specific protein precursor	34-40	28084	Swissprot	30	Agaricus bisporus	endoglucanase
putative glucanase precursor	30-34	33839	KEGG	44	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	46-50	49161	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	34-40	33566	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Exocellobiohydrolase II	34-40	24518	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	54852	Swissprot	99		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	34-40	---	Swissprot	41	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	50-54	48387	Swissprot	65	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exoglucanase I precursor (Exocellobiohydrolase I)	85-105	89570	Swissprot	44	Aspergillus aculeatus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	50-54	53807	Swissprot	78		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	58105	Swissprot	79		exoglucanase
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	34-40	31039	Swissprot	63	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Beta-1,4-endoxylanase	40-46	37715	ExPASy	45	Thermobifida alba	Hemicellulose degr.
Beta-xylosidase	85-105	83794	ExPASy	58	Postia placenta	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	34-40	35193	Swissprot	68	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Cinnamoyl esterase)	40-46	35564	Swissprot	47	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	27-30	30521	Swissprot	45	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase B precursor	30-34	30405	Swissprot	62	Emericella nidulans	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	40-46	43543	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	34-40	42313	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	40-46	37662	Swissprot	61	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	40-46	39867	Swissprot	82		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	40-46	40090	Swissprot	100		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	46-50	39961	Swissprot	90		Lignin depol.
Ligninase H2 precursor (Diarylpropane peroxidase) (Lignin peroxidase) (LG4)	40-46	39450	Swissprot	99		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	46-50	39504	Swissprot	100		Lignin depol.
Glyoxal oxidase precursor	59-70	59130	ExPASy	95		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	46-50	39532	Swissprot	100		Lignin depol.
Galactan 1,3-beta-galactosidase precursor	50-54	49095	ExPASy	67		Pectin degr.
Polygalacturonase precursor (Pectinase)	40-46	39807	Swissprot	41	Aspergillus parasiticus	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	105-130	113326	Swissprot	24	Aspergillus niger	Pectin degr.
Rhamnogalacturonase A precursor (RGase A); polygalacturonase	46-50	44279	Swissprot	52	Aspergillus aculeatus	Pectin degr.
Pectinesterase precursor (Pectin methylesterase)	40-46	35997	Swissprot	39	Aspergillus tubingensis	Pectin degr.
Galactose-1-epimerase	46-50	38280	ExPASy	57	Coprinopsis cinerea	Pectin degr.
Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase (Endo-1,4-beta-galactanase)	30-34	36746	Swissprot	44	Corynascus heterothallicus	Pectin degr.
N-acetylhexosaminidase	59-70	46948	ExPASy	64	Postia placenta	Chitinase
Chitinase 1 precursor	34-40	31508	Swissprot	49	Rhizopus microsporus var. oligosporus	Chitinase
Chitinase 1 precursor	50-54	54884	Swissprot	48	Aphanocladium album	Chitinase
Putative uncharacterized protein (Hypothetical protein that contains an Interpro domain comprising a chitinase active site)	30-34	30358	ExPASy	75	Postia placenta	Chitinase
Putative aspartyl protease	34-40	42856	ExPASy	59	Nidula niveotomentosa	protease
Aspartic protease precursor	34-40	44784	ExPASy	34	Phaffia rhodozyma	protease
Aspartic protease precursor	34-40	44214	ExPASy	37	Phaffia rhodozyma	protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	34-40	35380	Swissprot	65	Irpex lacteus	protease
Tripeptidyl peptidase A	46-50	59059	ExPASy	46	Coprinopsis cinerea	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25-27	21680	Swissprot	54	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25-27	27153	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	34-40	39555	Swissprot	65	Irpex lacteus	protease
ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2; Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin (GO Description)	50-54	64076	KEGG	28	Dictyostelium discoideum	protease
Family S53 protease	40-46	57596	ExPASy	56		protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25-27	26613	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Family S53 protease	40-46	59003	ExPASy	93		protease
Subtilisin-like protease (Fragment)	85-105	93327	ExPASy	92		protease
N,O-diacetyl muramidase, putative (lysozyme activity)	20-25	24457	ExPASy	63	Penicillium stiptatum	protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	34-40	41208	Swissprot	64	Irpex lacteus	protease

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
undescribed	70-77	49702	whiterot1	100		undescribed
undescribed	30-34	32837	whiterot1	50		undescribed
undescribed	27-30	28790	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-30	30440	whiterot1	46		undescribed
undescribed	160-220	26595	whiterot1	97		undescribed
undescribed	46-50	78355	whiterot1	73		undescribed
undescribed	59-70	30801	whiterot1	94		undescribed
undescribed	18-20	14173	whiterot1	100		undescribed
undescribed	30-34	25592	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-30	79311	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-30	30169	whiterot1	100		undescribed
undescribed	50-54	48910	whiterot1	100		undescribed
undescribed	70-77	59629	whiterot1	100		undescribed
undescribed	50-54	44266	whiterot1	60		undescribed
undescribed	50-54	---	whiterot1	27		undescribed
undescribed	50-54	41236	whiterot1	100		undescribed
undescribed	105-130	66583	whiterot1	95		undescribed
undescribed	130-160	108806	whiterot1	98		undescribed
undescribed	27-30	27395	whiterot1	51		undescribed
undescribed	77-85	77676	whiterot1	97		undescribed
undescribed	77-85	64816	whiterot1	99		undescribed
undescribed	27-30	57434	whiterot1	100		undescribed
undescribed	70-77	53831	whiterot1	94		undescribed
undescribed	70-77	75331	whiterot1	97		undescribed
Predicted protein	70-77	55135	ExpASy	70	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	59-70	54587	ExpASy	53	Schizophyllum commune	-
Putative uncharacterized protein	50-54	49987	ExpASy	43	Postia placenta	-
Predicted protein	30-34	22823	ExpASy	39	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	50-54	58806	ExpASy	64	Postia placenta	-
Predicted protein		97800	ExpASy	59	Laccaria bicolor	-
no homologous sequence	18-20	20038	-	-	-	-
no homologous sequence	50-54	70881	-	-	-	-
no homologous sequence	27-30	13486	-	-	-	-

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
putative cytoskeleton assembly control protein	50-54	---	eukKEGG	22	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Cytochrome c1 precursor Electron transport	105-130	90937	Swissprot	23	Paracoccus denitrificans	intracellular
Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family	40-46	38990	eukKEGG	31	Candida albicans SC5314	intracellular
Vegetative cell wall protein gp1 precursor (Hydroxyproline-rich glycoprotein 1)	70-77	---	Swissprot	11	Chlamydomonas reinhardtii	intracellular
Side tail fiber protein homolog from lambdoid prophage Rac; KOG4297 - C-type lectin, Signal transduction mechanisms	18-20	24463	Swissprot	21	Escherichia coli	intracellular
DGCR14 protein (DiGeorge syndrome critical region 14 homolog) KOG2627 - Nuclear protein ES2	34-40	50742	Swissprot	26	Mus musculus	intracellular
vacuolar protein and homolog of Niemann Pick type C protein	20-25	18316	eukKEGG	34	Candida albicans SC5314	intracellular
putative cycloisomerase 2 family protein	40-46	37061	eukKEGG	26	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Lipase 2 precursor (Lipase II) (GCL II)	70-77	54031	Swissprot	26	Galactomyces geotrichum	intracellular
Gluconolactonase precursor (D-glucono-delta-lactone lactonohydrolase)	50-54	45650	Swissprot	29	Zymomonas mobilis	intracellular
hypothetical serine-rich repeat protein KOG2992 - Nucleolar GTPase/ATPase p130	18-20	80912	eukKEGG	12	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Mono- and diacylglycerol lipase precursor (MDGL)	27-30	33071	Swissprot	34	Penicillium camemberti	intracellular
Midasin; regulation of transcription, DNA-dependent	130-160	535975	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	intracellular
purine nucleoside permease	46-50	36601	eukKEGG	47	Candida albicans SC5314	intracellular
Lipase 4 precursor	54-59	51401	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
Hypothetical protein yagE (lyase activity)	50-54	---	Swissprot	35	Escherichia coli	intracellular
Bile-salt-activated lipase precursor (BAL)	70-77	55971	Swissprot	24	Bos taurus	intracellular
PTC5; type 2C protein phosphatase	25-27	52134	KEGG	38	Candida albicans SC5314	intracellular
Glutaredoxin	46-50	10498	Swissprot	47	Vernicia fordii	intracellular



#### **4.4.5 Proteom über Fichten-Holzpuder, biologische Reproduktion, 1 Woche Anzucht**

Über Fichten-Holzpuder, während der biologischen Reproduktion und 1 Woche der Anzucht (siehe Abb. 4.28 und Tab. 4.5), wurden 33 cellulolytische homologe Proteine (7 Cellobiasen, 15 Endo- und 9 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase, 1 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) detektiert. Außerdem wurden 9 hemicellulolytische, 5 ligninolytische und 7 Pektin abbauende homologe Proteine gemessen. Weiterhin konnten 3 Chitinasen und 11 Proteasen erhalten werden. Schließlich wurden 21 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 12 weitere intrazelluläre Stoffwechselproteine detektiert. 20 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen konnten mithilfe des ExPASy Proteomics Servers annotiert werden.

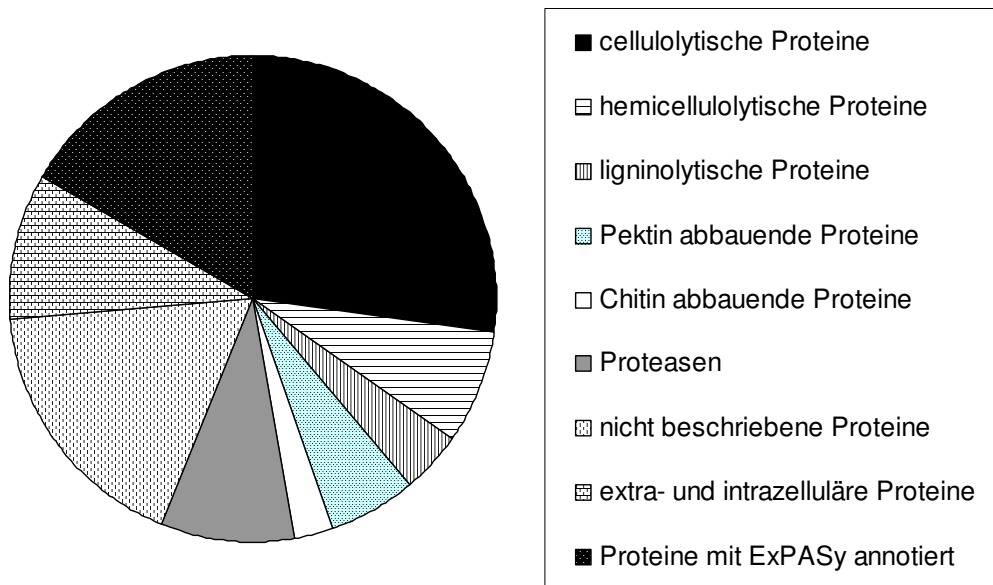


Abb. 4.28: Proteom über Fichten-Holzpuder (biologische Reproduktion, 1 Woche Anzucht)

Tab. 4.5: Extrazellulärer Proteinkomplex über Fichten-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor	50-54	59472	Swissprot	36	Penicillium citrinum	cellobiase
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	77-85	84367	Swissprot	41	Cochliobolus carbonum	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	40-46	103623	Swissprot	43	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Beta-glucosidase	30-34	86794	ExPASy	47	Aspergillus clavatus	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	30-34	85424	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Glucoamylase precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	50-54	60763	Swissprot	49	Aspergillus shirousami	cellobiase
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	50-54	47694	ExPASy	84		cellobiase
Cellobiose dehydrogenase precursor	85-105	81957	Swissprot	100		Cellobiose dehydrogenase
Glucose oxidase precursor (Glucose oxyhydrase) (GOD)	27-30	57889	Swissprot	22	Aspergillus niger	Cellulose degr.
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	59-70	42810	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Alpha-N-arabinofuranosidase A precursor (Arabinosidase A)	40-46	55288	Swissprot	29	Aspergillus niger	endoglucanase
Endoglucanase 3 precursor	59-70	49208	Swissprot	47	Humicola insolens	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	40-46	39566	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	130-160	26968	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	85-105	26345	Swissprot	41	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
putative glucanase precursor	34-40	33316	eukKEGG	43	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	50-54	34496	Swissprot	37	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	18-20	23647	Swissprot	35	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	59-70	32495	Swissprot	39	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Cellulose-growth-specific protein precursor	59-70	32098	Swissprot	64	Agaricus bisporus	endoglucanase
Cellulose-growth-specific protein precursor	77-85	28084	Swissprot	30	Agaricus bisporus	endoglucanase
putative glucanase precursor	77-85	33839	KEGG	44	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	50-54	49161	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	34-40	33566	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Exocellobiohydrolase II	70-77	24518	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	50-54	54852	Swissprot	99		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	50-54	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	50-54	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	70-77	--- (23203)	Swissprot	41	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	50-54	48387	Swissprot	65	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exoglucanase I precursor (Exocellobiohydrolase I)	27-30	89570	Swissprot	44	Aspergillus aculeatus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	50-54	53807	Swissprot	78		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	50-54	58105	Swissprot	79		exoglucanase

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	70-77	31039	Swissprot	63	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Beta-xylosidase	34-40	83794	ExPASy	58	Postia placenta	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	34-40	--- (35193)	Swissprot	68	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Cinnamoyl esterase)	30-34	35564	Swissprot	47	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	54-59	30521	Swissprot	45	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase B precursor	30-34	30405	Swissprot	62	Emericella nidulans	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	40-46	43543	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	70-77	42313	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor		37662	Swissprot	61	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	59-70	39867	Swissprot	82		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	59-70	40090	Swissprot	100		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	59-70	39961	Swissprot	90		Lignin depol.
Ligninase H2 precursor (Diarylpropane peroxidase) (Lignin peroxidase) (LG4)	70-77	39450	Swissprot	99		Lignin depol.
Oxalate decarboxylase	50-54	48270	ExPASy	62	Dichomitus squalens	(Lignin depol.) intrazellulär
Galactan 1,3-beta-galactosidase precursor	59-70	49095	ExPASy	67		Pectin degr.
Polygalacturonase precursor (Pectinase)	70-77	39807	Swissprot	41	Aspergillus parasiticus	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	27-30	113326	Swissprot	24	Aspergillus niger	Pectin degr.
Rhamnogalacturonase A precursor (RGase A); polygalacturonase	50-54	44279	Swissprot	52	Aspergillus aculeatus	Pectin degr.
Pectinesterase precursor (Pectin methylesterase)	70-77	35997	Swissprot	39	Aspergillus tubingensis	Pectin degr.
Galactose-1-epimerase	54-59	38280	ExPASy	57	Coprinopsis cinerea	Pectin degr.
Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase (Endo-1,4-beta-galactanase)	85-105	36746	Swissprot	44	Corynascus heterothallicus	Pectin degr.
N-acetylhexosaminidase	46-50	46948	ExPASy	64	Postia placenta	Chitinase
Chitinase 1 precursor	59-70	31508	Swissprot	49	Rhizopus microsporus var. oligosporus	Chitinase
Putative uncharacterized protein (Hypothetical protein that contains an Interpro domain comprising a chitinase active site)	85-105	30358	ExPASy	75	Postia placenta	Chitinase
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	77-85	45901	Swissprot	62	Irpex lacteus	protease
Putative aspartyl protease	77-85	42856	ExPASy	59	Nidula niveotomentosa	protease
Aspartic protease precursor	85-105	44784	ExPASy	34	Phaffia rhodozyma	protease
Aspartic protease precursor	85-105	44214	ExPASy	37	Phaffia rhodozyma	protease
Tripeptidyl peptidase A	70-77	59059	ExPASy	46	Coprinopsis cinerea	protease
Protease [prot1]	85-105	41801	ExPASy	48	Amanita muscaria	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	160-220	21680	Swissprot	54	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	160-220	27153	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Family S53 protease	77-85	57596	ExPASy	56		protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	160-220	26613	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
N,O-diacetyl muramidase, putative (lysozyme activity)	160-220	24457	ExPASy	63	Penicillium stipitatum	protease

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
undescribed	105-130	28790	whiterot1	100		undescribed
undescribed	77-85	78355	whiterot1	73		undescribed
undescribed		14173	whiterot1	100		undescribed
undescribed	130-160	79311	whiterot1	100		undescribed
undescribed	34-40	30169	whiterot1	100		undescribed
undescribed		17888	whiterot1	74		undescribed
undescribed	54-59	48910	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-30	66583	whiterot1	95		undescribed
undescribed	25-27	108806	whiterot1	98		undescribed
undescribed	105-130	27395	whiterot1	51		undescribed
undescribed	54-59	77676	whiterot1	97		undescribed
undescribed	85-105	---	whiterot1	100		undescribed
undescribed	54-59	75331	whiterot1	97		undescribed
Putative uncharacterized protein (Fragment)	160-220	81840	ExPASy	54	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	46-50	54587	ExPASy	53	Schizophyllum commune	-
Putative uncharacterized protein	54-59	49987	ExPASy	43	Postia placenta	-
Predicted protein	85-105	22823	ExPASy	39	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	59-70	58806	ExPASy	64	Postia placenta	-
no homologous sequence		13575	-	-	-	-
no homologous sequence	15-18	13486	-	-	-	-
no homologous sequence	59-70	23369	-	-	-	-

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
ash2-trithorax family protein; Chromatin structure and dynamics (KOG description)	50-54	73225	eukKEGG	34	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
mitochondrial protein	160-220	393563	eukKEGG	21	Candida albicans SC5314	intracellular
Cytochrome c1 precursor	77-85	90937	Swissprot	23	Paracoccus denitrificans	intracellular
Mitochondrial ribosomal protein MRPL24	34-40	---	eukKEGG	49	Saccharomyces cerevisiae	intracellular
putative cyclic nucleotide gated channel beta 1 proteolysis and peptidolysis (GO description)	34-40	131234	eukKEGG	5	Rattus norvegicus	intracellular
Fe(II) transport protein 3, chloroplast precursor (Iron-regulated transporter 3)	30-34	41319	Swissprot	34	Arabidopsis thaliana	intracellular
putative cycloisomerase 2 family protein	70-77	37061	eukKEGG	26	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Microtubule-associated protein futsch	70-77	200527	Swissprot	9	Drosophila melanogaster	intracellular
probable pseudouridylate synthase	105-130	41834	eukKEGG	39	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Condensin complex subunit 3 (p100)	59-70	---	Swissprot	28	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
citrate transport protein; Mitochondrial tricarboxylate/dicarboxylate carrier proteins (KOG Description)	59-70	32172	KEGG	50	Candida albicans SC5314	intracellular
Anucleate primary sterigmata protein B	54-59	110023	Swissprot	18	Emericella nidulans	intracellular

#### **4.4.6 Proteom über Fichten-Holzpuder, biologische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht**

Über Fichten-Holzpuder, während der biologischen Reproduktion und 3 Wochen der Anzucht (siehe Abb. 4.29 und Tab. 4.6), wurden 32 cellulolytische homologe Proteine (9 Cellobiasen, 13 Endo- und 8 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase, 1 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) gemessen. Weiterhin wurden 9 hemicellulolytische, 6 ligninolytische und 7 Pektin abbauende homologe Proteine gefunden. Außerdem wurden 4 Chitinasen und 17 Proteasen detektiert. 24 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 12 weitere intrazelluläre Stoffwechselproteine wurden ebenfalls erhalten. Schließlich konnten 23 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen mittels ExPASy Proteomics Server annotiert werden.

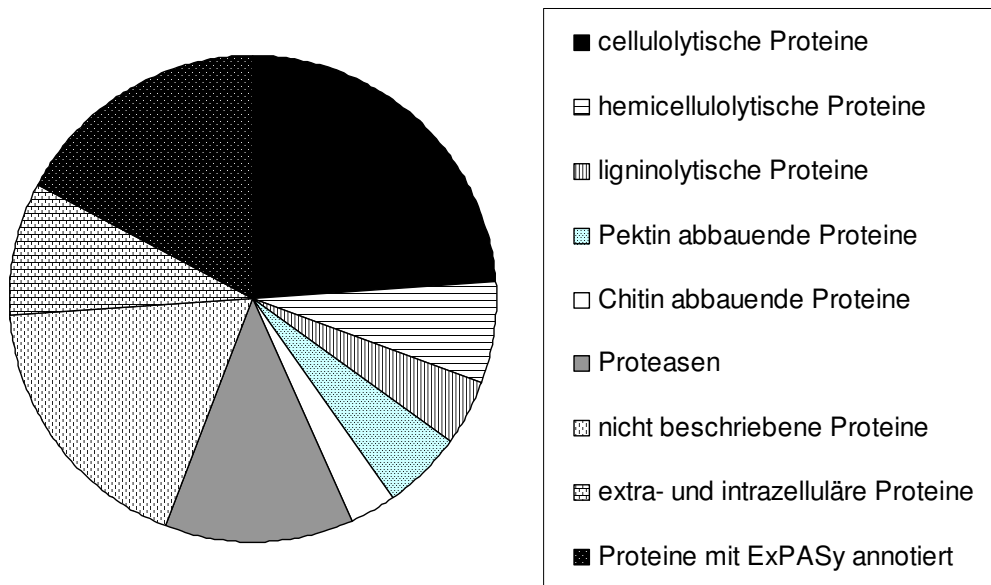


Abb. 4.29: Proteom über Fichten-Holzpuder (biologische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht)

Tab. 4.6: Extrazellulärer Proteinkomplex über Fichten-Holzpuder, 3 Wochen angezüchtet

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor	54-59	59472	Swissprot	36	Penicillium citrinum	cellobiase
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	77-85	84367	Swissprot	41	Cochliobolus carbonum	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	77-85	103623	Swissprot	43	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Beta-glucosidase	85-105	86794	ExPASy	47	Aspergillus clavatus	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	85-105	85424	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Beta-mannosidase precursor	130-160	100623	Swissprot	36	Aspergillus niger	cellobiase
Glucoamylase precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	54-59	60763	Swissprot	49	Aspergillus shirousami	cellobiase
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	46-50	47694	ExPASy	84		cellobiase
Acid trehalase	105-130	72696	ExPASy	63	Laccaria bicolor	cellobiase
Cellobiose dehydrogenase precursor	85-105	81957	Swissprot	100		Cellobiose dehydrogenase
Glycolipid anchored surface protein 1 precursor (Glycoprotein GP115)	70-77	58041	Swissprot	36	Saccharomyces cerevisiae	Cellulose degr.
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	34-40	42810	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Alpha-N-arabinofuranosidase A precursor (Arabinosidase A)	70-77	55288	Swissprot	29	Aspergillus niger	endoglucanase
Endoglucanase 3 precursor	40-46	49208	Swissprot	47	Humicola insolens	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	34-40	39566	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25-27	26968	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	27-30	26345	Swissprot	41	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
putative glucanase precursor	30-34	33316	eukKEGG	43	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	40-46	34496	Swissprot	37	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	20-25	23647	Swissprot	35	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Cellulose-growth-specific protein precursor	34-40	32098	Swissprot	64	Agaricus bisporus	endoglucanase
putative glucanase precursor	30-34	33839	KEGG	44	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	46-50	49161	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	34-40	33566	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Exocellobiohydrolase II	27-30	24518	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	54852	Swissprot	99		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	27-30	---	Swissprot	41	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	50-54	48387	Swissprot	65	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	53807	Swissprot	78		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	54-59	58105	Swissprot	79		exoglucanase
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	34-40	31039	Swissprot	63	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Beta-xylosidase	85-105	83794	ExPASy	58	Postia placenta	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	46-50	---	Swissprot	68	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Cinnamoyl esterase)	34-40	35564	Swissprot	47	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	34-40	30521	Swissprot	45	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase B precursor	30-34	30405	Swissprot	62	Emericella nidulans	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	40-46	43543	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	34-40	42313	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	40-46	37662	Swissprot	61	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	46-50	39867	Swissprot	82		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	40-46	40090	Swissprot	100		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	40-46	39961	Swissprot	90		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	46-50	39504	Swissprot	100		Lignin depol.
Glyoxal oxidase precursor	59-70	59130	ExPASy	95		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	46-50	39532	Swissprot	100		Lignin depol.
Galactan 1,3-beta-galactosidase precursor	46-50	49095	ExPASy	67		Pectin degr.
Polygalacturonase precursor (Pectinase)	40-46	39807	Swissprot	41	Aspergillus parasiticus	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	105-130	113326	Swissprot	24	Aspergillus niger	Pectin degr.
Rhamnogalacturonase A precursor (RGase A); polygalacturonase	46-50	44279	Swissprot	52	Aspergillus aculeatus	Pectin degr.
Pectinesterase precursor (Pectin methylesterase)	40-46	35997	Swissprot	39	Aspergillus tubingensis	Pectin degr.
Galactose-1-epimerase	46-50	38280	ExPASy	57	Coprinopsis cinerea	Pectin degr.
Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase (Endo-1,4-beta-galactanase)	30-34	36746	Swissprot	44	Corynascus heterothallicus	Pectin degr.
N-acetylhexosaminidase	59-70	46948	ExPASy	64	Postia placenta	Chitinase
Chitinase 1 precursor	34-40	31508	Swissprot	49	Rhizopus microsporus var. oligosporus	Chitinase
Chitinase 1 precursor	50-54	54884	Swissprot	48	Aphanocladium album	Chitinase
Putative uncharacterized protein (Hypothetical protein that contains an Interpro domain comprising a chitinase active site)	27-30	30358	ExPASy	75	Postia placenta	Chitinase
stress response protein rds1p						
Peptidase M, neutral zinc metallopeptidases, zinc-binding site	46-50	34483	eukKEGG	30	Schizosaccharomyces pombe	protease
Carboxypeptidase S1	50-54	51640	Swissprot	44	Penicillium janthinellum	protease
Protease [prot1]	30-34	44867	ExPASy	52	Amanita muscaria	protease
Putative aspartyl protease	34-40	42856	ExPASy	59	Nidula niveotomentosa	protease
Aspartic protease precursor	30-34	44214	ExPASy	37	Phaffia rhodozyma	protease
Tripeptidyl peptidase A	46-50	59059	ExPASy	46	Coprinopsis cinerea	protease
Protease [prot1]	30-34	41801	ExPASy	48	Amanita muscaria	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	20-25	21680	Swissprot	54	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	15-18	26781	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	20-25	27153	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2;						
Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin (GO Description)	50-54	64076	KEGG	28	Dictyostelium discoideum	protease
Family S53 protease	40-46	57596	ExPASy	56		protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25-27	26613	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Family S53 protease	40-46	59003	ExPASy	93		protease
Subtilisin-like protease (Fragment)	85-105	93327	ExPASy	92		protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	34-40	41939	Swissprot	76	Irpex lacteus	protease
N,O-diacetyl muramidase, putative (lysozyme activity)	20-25	24457	ExPASy	63	Penicillium stipitatum	protease



Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
undescribed	70-77	49702	whiterot1	100		undescribed
undescribed	30-34	32837	whiterot1	50		undescribed
undescribed	15-18	14173	whiterot1	100		undescribed
undescribed	25-27	79311	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-30	30169	whiterot1	100		undescribed
undescribed	15-18	---	whiterot1	74		undescribed
undescribed	50-54	48910	whiterot1	100		undescribed
undescribed	18-20	30148	whiterot1	80		undescribed
undescribed	15-18	---	whiterot1	95		undescribed
undescribed	15-18	53294	whiterot1	26		undescribed
undescribed	12-15	67470	whiterot1	84		undescribed
undescribed	130-160	108806	whiterot1	98		undescribed
undescribed	27-30	27395	whiterot1	51		undescribed
undescribed	77-85	77676	whiterot1	97		undescribed
undescribed	59-70	53831	whiterot1	94		undescribed
undescribed	70-77	75331	whiterot1	97		undescribed
Putative uncharacterized protein	59-70	54587	ExPASy	53	Schizophyllum commune	-
Putative uncharacterized protein	50-54	49987	ExPASy	43	Postia placenta	-
Predicted protein	27-30	22823	ExPASy	39	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	50-54	58806	ExPASy	64	Postia placenta	-
Predicted protein	27-30	41672	ExPASy	27	Postia placenta	-
no homologous sequence	15-18	30790	-	-	-	-
no homologous sequence	27-30	13486	-	-	-	-
no homologous sequence	85-105	78144	-	-	-	-

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
FRE3; ferric reductase	30-34	43574	eukKEGG	30	Candida albicans SC5314	intracellular
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10, putative		41526	eukKEGG	48	Plasmodium falciparum 3D7	intracellular
Mitochondrial ribosomal protein MRPL24	85-105	---	eukKEGG	49	Saccharomyces cerevisiae	intracellular
Interferon-Induced GTP-Binding Protein MX; KOG0446 - Vacuolar sorting protein VPS1, dynamin, and related proteins	12-15	107030	Swissprot	18	Oncorhynchus mykiss	intracellular
Side tail fiber protein homolog from lambdoid prophage Rac; KOG4297 - C-type lectin, Signal transduction mechanisms	15-18	24463	Swissprot	21	Escherichia coli	intracellular
putative cycloisomerase 2 family protein	40-46	37061	eukKEGG	26	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
E1A binding protein p400 (p400 kDa SWI2/SNF2-related protein) histone acetylation	18-20	34702	Swissprot	22	Mus musculus	intracellular
Sulfated surface glycoprotein 185 precursor (SSG 185)		25483	Swissprot	38	Volvox carteri	intracellular
Bli-3 protein (flavin mononucleotide binding)	40-46	27562	Swissprot	40	Neurospora crassa	intracellular
cta1; catalase	18-20	61627	KEGG	50	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
citrate transport protein; Mitochondrial tricarboxylate/dicarboxylate carrier proteins (KOG Description)	85-105	32172	KEGG	50	Candida albicans SC5314	intracellular
kinesin family member 1B (Kif1b)	27-30	178203	KEGG	29	Rattus norvegicus	intracellular

#### **4.4.7 Proteom über Rotbuchen-Holzpuder, technische Reproduktion, 1 Woche Anzucht**

Über Rotbuchen-Holzpuder, während der technischen Reproduktion und 1 Woche der Anzucht (siehe Abb. 4.30 und Tab. 4.7), wurden 43 cellulolytische homologe Proteine (16 Cellobiasen, 15 Endo- und 9 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase, 2 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) detektiert. Außerdem wurden 11 hemicellulolytische, 10 ligninolytische und 7 Pektin abbauende homologe Proteine gemessen. Weiterhin konnten 5 Chitinasen und 17 Proteasen erhalten werden. Schließlich wurden 48 nicht beschriebene Proteine (davon 8 ohne homologe Sequenzen) und 21 weitere extra- und auch intrazelluläre Stoffwechselproteine detektiert. 40 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen konnten mithilfe des ExPASy Proteomics Servers annotiert werden.

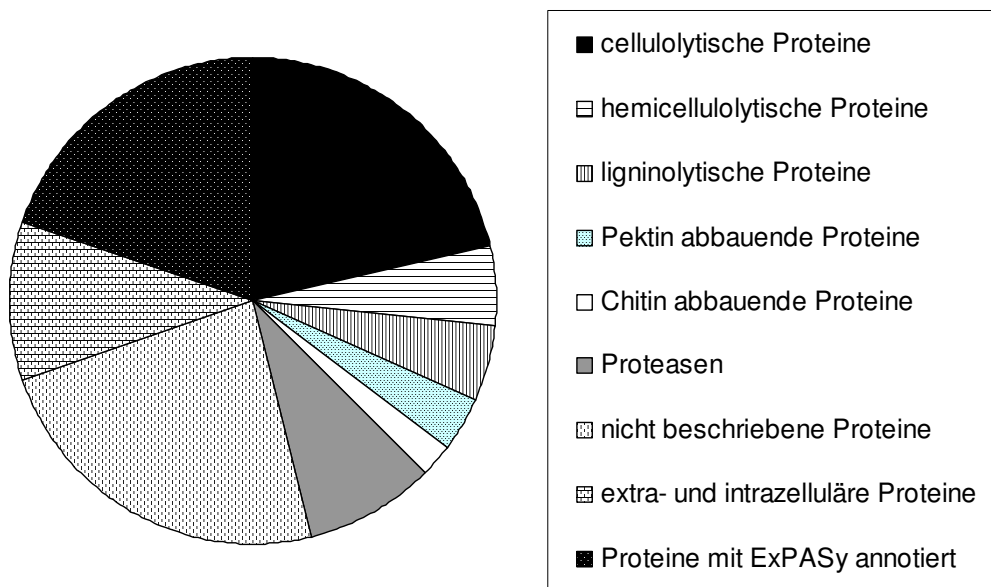


Abb. 4.30: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (technische Reproduktion, 1 Woche Anzucht)

Tab. 4.7: Extrazellulärer Proteinkomplex über Rotbuchen-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Alpha-glucosidase	98-118	101889	ExPASy	67	Postia placenta	cellobiase
putative alpha-1,2-mannosidase	98-118	67573	eukKEGG	23	Candida albicans SC5314	cellobiase
Alpha-N-arabinofuranosidase A precursor (Arabinosidase A)	65-75	55288	Swissprot	29	Aspergillus niger	cellobiase
Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor	57-65	59472	Swissprot	36	Penicillium citrinum	cellobiase
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	51-57	40767	ExPASy	86		cellobiase
MUC1; Required for invasion and pseudohyphae formation in response to nitrogen starvation [GO/EC-classification: glucan 1,4-alpha-glucosidase]	25-27	75403	eukKEGG	23	Saccharomyces cerevisiae	cellobiase
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	75-83	84367	Swissprot	41	Cochliobolus carbonum	cellobiase
putative alpha-1,2-mannosidase	98-118	80636	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	75-83	103623	Swissprot	43	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Beta-glucosidase	83-98	86794	ExPASy	47	Aspergillus clavatus	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	98-118	85424	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Beta-mannosidase precursor	118-145	100623	Swissprot	36	Aspergillus niger	cellobiase
Glucoamylase precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	57-65	60763	Swissprot	49	Aspergillus shirousami	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	145-190	87957	Swissprot	45	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	51-57	47694	ExPASy	84		cellobiase
Acid trehalase	98-118	72696	ExPASy	63	Laccaria bicolor	cellobiase
Cellobiose dehydrogenase precursor	83-98	81957	Swissprot	100		Cellobiose dehydrogenase
Glucose oxidase precursor (Glucose oxyhydrase) (GOD)	75-83	66554	Swissprot	30	Talaromyces flavus	Cellulose degr.
putative 1,3-beta-glucan synthase component	8-12	190915	KEGG	56	Schizosaccharomyces pombe	Cellulose degradation
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	41-48	42810	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase 3 precursor	48-51	49208	Swissprot	47	Humicola insolens	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	35-41	39566	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25-27	26968	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	27-29	26345	Swissprot	41	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	41-48	34374	Swissprot	33	Hypocrea jecorina	endoglucanase
putative glucanase precursor	29-35	33316	eukKEGG	43	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	35-41	34496	Swissprot	37	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	19-25	23647	Swissprot	35	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	29-35	32739	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	35-41	32495	Swissprot	39	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Cellulose-growth-specific protein precursor	29-35	32098	Swissprot	64	Agaricus bisporus	endoglucanase
putative glucanase precursor	29-35	33839	KEGG	44	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	48-51	49161	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	29-35	33566	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Exocellobiohydrolase II	29-35	24518	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	54852	Swissprot	99		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	29-35	23203	Swissprot	41	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	48-51	48387	Swissprot	65	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exoglucanase I precursor (Exocellobiohydrolase I)	98-118	89570	Swissprot	44	Aspergillus aculeatus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	53807	Swissprot	78		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	58105	Swissprot	79		exoglucanase

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	29-35	31039	Swissprot	63	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Beta-1,4-endoxylanase	48-51	37715	ExPASy	45	Thermobifida alba	Hemicellulose degr.
Beta-xylosidase	83-98	83794	ExPASy	58	Postia placenta	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	35-41	35193	Swissprot	68	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Cinnamoyl esterase)	35-41	35564	Swissprot	47	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	29-35	30521	Swissprot	45	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase B precursor	29-35	30405	Swissprot	62	Emericella nidulans	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	41-48	43543	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	41-48	42313	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	35-41	37662	Swissprot	61	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Candidate carboxylesterase from carbohydrate esterase family CE10	75-83	55971	ExPASy	61	Postia placenta	hydrolase
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	41-48	39867	Swissprot	82		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	35-41	40090	Swissprot	100		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	35-41	39961	Swissprot	90		Lignin depol.
Ligninase H2 precursor (Diarylpropane peroxidase) (Lignin peroxidase) (LG4)	41-48	39450	Swissprot	99		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	41-48	39504	Swissprot	100		Lignin depol.
Glyoxal oxidase precursor	57-65	59130	ExPASy	95		Lignin depol.
Copper radical oxidase variant A	83-98	80824	ExPASy	89		Lignin depol.
Aryl-alcohol oxidase (lignin degradation, production of hydrogen peroxide as glyoxal oxidase by Pleurotus eryngii)	75-83	63453	ExPASy	46	Pleurotus eryngii	Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	35-41	39532	Swissprot	100		Lignin depol.
Oxalate decarboxylase	48-51	48270	ExPASy	62	Dichomitus squalens	(Lignin depol.) intrazellulär
Galactan 1,3-beta-galactosidase precursor	48-51	49095	ExPASy	67		Pectin degr.
Polygalacturonase precursor (Pectinase)	41-48	39807	Swissprot	41	Aspergillus parasiticus	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	118-145	113326	Swissprot	24	Aspergillus niger	Pectin degr.
Rhamnogalacturonase A precursor (RGase A); polygalacturonase	41-48	44279	Swissprot	52	Aspergillus aculeatus	Pectin degr.
Pectinesterase precursor (Pectin methylesterase)	41-48	35997	Swissprot	39	Aspergillus tubingensis	Pectin degr.
Galactose-1-epimerase	35-41	38280	ExPASy	57	Coprinopsis cinerea	Pectin degr.
Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase (Endo-1,4-beta-galactanase)	35-41	36746	Swissprot	44	Corynascus heterothallicus	Pectin degr.

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
N-acetylhexosaminidase	65-75	46948	ExPASy	64	Postia placenta	Chitinase
Chitinase A1 precursor	65-75	42777	Swissprot	24	Bacillus circulans	Chitinase
Chitinase 1 precursor	29-35	31508	Swissprot	49	Rhizopus microsporus var. oligosporus	Chitinase
Chitinase 1 precursor	41-48	54884	Swissprot	48	Aphanocladium album	Chitinase
Putative uncharacterized protein (Hypothetical protein that contains an Interpro domain comprising a chitinase active site)	29-35	30358	ExPASy	75	Postia placenta	Chitinase
putative amidase	65-75	55215	eukKEGG	36	Schizosaccharomyces pombe	hydrolase/protease
Pc20g15160 protein precursor / strong similarity to hypothetical amidase Z37509	16-19	68805	ExPASy	43	Penicillium chrysogenum	hydrolase/protease
Carboxypeptidase cpdS precursor	65-75	57748	Swissprot	40	Aspergillus saitoi	protease
Putative aspartyl protease	35-41	42856	ExPASy	59	Nidula niveotomentosa	protease
Putative aspartyl protease	51-57	41008	ExPASy	53	Nidula niveotomentosa	protease
Aspartic protease precursor	35-41	44784	ExPASy	34	Phaffia rhodozyma	protease
Aspartic protease precursor	35-41	44214	ExPASy	37	Phaffia rhodozyma	protease
Tripeptidyl peptidase A	48-51	59059	ExPASy	46	Coprinopsis cinerea	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25-27	21680	Swissprot	54	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	27-29	26781	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25-27	27153	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2; Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin (GO Description)	51-57	64076	KEGG	28	Dictyostelium discoideum	protease
Family S53 protease	41-48	57596	ExPASy	56		protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	19-25	26613	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Subtilisin-like protease precursor	83-98	87528	ExPASy	54	Pleurotus ostreatus	protease
Subtilisin-like protease (Fragment)	83-98	93327	ExPASy	92		protease
N,O-diacetyl muramidase, putative (lysozyme activity)	25-27	24457	ExPASy	63	Penicillium stipitatum	protease

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
undescribed		24433	whiterot1	89		undescribed
undescribed	65-75	49702	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-29	28790	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-29	30440	whiterot1	46		undescribed
undescribed	25-27	15233	whiterot1	99		undescribed
undescribed	48-51	78355	whiterot1	73		undescribed
undescribed	16-19	14173	whiterot1	100		undescribed
undescribed	75-83	79311	whiterot1	100		undescribed
undescribed	29-35	30169	whiterot1	100		undescribed
undescribed	16-19	17888	whiterot1	74		undescribed
undescribed	51-57	48910	whiterot1	100		undescribed
undescribed	145-190	---	whiterot1	80		undescribed
undescribed	65-75	59629	whiterot1	100		undescribed
undescribed	51-57	44266	eukKEGG	34	Candida albicans SC5314	undescribed
undescribed	98-118	83821	whiterot1	74		undescribed
undescribed	65-75	32799	whiterot1	42		undescribed
undescribed	65-75	32592	whiterot1	40		undescribed
undescribed	57-65	12580	whiterot1	100		undescribed
undescribed	51-57	41236	whiterot1	100		undescribed
undescribed	98-118	66583	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	undescribed
undescribed	35-41	9140	whiterot1	100		undescribed
undescribed	83-98	66159	whiterot1	92		undescribed
undescribed	75-83	52136	whiterot1	100		undescribed
undescribed	118-145	108806	whiterot1	98		undescribed
undescribed	29-35	27395	whiterot1	51		undescribed
undescribed	48-51	119641	whiterot1	18		undescribed
undescribed	75-83	77676	whiterot1	97		undescribed
undescribed	75-83	64816	whiterot1	99		undescribed
undescribed	29-35	---	whiterot1	100		undescribed
undescribed	65-75	53831	whiterot1	94		undescribed
undescribed	75-83	75331	whiterot1	97		undescribed
Predicted protein	51-57	42242	ExPASy	51	Laccaria bicolor	-
Predicted protein	65-75	55135	ExPASy	70	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	57-65	54587	ExPASy	53	Schizophyllum commune	-
Predicted protein	12-16	48684	ExPASy	50	Laccaria bicolor	-
Putative uncharacterized protein	51-57	49987	ExPASy	43	Postia placenta	-
Predicted protein	27-29	22823	ExPASy	39	Postia placenta	-
Predicted protein	75-83	---	ExPASy	36	Laccaria bicolor	-
Putative uncharacterized protein	48-51	58806	ExPASy	64	Postia placenta	-
Predicted protein		53792	ExPASy	26	Postia placenta	-
no homologous sequence	16-19	30790	-	-	-	-
no homologous sequence	118-145	78144	-	-	-	-
no homologous sequence	16-19	20038	-	-	-	-
no homologous sequence	16-19	18428	-	-	-	-
no homologous sequence	41-48	40239	-	-	-	-
no homologous sequence	27-29	24859	-	-	-	-
no homologous sequence	83-98	13486	-	-	-	-
no homologous sequence	83-98	65049	-	-	-	-

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
hypothetical serine-rich protein Carbohydrate transport and metabolism (KOG description)	27-29	19669	eukKEGG	36	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
hypothetical serine-rich protein Carbohydrate transport and metabolism (KOG description)	27-29	19669	eukKEGG	36	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Ubiquitin	8-12	18108	ExPASy	83	Coprinopsis cinerea	intracellular
Fruiting body protein SC3 precursor (Hydrophobin SC3)	12-16	10871	Swissprot	52	Schizophyllum commune	intracellular
Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family	41-48	38990	eukKEGG	31	Candida albicans SC5314	intracellular
Gas(Growth arrest-specific)1-like protein [Gks1]	16-19	24463	ExPASy	28	Dactylellina haptotyla	intracellular
putative cycloisomerase 2 family protein	41-48	37061	eukKEGG	26	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Lipase 2 precursor (Lipase II) (GCL II)	57-65	54031	Swissprot	26	Galactomyces geotrichum	intracellular
D-lactonohydrolase-like protein	51-57	45650	ExPASy	58	Poria monticola	hydrolase/protease
Ribosome maturation protein sdo1	75-83	27844	Swissprot	54	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
ubi4-ubiquitin family protein	8-12	42734	eukKEGG	99	Eremothecium gossypii	intracellular
large subunit ribosomal protein L40e	8-12	14500	eukKEGG	95	Eremothecium gossypii	intracellular
Midasin; regulation of transcription, DNA-dependent	27-29	535975	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	intracellular
Ubiquitin	8-12	43095	ExPASy	100		intracellular
HSL1; negative regulator of swe1 kinase	118-145	29845	eukKEGG	61	Candida albicans SC5314	intracellular
Lipase 4 precursor	57-65	50210	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
Lipase 4 precursor	57-65	51401	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
Enoyl-CoA hydratase	29-35	31514	ExPASy	65	Laccaria bicolor	intracellular
cta1; catalase	65-75	61627	KEGG	50	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
riboflavin aldehyde-forming enzyme (raf); formation of mycelial aggregates	12-16	9100	KEGG	32	Candida albicans SC5314	intracellular
putative 5' nucleotidase family protein; hydrolase activity	57-65	69168	KEGG	35	Schizosaccharomyces pombe	intracellular



#### **4.4.8 Proteom über Rotbuchen-Holzpuder, technische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht**

Über Rotbuchen-Holzpuder, während der technischen Reproduktion und 3 Wochen der Anzucht (siehe Abb. 4.31 und Tab. 4.8), wurden 38 cellulolytische homologe Proteine (13 Cellobiasen, 13 Endo- und 9 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase, 2 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) gemessen. Weiterhin wurden 9 hemicellulolytische, 9 ligninolytische und 10 Pektin abbauende homologe Proteine gefunden. Außerdem wurden 6 Chitinasen und 23 Proteasen detektiert. 31 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 19 weitere extra- und auch intrazelluläre Stoffwechselproteine wurden ebenfalls erhalten. Schließlich konnten 36 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen mittels ExPASy Proteomics Server annotiert werden.

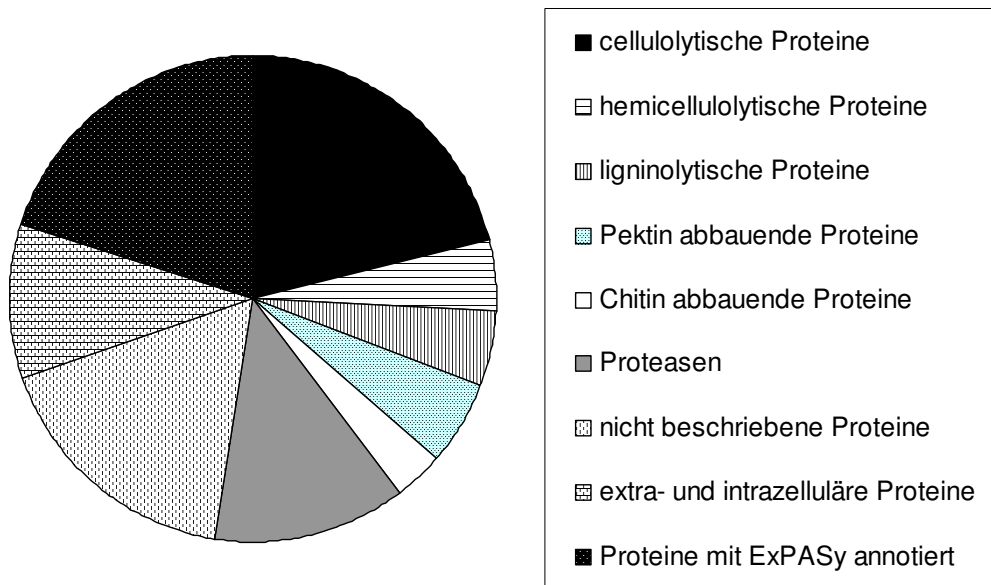


Abb. 4.31: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (technische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht)

Tab. 4.8: Extrazellulärer Proteinkomplex über Rotbuchen-Holzpuder, 3 Wochen angezüchtet

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Alpha-glucosidase	98-118	101889	ExpASy	67	Postia placenta	cellobiase
Alpha-N-arabinofuranosidase A precursor (Arabinosidase A)	65-75	55288	Swissprot	29	Aspergillus niger	cellobiase
Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor	57-65	59472	Swissprot	36	Penicillium citrinum	cellobiase
Man5C (mannan endo-1,4-β-mannosidase)	41-48	40767	ExpASy	86		cellobiase
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	83-98	84367	Swissprot	41	Cochliobolus carbonum	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	65-75	96964	Swissprot	42	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	98-118	103623	Swissprot	43	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Beta-glucosidase	83-98	86794	ExpASy	47	Aspergillus clavatus	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	83-98	85424	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Beta-mannosidase precursor	118-145	100623	Swissprot	36	Aspergillus niger	cellobiase
Glucosylase precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	57-65	60763	Swissprot	49	Aspergillus shirousami	cellobiase
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	48-51	47694	ExpASy	84		cellobiase
Acid trehalase	75-83	72696	ExpASy	63	Laccaria bicolor	cellobiase
Cellobiose dehydrogenase precursor	83-98	81957	Swissprot	100		Cellobiose dehydrogenase
Glycolipid anchored surface protein 1 precursor (Glycoprotein GP115) 1,3-beta-glucanosyltransferase GAS1	57-65	58041	Swissprot	36	Saccharomyces cerevisiae	Cellulose degr.
candidate a-L-/b-D-glycosidase (Glycoside hydrolase family 43 protein)	27-29	33758	ExpASy	61	Schizophyllum commune	Cellulose degr.
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	35-41	42810	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase 3 precursor	48-51	49208	Swissprot	47	Humicola insolens	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	35-41	39566	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25-27	26968	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25-27	26345	Swissprot	41	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
putative glucanase precursor	29-35	33316	eukKEGG	43	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	35-41	34496	Swissprot	37	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	19-25	23647	Swissprot	35	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	27-29	32495	Swissprot	39	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Cellulose-growth-specific protein precursor	29-35	32098	Swissprot	64	Agaricus bisporus	endoglucanase
putative glucanase precursor	29-35	33839	KEGG	44	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	48-51	49161	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	29-35	33566	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Exocellobiohydrolase II	29-35	24518	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	54852	Swissprot	99		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	29-35	---	Swissprot	41	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	48-51	48387	Swissprot	65	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exoglucanase I precursor (Exocellobiohydrolase I)	98-118	89570	Swissprot	44	Aspergillus aculeatus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	35-41	53807	Swissprot	78		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	58105	Swissprot	79		exoglucanase
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	29-35	31039	Swissprot	63	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Beta-xylosidase	75-83	83794	ExpASy	58	Postia placenta	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	29-35	35193	Swissprot	68	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Cinnamoyl esterase)	35-41	35564	Swissprot	47	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	35-41	30521	Swissprot	45	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase B precursor	29-35	30405	Swissprot	62	Emericella nidulans	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	41-48	43543	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	41-48	42313	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	35-41	37662	Swissprot	61	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	41-48	39867	Swissprot	82		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	35-41	40090	Swissprot	100		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	35-41	39961	Swissprot	90		Lignin depol.
Ligninase H2 precursor (Diarylpropane peroxidase) (Lignin peroxidase) (LG4)	35-41	39450	Swissprot	99		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	41-48	39504	Swissprot	100		Lignin depol.
Glyoxal oxidase precursor	57-65	59130	ExPASy	95		Lignin depol.
Copper radical oxidase variant A	75-83	80824	ExPASy	89		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	41-48	39532	Swissprot	100		Lignin depol.
Oxalate decarboxylase		48270	ExPASy	62	Dichomitus squalens	(Lignin depol.) intrazellulär
Galactan 1,3-beta-galactosidase precursor	41-48	49095	ExPASy	67		Pectin degr.
Polygalacturonase precursor (Pectinase)	35-41	39807	Swissprot	41	Aspergillus parasiticus	Pectin degr.
Exopolygalacturonase precursor (ExoPG) (Galacturan 1,4-alpha-galacturonidase)	65-75	32195	Swissprot	47	Aspergillus tubingensis	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	98-118	113326	Swissprot	24	Aspergillus niger	Pectin degr.
Rhamnogalacturonase A precursor (RGase A); polygalacturonase	41-48	44279	Swissprot	52	Aspergillus aculeatus	Pectin degr.
Alpha-galactosidase precursor (Melibiase) (Alpha-D-galactoside galactohydrolase)	51-57	47676	Swissprot	47	Zygosaccharomyces cidri	Pectin degr.
Pectinesterase precursor (Pectin methylesterase)	35-41	35997	Swissprot	39	Aspergillus tubingensis	Pectin degr.
Alpha-galactosidase precursor	57-65	41881	ExPASy	49	Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)	Pectin degr.
Galactose-1-epimerase	41-48	38280	ExPASy	57	Coprinopsis cinerea	Pectin degr.
Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase (Endo-1,4-beta-galactanase)	29-35	36746	Swissprot	44	Corynascus heterothallicus	Pectin degr.

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Chitinase 2 precursor	41-48	48872	Swissprot	49	Rhizopus microsporus var. oligosporus	Chitinase
Chitinase 2 precursor	41-48	49199	Swissprot	42	Rhizopus microsporus var. oligosporus	Chitinase
N-acetylhexosaminidase	51-57	46948	ExPASy	64	Postia placenta	Chitinase
Chitinase 1 precursor	29-35	31508	Swissprot	49	Rhizopus microsporus var. oligosporus	Chitinase
Chitinase 1 precursor	51-57	54884	Swissprot	48	Aphanocladium album	Chitinase
Putative uncharacterized protein (Hypothetical protein that contains an Interpro domain comprising a chitinase active site)	29-35	30358	ExPASy	75	Postia placenta	Chitinase
Carboxypeptidase cpdS precursor	57-65	57748	Swissprot	40	Aspergillus saitoi	protease
Carboxypeptidase S1	48-51	51640	Swissprot	44	Penicillium janthinellum	protease
Protease [prot1]	29-35	44867	ExPASy	52	Amanita muscaria	protease
Putative aspartyl protease	29-35	42856	ExPASy	59	Nidula niveotomentosa	protease
Aspartic protease precursor	29-35	44784	ExPASy	34	Phaffia rhodozyma	protease
Aspartic protease precursor	29-35	44214	ExPASy	37	Phaffia rhodozyma	protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	35-41	35380	Swissprot	65	Irpex lacteus	protease
Tripeptidyl peptidase A	51-57	59059	ExPASy	46	Coprinopsis cinerea	protease
Endothiapepsin precursor (Aspartate protease)	35-41	33354	Swissprot	48	Cryphonectria parasitica	protease
Protease [prot1]	29-35	41801	ExPASy	48	Amanita muscaria	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	19-25	21680	Swissprot	54	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	29-35	26781	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25-27	27153	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	35-41	39555	Swissprot	64	Irpex lacteus	protease
ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2; Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin (GO Description)	48-51	64076	KEGG	28	Dictyostelium discoideum	protease
Family S53 protease	35-41	57596	ExPASy	56		protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25-27	26613	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Family S53 protease	57-65	59003	ExPASy	93		protease
Family S53 protease	35-41	---	ExPASy	63		protease
Subtilisin-like protease (Fragment)	83-98	93327	ExPASy	92		protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	29-35	41939	Swissprot	76	Irpex lacteus	protease
N,O-diacetyl muramidase, putative (lysozyme activity)	19-25	24457	ExPASy	63	Penicillium stipitatum	protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	29-35	41208	Swissprot	64	Irpex lacteus	protease

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
undescribed	65-75	49702	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-29	32837	whiterot1	50		undescribed
undescribed	27-29	28790	whiterot1	100		undescribed
undescribed	25-27	15233	whiterot1	99		undescribed
undescribed	35-41	78355	whiterot1	73		undescribed
undescribed	16-19	14173	whiterot1	100		undescribed
undescribed	83-98	79311	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-29	30169	whiterot1	100		undescribed
undescribed	16-19	17888	whiterot1	74		undescribed
undescribed		54835	whiterot1	100		undescribed
undescribed	48-51	48910	whiterot1	100		undescribed
undescribed	83-98	83821	whiterot1	74		undescribed
undescribed	57-65	32799	whiterot1	42		undescribed
undescribed	57-65	32592	whiterot1	40		undescribed
undescribed	75-83	66583	whiterot1	95		undescribed
undescribed	35-41	9140	whiterot1	100		undescribed
undescribed	118-145	108806	whiterot1	98		undescribed
undescribed	27-29	27395	whiterot1	51		undescribed
undescribed	75-83	77676	whiterot1	97		undescribed
undescribed	27-29	---	whiterot1	100		undescribed
undescribed	51-57	53831	whiterot1	94		undescribed
undescribed	65-75	75331	whiterot1	97		undescribed
Putative uncharacterized protein	51-57	54587	ExPASy	53	Schizophyllum commune	-
p60 domain-containing protein	19-25	48684	ExPASy	47	Schizosaccharomyces japonicus	-
Putative uncharacterized protein	48-51	49987	ExPASy	43	Postia placenta	-
Predicted protein	27-29	22823	ExPASy	39	Postia placenta	-
Predicted protein	65-75	---	ExPASy	36	Laccaria bicolor	-
Putative uncharacterized protein	48-51	58806	ExPASy	64	Postia placenta	-
no homologous sequence	57-65	47275	-	-	-	-
no homologous sequence	25-27	13486	-	-	-	-
no homologous sequence	98-118	78144	-	-	-	-

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
hypothetical serine-rich protein Carbohydrate transport and metabolism (KOG description)	19-25	19669	eukKEGG	36	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
hypothetical serine-rich protein Carbohydrate transport and metabolism (KOG description)	19-25	19669	eukKEGG	36	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Receptor-activated Ca <sup>2+</sup> -permeable cation channel	16-19	61522	ExPASy	53	Laccaria bicolor	intracellular
Mitochondrial ribosomal protein MRPL24	83-98	---	eukKEGG	49	Saccharomyces cerevisiae	intracellular
Spore coat protein SP96	41-48	42242	eukKEGG	26	Dictyostelium discoideum	intracellular
Gas(Growth arrest-specific)1-like protein [Gks1]	16-19	24463	ExPASy	28	Dactylellina haptotyla	intracellular
putative cycloisomerase 2 family protein	41-48	37061	eukKEGG	26	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Lipase 2 precursor (Lipase II) (GCL II)	57-65	54031	Swissprot	26	Galactomyces geotrichum	intracellular
zinc finger protein	51-57	75778	eukKEGG	24	Schizosaccharomyces pombe	(general)
Midasin; regulation of transcription, DNA-dependent	145-190	535975	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	intracellular
conserved hypothetical membrane protein	57-65	27531	eukKEGG	46	Candida albicans SC5314	intracellular
Enoyl-CoA hydratase	75-83	31514	ExPASy	65	Laccaria bicolor	intracellular
Ribonuclease Le2 (RNase Le2)	27-29	41397	Swissprot	64	Lentinula edodes	intracellular
cta1; catalase	57-65	61627	KEGG	50	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
riboflavin aldehyde-forming enzyme (raf); formation of mycelial aggregates	12-16	12484	KEGG	51	Candida albicans SC5314	intracellular
riboflavin aldehyde-forming enzyme (raf); formation of mycelial aggregates	8-12	9100	KEGG	32	Candida albicans SC5314	intracellular
VPS15 protein kinase	16-19	170322	ExPASy	51	Coprinopsis cinerea	intracellular
DAG7; riboflavin aldehyde-forming enzyme (raf); formation of mycelial aggregates; response to drug	12-16	12090	KEGG	55	Candida albicans SC5314	intracellular
glutathione s-conjugate transporter	19-25	164224	KEGG	44	Candida albicans SC5314	intracellular

#### **4.4.9 Proteom über Fichten-Holzpuder, technische Reproduktion, 1 Woche Anzucht**

Über Fichten-Holzpuder, während der technischen Reproduktion und 1 Woche der Anzucht (siehe Abb. 4.32 und Tab. 4.9), wurden 36 cellulolytische homologe Proteine (10 Cellobiasen, 14 Endo- und 11 Exoglucanasen, 1 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) detektiert. Außerdem wurden 10 hemicellulolytische, 11 ligninolytische und 8 Pektin abbauende homologe Proteine gemessen. Weiterhin konnten 5 Chitinasen und 11 Proteasen erhalten werden. Schließlich wurden 27 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 12 weitere intrazelluläre Stoffwechselproteine detektiert. 32 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen konnten mithilfe des ExPASy Proteomics Servers annotiert werden.

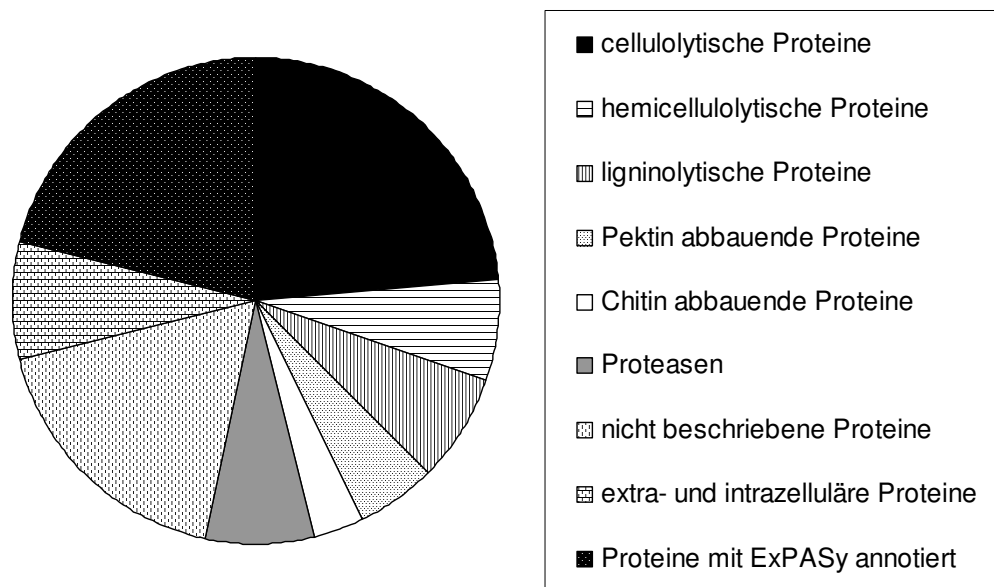


Abb. 4.32: Proteom über Fichten-Holzpuder (technische Reproduktion, 1 Woche Anzucht)

Tab. 4.9: Extrazellulärer Proteinkomplex über Fichten-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Alpha-glucosidase	75-83	101889	ExpASy	67	Postia placenta	cellobiase
Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor	57-65	59472	Swissprot	36	Penicillium citrinum	cellobiase
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	83-98	84367	Swissprot	41	Cochliobolus carbonum	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	65-75	103623	Swissprot	43	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Beta-glucosidase	83-98	86794	ExpASy	47	Aspergillus clavatus	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	83-98	85424	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Beta-mannosidase precursor	118-145	100623	Swissprot	36	Aspergillus niger	cellobiase
Glucoamylase precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	51-57	60763	Swissprot	49	Aspergillus shirousami	cellobiase
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	48-51	47694	ExpASy	84		cellobiase
Acid trehalase	98-118	72696	ExpASy	63	Laccaria bicolor	cellobiase
Short-chain oxidoreductase, putative	35-41	31511	ExpASy	43	Aspergillus clavatus	Cellulose degr.
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	41-48	42810	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase 3 precursor	41-48	49208	Swissprot	47	Humicola insolens	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	35-41	39566	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25-27	26968	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25-27	26345	Swissprot	41	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
putative glucanase precursor	29-35	33316	eukKEGG	43	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	35-41	34496	Swissprot	37	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	29-35	34496	Swissprot	37	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	16-19	23647	Swissprot	35	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	35-41	32495	Swissprot	39	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Cellulose-growth-specific protein precursor	29-35	32098	Swissprot	64	Agaricus bisporus	endoglucanase
putative glucanase precursor	27-29	33839	KEGG	44	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	51-57	49161	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	29-35	33566	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Exocellobiohydrolase II	29-35	24518	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	41-48	11595	Swissprot	83		exoglucanase
Glycoside hydrolase family 74 (Fragment) / CEL6 protein (Cellobiohydrolase)	57-65	42150	ExpASy	88	Phanerochaete chrysosporium / Coprinopsis cinerea	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	54852	Swissprot	99		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	29-35	---	Swissprot	41	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	48-51	48387	Swissprot	65	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exoglucanase I precursor (Exocellobiohydrolase I)	98-118	89570	Swissprot	44	Aspergillus aculeatus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	48-51	53807	Swissprot	78		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	57-65	58105	Swissprot	79		exoglucanase
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	41-48	42313	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	35-41	31039	Swissprot	63	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Beta-xylosidase	75-83	83794	ExpASy	58	Postia placenta	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	41-48	21655	Swissprot	44	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	29-35	35193	Swissprot	68	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Cinnamoyl esterase)	35-41	35564	Swissprot	47	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	35-41	30521	Swissprot	45	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase B precursor	29-35	30405	Swissprot	62	Emericella nidulans	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	41-48	43543	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	35-41	37662	Swissprot	61	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.



Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	41-48	39867	Swissprot	82		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	35-41	40090	Swissprot	100		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	35-41	39961	Swissprot	90		Lignin depol.
Ligninase H2 precursor (Diarylpropane peroxidase) (Lignin peroxidase) (LG4)	35-41	39450	Swissprot	99		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	35-41	39504	Swissprot	100		Lignin depol.
Glyoxal oxidase precursor	75-83	81957	ExPASy	95		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	35-41	39532	Swissprot	100		Lignin depol.
NAD-dependent malic enzyme (NAD-ME); malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) activity (GO classification)		63498	Swissprot	48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Lignin depol.) intrazellulär
Oxalate decarboxylase	41-48	46781	ExPASy	63	<i>Coprinopsis cinerea</i>	(Lignin depol.) intrazellulär
Candidate oxalate decarboxylase	48-51	47742	ExPASy	63	<i>Postia placenta</i>	(Lignin depol.) intrazellulär
Oxalate decarboxylase	41-48	48270	ExPASy	62	<i>Dichomitus squalens</i>	(Lignin depol.) intrazellulär
Galactan 1,3-beta-galactosidase precursor	41-48	49095	ExPASy	67		Pectin degr.
Polygalacturonase precursor (Pectinase)	35-41	39807	Swissprot	41	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	98-118	113326	Swissprot	24	<i>Aspergillus niger</i>	Pectin degr.
Rhamnogalacturonase A precursor (RGase A); polygalacturonase	41-48	44279	Swissprot	52	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Pectin degr.
Pectinesterase precursor (Pectin methylesterase)	35-41	35997	Swissprot	39	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Pectin degr.
Alpha-galactosidase precursor	98-118	41881	ExPASy	49	<i>Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)</i>	Pectin degr.
Galactose-1-epimerase	35-41	38280	ExPASy	57	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Pectin degr.
Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase (Endo-1,4-beta-galactanase)	29-35	36746	Swissprot	44	<i>Corynascus heterothallicus</i>	Pectin degr.
Chitinase 2 precursor	41-48	49199	Swissprot	42	<i>Rhizopus microsporus var. oligosporus</i>	Chitinase
N-acetylhexosaminidase	57-65	46948	ExPASy	64	<i>Postia placenta</i>	Chitinase
Chitinase 1 precursor	27-29	31508	Swissprot	49	<i>Rhizopus microsporus var. oligosporus</i>	Chitinase
Chitinase 1 precursor	51-57	54884	Swissprot	48	<i>Aphanocladium album</i>	Chitinase
Putative uncharacterized protein (Hypothetical protein that contains an Interpro domain comprising a chitinase active site)	27-29	30358	ExPASy	75	<i>Postia placenta</i>	Chitinase
Aspartic protease precursor	29-35	44214	ExPASy	37	<i>Phaffia rhodozyma</i>	protease
Tripeptidyl peptidase A	41-48	59059	ExPASy	46	<i>Coprinopsis cinerea</i>	protease
Protease [prot1]	29-35	41801	ExPASy	48	<i>Amanita muscaria</i>	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	19-25	21680	Swissprot	54	<i>Aspergillus niger</i>	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	19-25	26781	Swissprot	50	<i>Aspergillus niger</i>	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	19-25	27153	Swissprot	50	<i>Aspergillus niger</i>	protease
Family S53 protease	35-41	57596	ExPASy	56		protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	35-41	26613	Swissprot	50	<i>Aspergillus niger</i>	protease
Family S53 protease	35-41	59003	ExPASy	93		protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	29-35	41939	Swissprot	76	<i>Irpex lacteus</i>	protease
N,O-diacetyl muramidase, putative (lysozyme activity)	19-25	24457	ExPASy	63	<i>Penicillium stiptatum</i>	protease

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
undescribed	65-75	49702	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-29	32837	whiterot1	50		undescribed
undescribed	118-145	126392	whiterot1	76		undescribed
undescribed	25-27	28790	whiterot1	100		undescribed
undescribed	29-35	78355	whiterot1	73		undescribed
undescribed	12-16	14173	whiterot1	100		undescribed
undescribed	83-98	79311	whiterot1	100		undescribed
undescribed	25-27	30169	whiterot1	100		undescribed
undescribed	12-16	17888	whiterot1	74		undescribed
undescribed	51-57	48910	whiterot1	100		undescribed
undescribed	75-83	83821	whiterot1	74		undescribed
undescribed	65-75	66583	whiterot1	95		undescribed
undescribed	118-145	21523	whiterot1	96		undescribed
undescribed	98-118	108806	whiterot1	98		undescribed
undescribed	27-29	27395	whiterot1	51		undescribed
undescribed	75-83	77676	whiterot1	97		undescribed
undescribed	57-65	53831	whiterot1	94		undescribed
undescribed	65-75	75331	whiterot1	97		undescribed
Predicted protein	16-19	70966	ExpASy	32	Laccaria bicolor	-
Putative uncharacterized protein	57-65	54587	ExpASy	53	Schizophyllum commune	-
Predicted protein	12-16	131234	ExpASy	51	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	41-48	49987	ExpASy	43	Postia placenta	-
Predicted protein	27-29	22823	ExpASy	39	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein		106419	ExpASy	28	Malassezia globosa	-
no homologous sequence	8-12	13575	-	-	-	-
no homologous sequence	12-16	30252	-	-	-	-
no homologous sequence	19-25	13486	-	-	-	-

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
nonribosomal protein of the nucleolus and coiled bodies	35-41	62745	eukKEGG	33	Candida albicans SC5314	intracellular
Receptor-activated Ca <sup>2+</sup> -permeable cation channel	12-16	61522	ExPASy	53	Laccaria bicolor	intracellular
putative cycloisomerase 2 family protein	35-41	37061	eukKEGG	26	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Snurportin-like protein (nucleus)	27-29	47916	ExPASy	36	Phytophthora infestans	intracellular
Midasin; regulation of transcription, DNA-dependent	118-145	535975	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	intracellular
probable pseudouridylate synthase (RNA binding, mitochondrion)		41834	eukKEGG	39	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Spindle pole body component alp6 (Altered polarity protein 6)	65-75	81701	Swissprot	34	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
alpha-methylacyl-CoA racemase; Lipid transport and metabolism	118-145	33875	eukKEGG	47	Mus musculus	intracellular
Enoyl-CoA hydratase	35-41	31514	ExPASy	65	Laccaria bicolor	intracellular
Pc18g02250 protein (strong similarity to polyamine oxidase PAO -Zea mays)	41-48	55523	ExPASy	42	Penicillium chrysogenum	intracellular
cta1; catalase	57-65	61627	KEGG	50	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
riboflavin aldehyde-forming enzyme (raf); formation of mycelial aggregates	8-12	9100	KEGG	32	Candida albicans SC5314	intracellular

#### **4.4.10 Proteom über Fichten-Holzpuder, technische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht**

Über Fichten-Holzpuder, während der technischen Reproduktion und 3 Wochen der Anzucht (siehe Abb. 4.33 und Tab. 4.10), wurden 41 cellulolytische homologe Proteine (14 Cellobiasen, 16 Endo- und 9 Exoglucanasen, 1 Cellobiose-Dehydrogenase, 1 mit einer nicht genauer definierten Cellulose-Abbaufunktion) gemessen. Weiterhin wurden 11 hemicellulolytische, 6 ligninolytische und 10 Pektin abbauende homologe Proteine gefunden. Außerdem wurden 4 Chitinasen und 20 Proteasen detektiert. 35 nicht beschriebene Proteine (davon 3 ohne homologe Sequenzen) und 20 weitere extra- und auch intrazelluläre Stoffwechselproteine wurden ebenfalls erhalten. Schließlich konnten 35 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte Proteinsequenzen mittels ExpPASy Proteomics Server annotiert werden.

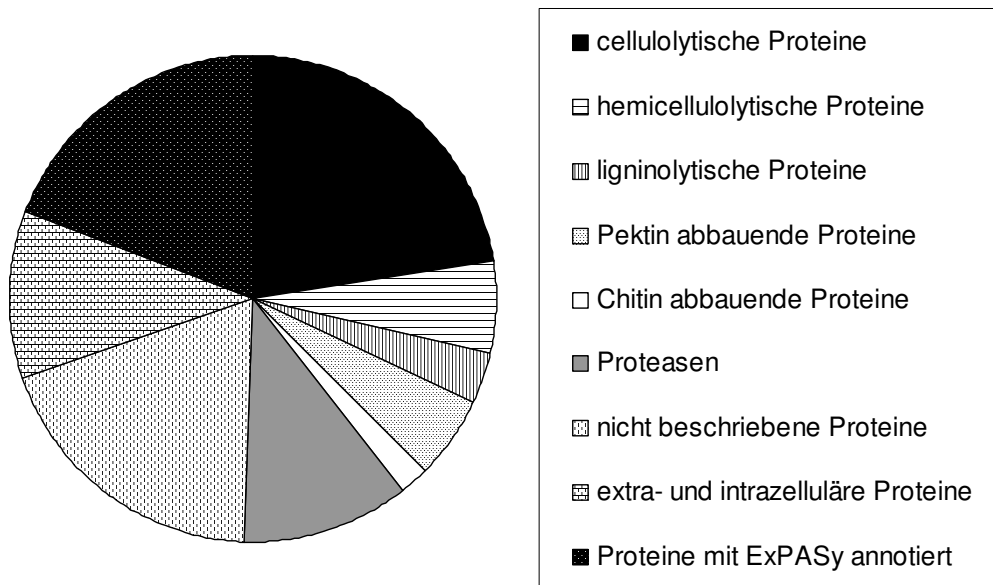


Abb. 4.33: Proteom über Fichten-Holzpuder (technische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht)

Tab. 4.10: Extrazellulärer Proteinkomplex über Fichten-Holzpudder, 3 Wochen angezüchtet

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Alpha-glucosidase	118-145	101889	ExPASy	67	Postia placenta	cellobiase
putative alpha-1,2-mannosidase	83-98	67573	eukKEGG	23	Candida albicans SC5314	cellobiase
Alpha-N-arabinofuranosidase A precursor (Arabinosidase A)	57-65	55288	Swissprot	29	Aspergillus niger	cellobiase
Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase precursor	57-65	59472	Swissprot	36	Penicillium citrinum	cellobiase
Glucoamylase S1/S2 precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	75-83	128546	Swissprot	13	Saccharomyces cerevisiae	cellobiase
Man5C (mannan endo-1,4-β-mannosidase)	48-51	40767	ExPASy	86		cellobiase
Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	75-83	84367	Swissprot	41	Cochliobolus carbonum	cellobiase
Alpha-glucosidase precursor (Maltase)	75-83	103623	Swissprot	43	Pseudozyma tsukubaensis	cellobiase
Beta-glucosidase	83-98	86794	ExPASy	47	Aspergillus clavatus	cellobiase
Beta-glucosidase 1 precursor (Gentiobiase) (Cellobiase)	83-98	85424	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	cellobiase
Beta-mannosidase precursor	98-118	100623	Swissprot	36	Aspergillus niger	cellobiase
Glucoamylase precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase)	51-57	60763	Swissprot	49	Aspergillus shirousami	cellobiase
Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	48-51	47694	ExPASy	84		cellobiase
Acid trehalase	75-83	72696	ExPASy	63	Laccaria bicolor	cellobiase
Cellulose dehydrogenase precursor	83-98	81957	Swissprot	100		Cellulose dehydrogenase
Glycosyltransferase family 1 protein (Fragment)		47306	ExPASy	31	Schizophyllum commune	Cellulose degr.
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	41-48	42810	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase 3 precursor	41-48	49208	Swissprot	47	Humicola insolens	endoglucanase
Arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase A precursor	27-29	32869	Swissprot	36	Aspergillus niger	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	35-41	39566	Swissprot	49	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	25-27	26968	Swissprot	42	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase I precursor	27-29	26345	Swissprot	41	Aspergillus aculeatus	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	29-35	34374	Swissprot	33	Hypocrea jecorina	endoglucanase
putative glucanase precursor	29-35	33316	eukKEGG	43	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	35-41	34496	Swissprot	37	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	25-27	23647	Swissprot	35	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	35-41	32739	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	29-35	32495	Swissprot	39	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Cellulose-growth-specific protein precursor	29-35	32098	Swissprot	64	Agaricus bisporus	endoglucanase
putative glucanase precursor	29-35	33839	KEGG	44	Schizosaccharomyces pombe	endoglucanase
Endoglucanase EG-II precursor (Endo-1,4-beta-glucanase)	48-51	49161	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Endoglucanase IV precursor (Endo-1,4-beta-glucanase IV)	29-35	33566	Swissprot	45	Hypocrea jecorina	endoglucanase
Exocellobiohydrolase II	19-25	24518	Swissprot	40	Hypocrea jecorina	exoglucanase
Glycoside hydrolase family 74 (Fragment) / CEL6 protein (Cellobiohydrolase)	83-98	42150	ExPASy	88	Phanerochaete chrysosporium / Coprinopsis cinerea	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	54852	Swissprot	99		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	57-65	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	57-65	53866	Swissprot	81		exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	27-29	---	Swissprot	41	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase 3	48-51	48387	Swissprot	65	Agaricus bisporus	exoglucanase
Exoglucanase I precursor (Exocellobiohydrolase I)	83-98	89570	Swissprot	44	Aspergillus aculeatus	exoglucanase
Exocellobiohydrolase I	51-57	58105	Swissprot	79		exoglucanase
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	29-35	31039	Swissprot	63	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Beta-1,4-endoxylanase	41-48	37715	ExPASy	45	Thermobifida alba	Hemicellulose degr.
Beta-xylosidase	83-98	83794	ExPASy	58	Postia placenta	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	29-35	35193	Swissprot	68	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Cinnamoyl esterase)	35-41	35564	Swissprot	47	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Feruloyl esterase B precursor (Ferulic acid esterase B)	29-35	30521	Swissprot	45	Penicillium funiculosum	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase B precursor	29-35	30405	Swissprot	62	Emmericella nidulans	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	41-48	43543	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	41-48	42313	Swissprot	62	Agaricus bisporus	Hemicellulose degr.
Endo-1,4-beta-xylanase precursor	35-41	37662	Swissprot	61	Thermoascus aurantiacus	Hemicellulose degr.
Candidate carboxylesterase from carbohydrate esterase family CE10	65-75	55971	ExPASy	61	Postia placenta	hydrolase

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	41-48	40090	Swissprot	100		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent H4 precursor (MP-I)	41-48	39961	Swissprot	90		Lignin depol.
Ligninase H2 precursor (Diarylpropane peroxidase) (Lignin peroxidase) (LG4)	35-41	39450	Swissprot	99		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	41-48	39504	Swissprot	100		Lignin depol.
Glyoxal oxidase precursor	57-65	59130	ExPASy	95		Lignin depol.
Peroxidase manganese-dependent I precursor (Manganese peroxidase isozyme 1)	41-48	39532	Swissprot	100		Lignin depol.
Galactan 1,3-beta-galactosidase precursor	48-51	49095	ExPASy	67		Pectin degr.
Polygalacturonase precursor (Pectinase)	41-48	39807	Swissprot	41	Aspergillus parasiticus	Pectin degr.
Exopolygalacturonase precursor (ExoPG) (Galacturan 1,4-alpha-galacturonidase)	65-75	32195	Swissprot	47	Aspergillus tubingensis	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	98-118	113326	Swissprot	24	Aspergillus niger	Pectin degr.
Rhamnogalacturonase A precursor (RGase A); polygalacturonase	41-48	44279	Swissprot	52	Aspergillus aculeatus	Pectin degr.
Pectinesterase precursor (Pectin methylesterase)	35-41	35997	Swissprot	39	Aspergillus tubingensis	Pectin degr.
Alpha-galactosidase precursor	145-190	41881	ExPASy	49	Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)	Pectin degr.
Beta-galactosidase precursor (Lactase)	12-16	109766	Swissprot	36	Aspergillus niger	Pectin degr.
Galactose-1-epimerase	41-48	38280	ExPASy	57	Coprinopsis cinerea	Pectin degr.
Arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase (Endo-1,4-beta-galactanase)	29-35	36746	Swissprot	44	Corynascus heterothallicus	Pectin degr.
N-acetylhexosaminidase	65-75	46948	ExPASy	64	Postia placenta	Chitinase
Chitinase 1 precursor	29-35	31508	Swissprot	49	Rhizopus microsporus var. oligosporus	Chitinase
Chitinase 1 precursor	41-48	54884	Swissprot	48	Aphanocladium album	Chitinase
Putative uncharacterized protein (Hypothetical protein that contains an Interpro domain comprising a chitinase active site)	29-35	30358	ExPASy	75	Postia placenta	Chitinase
Carboxypeptidase cpdS precursor	57-65	57748	Swissprot	40	Aspergillus saitoi	protease
Putative aspartyl protease	35-41	42856	ExPASy	59	Nidula niveotomentosa	protease
Aspartic protease precursor	29-35	44784	ExPASy	34	Phaffia rhodozyma	protease
Aspartic protease precursor	29-35	44214	ExPASy	37	Phaffia rhodozyma	protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	35-41	35380	Swissprot	65	Irpex lacteus	protease
Tripeptidyl peptidase A	41-48	59059	ExPASy	46	Coprinopsis cinerea	protease
Endothiapepsin precursor (Aspartate protease)	35-41	33354	Swissprot	48	Cryphonectria parasitica	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	19-25	21680	Swissprot	54	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	19-25	26781	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	25-27	27153	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	35-41	39555	Swissprot	65	Irpex lacteus	protease
ceroid-lipofuscinosis, neuronal 2; Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin (GO Description)	51-57	64076	KEGG	28	Dictyostelium discoideum	protease
Family S53 protease	41-48	57596	ExPASy	56		protease
Aspergillopepsin II precursor (Acid protease A) (Proctase A)	16-19	26613	Swissprot	50	Aspergillus niger	protease
Family S53 protease	83-98	59003	ExPASy	93		protease
Subtilisin-like protease (Fragment)	83-98	93327	ExPASy	92		protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	29-35	41939	Swissprot	76	Irpex lacteus	protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	35-41	44134	Swissprot	75	Irpex lacteus	protease
N,O-diacetyl muramidase, putative (lysozyme activity)	25-27	24457	ExPASy	63	Penicillium stipitatum	protease
Polyporopepsin (Aspartic proteinase)	35-41	41208	Swissprot	64	Irpex lacteus	protease

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
undescribed	57-65	49702	whiterot1	100		undescribed
undescribed	29-35	32837	whiterot1	50		undescribed
undescribed	98-118	49595	whiterot1	95		undescribed
undescribed	8-12	63535	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-29	28790	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-29	30440	whiterot1	46		undescribed
undescribed	75-83	78355	whiterot1	73		undescribed
undescribed	16-19	14173	whiterot1	100		undescribed
undescribed	75-83	79311	whiterot1	100		undescribed
undescribed	27-29	30169	whiterot1	100		undescribed
undescribed	16-19	17888	whiterot1	74		undescribed
undescribed	65-75	120474	whiterot1	89		undescribed
undescribed	51-57	48910	whiterot1	100		undescribed
undescribed	65-75	59629	whiterot1	100		undescribed
undescribed	48-51	44266	eukKEGG	34	Candida albicans SC5314	undescribed
undescribed	83-98	83821	whiterot1	74		undescribed
undescribed	65-75	32799	whiterot1	42		undescribed
undescribed	65-75	32592	whiterot1	40		undescribed
undescribed	35-41	9140	whiterot1	100		undescribed
undescribed	48-51	52136	whiterot1	100		undescribed
undescribed	118-145	108806	whiterot1	98		undescribed
undescribed	27-29	27395	whiterot1	51		undescribed
undescribed	75-83	77676	whiterot1	97		undescribed
undescribed	75-83	64816	whiterot1	99		undescribed
undescribed	51-57	53831	whiterot1	94		undescribed
undescribed	65-75	75331	whiterot1	97		undescribed
Predicted protein	65-75	55135	ExPASy	70	Postia placenta	-
Putative uncharacterized protein	51-57	54587	ExPASy	53	Schizophyllum commune	-
Putative uncharacterized protein	48-51	49987	ExPASy	43	Postia placenta	-
Predicted protein	27-29	22823	ExPASy	39	Postia placenta	-
Predicted protein	65-75	---	ExPASy	36	Laccaria bicolor	-
Putative uncharacterized protein	48-51	58806	ExPASy	64	Postia placenta	-
no homologous sequence	16-19	20038	-	-	-	-
no homologous sequence	27-29	13486	-	-	-	-
no homologous sequence	98-118	78144	-	-	-	-

Homologous protein name	Band (kDa)	MW in Da	Database	Homology (% id)	Organism	(Swiss-Prot) classification
hypothetical serine-rich protein Carbohydrate transport and metabolism (KOG description)	19-25	19669	eukKEGG	36	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
hypothetical serine-rich protein Carbohydrate transport and metabolism (KOG description)	19-25	19669	eukKEGG	36	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
putative cytoskeleton assembly control protein	75-83	---	eukKEGG	22	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Mitochondrial ribosomal protein MRPL24	83-98	---	eukKEGG	49	Saccharomyces cerevisiae	intracellular
Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family	41-48	38990	eukKEGG	31	Candida albicans SC5314	intracellular
Spore coat protein SP96	41-48	42242	eukKEGG	26	Dictyostelium discoideum	intracellular
Gas (Growth arrest-specific)1-like protein [Gks1]	16-19	24463	ExPASy	28	Dactylellina haptotyla	intracellular
myosin heavy chain-like coiled-coil protein	25-27	55941	eukKEGG	30		intracellular
putative cycloisomerase 2 family protein	41-48	37061	eukKEGG	26	Schizosaccharomyces pombe	intracellular
Lipase 2 precursor (Lipase II) (GCL II)	57-65	54031	ExPASy	26	Galactomyces geotrichum	intracellular
D-lactonohydrolase-like protein	48-51	45650	ExPASy	58	Poria monticola	hydrolase/protease
Midasin; regulation of transcription, DNA-dependent	118-145	535975	eukKEGG	27	Candida albicans SC5314	intracellular
Lipase 4 precursor	48-51	---	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
purine nucleoside permease	41-48	36601	eukKEGG	47	Candida albicans SC5314	intracellular
Lipase 4 precursor	51-57	51401	Swissprot	42	Candida rugosa	intracellular
Polyprotein (Fragment) (integrase; reverse transcriptase; RNase H)	12-16	26883	ExPASy	70		intracellular
Enoyl-CoA hydratase	27-29	31514	ExPASy	65	Laccaria bicolor	intracellular
riboflavin aldehyde-forming enzyme (raf); formation of mycelial aggregates	12-16	9100	KEGG	32	Candida albicans SC5314	intracellular
FRS1; phenylalanine-tRNA ligase subunit	83-98	70505	KEGG	52	Candida albicans SC5314	intracellular
putative 5' nucleotidase family protein; hydrolase activity	57-65	69168	KEGG	35	Schizosaccharomyces pombe	intracellular



## 5. Diskussion

### 5.1 Verifizierung und Ergänzung des extrazellulären Enzymkomplexes für *Phanerochaete chrysosporium*

Im Folgenden wird anhand der eigenen Ergebnisse der bisherige Kenntnisstand der Literatur zu den einzelnen Abbausystemen modifiziert und vervollständigt und in den nachstehenden Schemata dargestellt.

Das extrazelluläre Cellulose-Abbausystem konnte bestätigt und bezüglich des Enzymtyps Cellobiasen mit verschiedenen Proteinbeispielen ergänzt werden ( $\alpha$ -Glucosidase,  $\alpha$ -Mannosidase,  $\beta$ -Mannosidase, Trehalase).

Hervorzuheben ist, dass *Phanerochaete chrysosporium* neben dem hydrolytischen (Cellobiasen hydrolysieren die Cellobiose zu Monosacchariden) zusätzlich einen oxidativen Abbauweg des Cellobiosemetabolismus' nutzt: Die Cellobiose-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation der Cellobiose zu Cellobiono-1,5-Lacton. Deshalb wird das Cellulose-Abbausystem nach Renganathan et al. (1990) und Yoshida et al. (2004) wie folgt verändert dargestellt (Abb. 5.1, Modifizierungen in rot dargestellt):

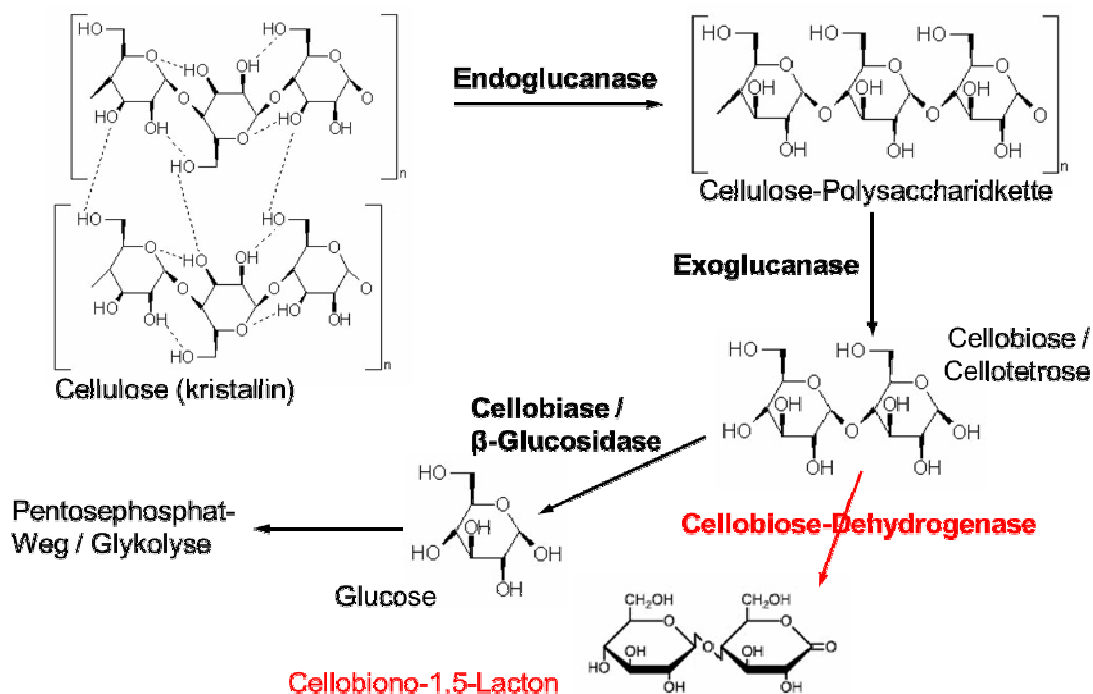


Abb. 5.1: Modifiziertes Schema des extrazellulären Cellulose-Abbausystems bei *Phanerochaete chrysosporium*

Das extrazelluläre Lignin-Depolymerisationssystem unter Beteiligung der Lignin- und Mangan-abhängigen Peroxidase konnte bestätigt bzw. mit wenigen alternativen Proteinen ergänzt werden (Kupferradikaloxidase (COX) als Alternative zur Glyoxaloxidase, die saure Phosphatase Phytase als Alternative zur Mannose-6-Phosphatase, Produktion der Malatdehydrogenase und Oxalatdecarboxylase während der 1. Chelatbildung).

Auch das extrazelluläre Hemicellulose-Abbausystem konnte um die Carboxylesterase, die von der Lignocellulose die Xylose abspaltet, und um die Feruloyl-esterase als Alternative zu den Endo-1,4-B-xylanasen A und B ergänzt werden.

Außerdem nutzt *Phanerochaete chrysosporium* einen alternativen oxidativen Abbauweg des Cellobiosemetabolismus': Die Cellobiose-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation der Xylo-Oligomere zu Xylobiono-1,4-Lacton. Somit kann das Hemicellulose-Abbausystem nach Schmidt (2006) in folgender Weise verändert werden (Abb. 5.2, Modifizierungen in rot dargestellt):

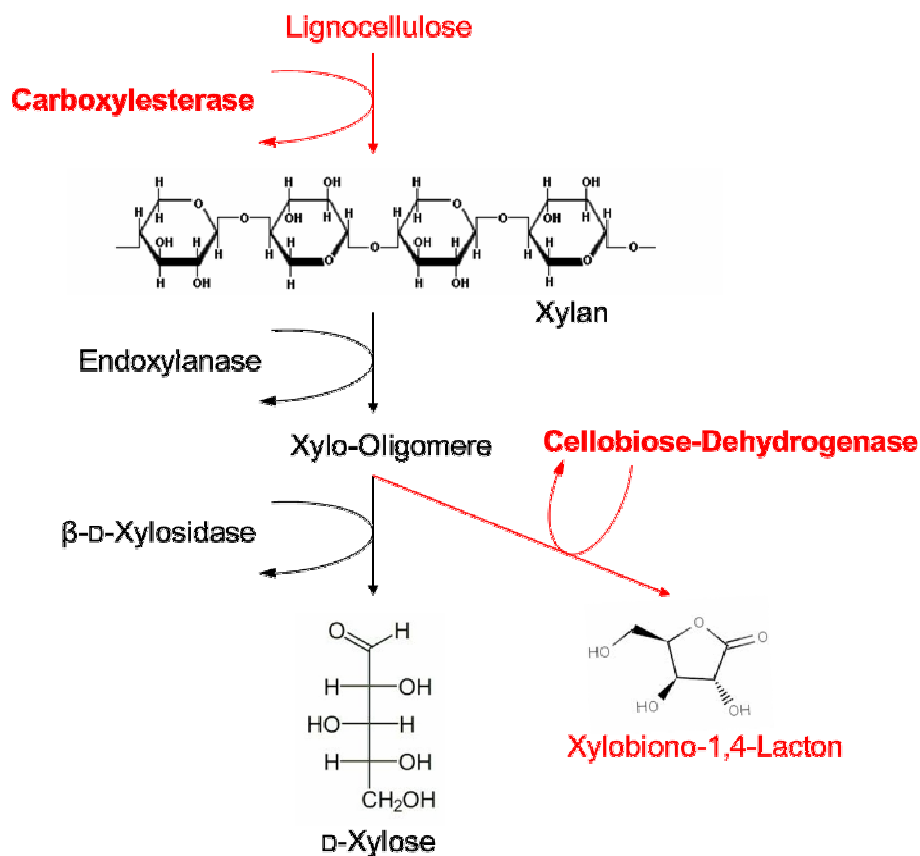


Abb. 5.2: Modifiziertes Schema des extrazellulären Hemicellulose-Abbausystems bei *Phanerochaete chrysosporium*

Entsprechend der erhaltenen Ergebnisse wurde weiterhin ein umfassenderes extrazelluläres Pektin-Abbausystem entwickelt. Nach Schmidt (2006) katalysieren die Galaktosidasen die Spaltung der Galaktose. Die vorliegende Studie zeigt aber, dass außerdem Pektinesterasen die Pektine der pflanzlichen Zellwände durch Demethylesterifizierung modifizieren, sodass die Zellwand zunächst gelockert wird, um danach zu zerbrechen. Die Arbeit der Pektinesterasen wiederum steigert die Hydrolyse des Pektins durch die Polygalakturonase in seine Galakturonsäure-Einheiten (Shanley et al. 1993).  $\beta$ -D-Xylosidasen spalten die endständige Xylose, die Arabinosidasen die endständige Arabinose der Pektine. Die Galaktose-Epimerase bewirkt eine Umlagerung von UDP-Galaktose zu UDP-Glucose und umgekehrt (Holden et al. 2003, Kirk et al. 1998, Schmidt 2006). Folglich kann das Pektin-Abbausystem wie folgt dargestellt werden (Abb. 5.3, Modifizierungen in rot dargestellt):

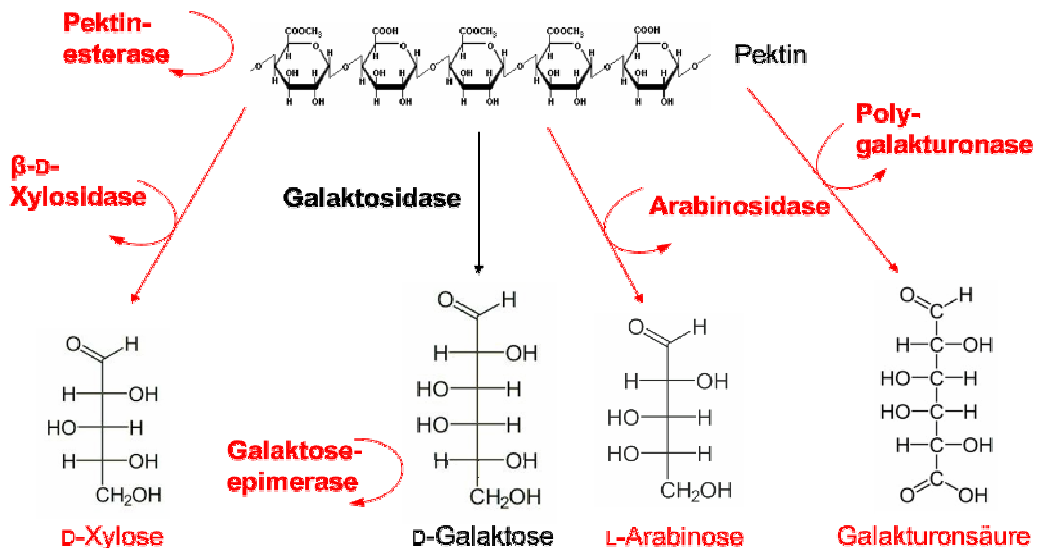


Abb. 5.3: Extrazelluläres Pektin-Abbausystem bei *Phanerochaete chrysosporium*

Auch für die extrazellulären Proteasen konnten zu verschiedenen Proteinfamilien unterschiedliche Proteinbeispiele ergänzt werden: Chitinasen (Hexosaminidase), Aspartyl-Endopeptidasen (Proctase, Polyporopepsin), Serin-Carboxypeptidasen (Subtilisin ähnliche Protease, S53-Protease), Metallo-Endopeptidase, Tripeptidylpeptidase und Threonin-Endopeptidase.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse und Modifizierung der einzelnen Abbausysteme konnte erstmalig für einen höheren Pilz ein hypothetisches Schema des Lignocellulose-Abbaus erstellt werden (Abb. 5.4):

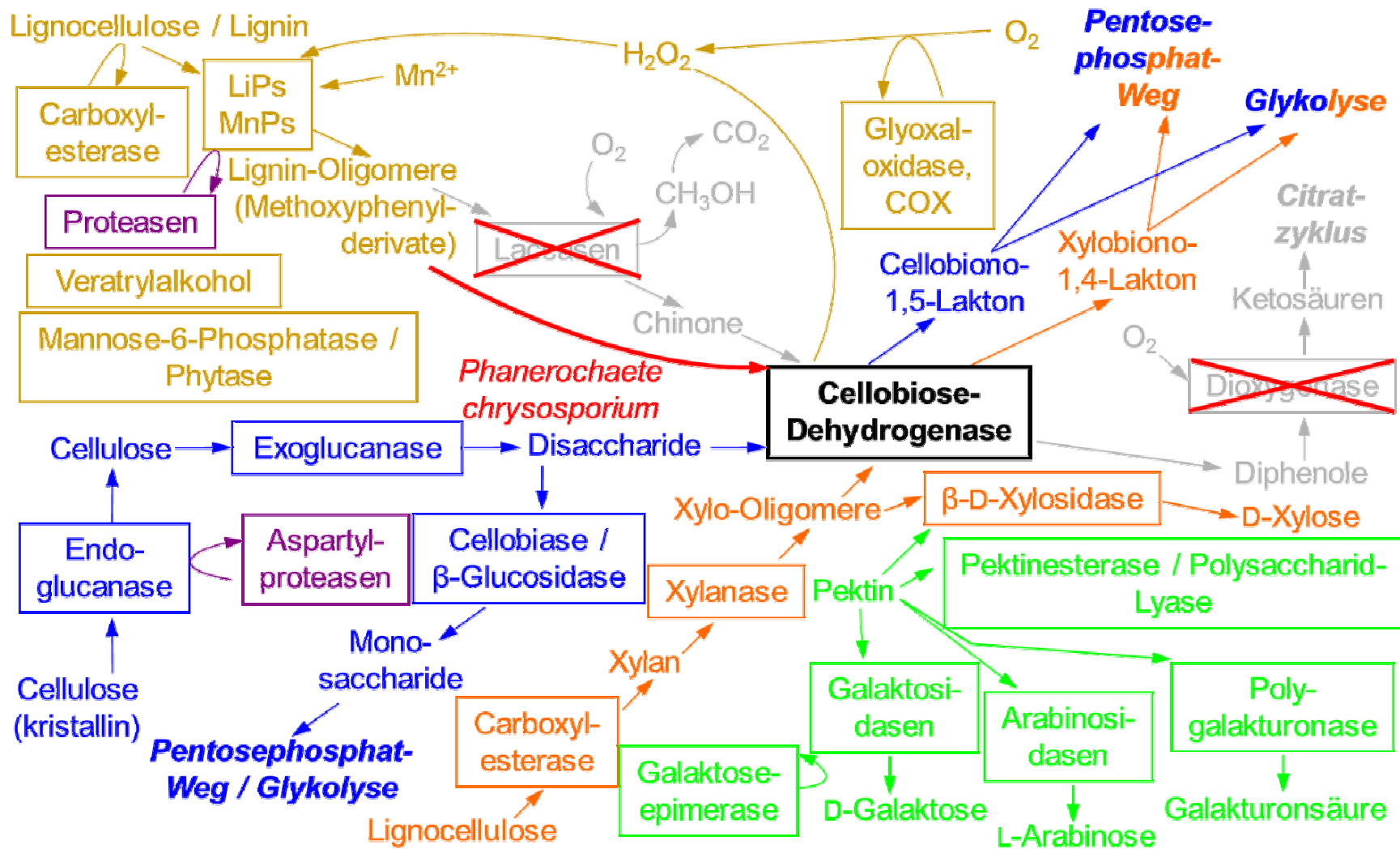


Abb. 5.4: Hypothetisches Schema des kooperierenden Lignin-, Cellulose-, Hemicellulose- und Pektinabbaus von *Phanerochaete chrysosporium* auf der Grundlage des Lignocellulose-Abbauschemas bei Weißfäulepilzen nach Leonowicz et al. (1999), Henriksson et al. (2000) und Peters (2004)

Die zentrale Rolle im Lignocellulose-Abbau ist der **Cellobiose-Dehydrogenase** zugeordnet. Sie verbindet die einzelnen Abbauewege des

- **Cellulose-Abbaus** (in Abb. 5.4 **blau** dargestellt) über die Endoglucanasen, die durch die Aspartylproteasen (in Abb. 5.4 **violett** dargestellt) aktiviert werden, Exoglucanasen und Cellobiasen bis zum Pentosephosphat-Weg und der Glykolyse sowie alternativ zu diesem hydrolytischen der zusätzliche oxidative Weg über die Cellobiose-Dehydrogenase,
- **Hemicellulose-Abbausystems** (in Abb. 5.4 **orange** dargestellt) über die Carboxylesterasen, Xylanasen und Xylosidasen, die die Lignocellulose in die Xylose spalten und alternativ zu diesem hydrolytischen der zusätzliche oxidative Weg über die Cellobiose-Dehydrogenase,
- **Pektin-Abbausystems** (in Abb. 5.4 **grün** dargestellt) über die Arabinosidasen, Galaktosidasen und Xylosidasen, die die endständigen Monosaccharide spalten, und die Pektinesterasen, Polysaccharid-Lyasen und Polygalakturonasen, die die inneren Bindungen des Pektins spalten,
- und **Lignin-Depolymerisationssysteme** (in Abb. 5.4 **braun** dargestellt) mit der Ligninperoxidase, die die Oxidation des phenolischen Substrats während der Delignifikation direkt katalysiert, und die Mangan-abhängige Peroxidase, die die Oxidation des phenolischen Substrats über den Mangan-Chelator-II-Komplex indirekt katalysiert.

Die meisten Weißfäulepilze produzieren **Laccasen** (in Abb. 5.4 **grau** dargestellt), um die Lignin-Oligomere zu demethylieren, die Chinone werden durch die Glucoseoxidase bzw. Xyloseoxidase abgebaut. *Phanerochaete chrysosporium* gehört jedoch unter den Weißfäulepilzen zur **Mangan-abhängigen-Peroxidase-Lignin-Peroxidase-Gruppe**, die keine Laccasen produzieren. Die in vivo-Funktion der Cellobiose-Dehydrogenase ist gegenwärtig noch immer nicht vollständig geklärt. Es kann aber angenommen werden, dass die Cellobiose-Dehydrogenase die Methoxyphenylderivate direkt abbaut. Die **Dioxygenasen** (in Abb. 5.4 **grau** dargestellt) konnten auch in vergleichbaren Studien nicht über ihrem natürlichen Substrat, sondern nur beim Abbau von toxischem Abfall, wie z. B. TNT, detektiert werden.

*Phanerochaete chrysosporium* vollzieht dabei den effektivsten, vollständigsten und auch schnellsten Abbau der einzelnen Bestandteile Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektin.

## **5.2 die Rolle der sekretierten Proteine der einzelnen Stoffwechselwege**

Die in dieser Arbeit geschaffenen Kulturbedingungen unterscheiden sich von denen der meisten Studien über *Phanerochaete chrysosporium* zur Detektierung des extrazellulären lignocellulolytischen Proteoms. In vielen Untersuchungen fanden künstliche Substrate in Form von Glucose- (Sato et al. 2007, Wymelenberg et al. 2009, Wymelenberg et al. 2010) und Cellulose-Medien (Wymelenberg et al. 2005, Sato et al. 2007, Wymelenberg et al. 2009) bzw. Kohlenstoff- (Wymelenberg et al. 2006, Ravalason et al. 2008, Wymelenberg et al. 2009) und Stickstoff-Mangelmedien (Wymelenberg et al. 2006, Wymelenberg et al. 2009) Verwendung. Das hier dargestellte Vorhaben konzentriert sich auf Flüssigkulturen über natürlichem Substrat (Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder). Ähnliche Arbeiten haben Roteiche (*Quercus rubra*) (Abbas et al. 2005, Sato et al. 2007, Sato et al. 2009), amerikanische Zitterpappel (*Populus tremuloides*) (Wymelenberg et al. 2010, Wymelenberg et al. 2011) und Schwarzkiefer (*Pinus nigra*) (Ravalason et al. 2008, Wymelenberg et al. 2011) verwendet. Diese Publikationen liefern ein stärker physiologisch relevantes Proteom, wohingegen die Glucose- und Cellulose-Flüssigkulturen unter Kohlenstoff- und Stickstoff-Mangel als Modelle für den theoretischen Lignocellulose-Abbau verwendet werden können.

Die detektierten Proteine können dem

- Kohlenhydrat-Stoffwechsel,
- Lignin-Stoffwechsel und
- Stickstoff-Stoffwechsel zugeordnet werden.

Im Folgenden wird auf die Rolle der in dieser Arbeit erhaltenen signifikanten Proteine der einzelnen Stoffwechselwege eingegangen.

### **5.2.1 Pektinasen und Oxalat-Decarboxylase**

Die Pektinasen der Holz abbauenden Pilze sind noch immer nicht gut charakterisiert (Sato et al. 2007). Das Pektin, das hauptsächlich aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verbundenen Galakturonsäure-Einheiten und ihrer Methylester besteht und durch 1,2-verbundene L-Rhamnose-Einheiten unterbrochen wird, wird durch diese Enzyme hydrolysiert. Trotz des geringen Pektin-Gehaltes im Holz von 4% soll die Enzymaktivität beim Holzabbau vermutlich entscheidend sein (Green et al. 1996). Der Hauptanteil des Pektins ist in der Mitte der Tüpfelmembranen und als Bestandteil der Mittellamelle der verholzten Zellwand zu finden. Weiterhin kommt Calcium im Holz vor allem im Pektin vor (Bednarska et al. 2005).

Es wird angenommen, dass Calcium eine zentrale Rolle bei der korrekten Ausbildung der Zellwand spielt (Young et al. 1966, Jellison et al. 1997).

Weiterhin wurden in dieser Arbeit 1,3- $\beta$ -Glucosidasen detektiert. Es wird vermutet, dass die Enzyme eventuell nicht an der Lignocellulose-Degradation beteiligt sind. Die 1,3- $\beta$ -Bindung ist für die Cellulose der Gräser typisch und konnte im Holz nicht, aber verbreitet in Pilz-Zellwänden gefunden werden. Es wird angenommen, dass die Proteine am pilzlichen Zellwand-Metabolismus beim Myzelwachstum beteiligt sind (Abbas et al. 2005).

Auch die Rolle der Oxalat-Decarboxylase, die in dieser Studie detektiert wurde, ist noch nicht vollständig geklärt (Sato et al. 2007). Sie wurde ebenfalls bei anderen Weißfäulepilzen gefunden (Dutton et al. 1994). Es wird angenommen, dass Oxalat den Zellwandabbau durch eine Komplexbildung mit Calcium ermöglicht. Dabei wird ihre Struktur gelockert. Sato et al. (2007) stellen fest, dass durch die Mangan-Peroxidase, die ebenfalls in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, der Chelatkomplex aus Oxalat und  $Mn^{2+}$  viel leichter als freies  $Mn^{2+}$  oxidiert werden kann (Kuan et al. 1993). Mäkelä et al. (2002) vermuten, dass dieses Enzym nur an der Regulation der Oxalatkonzentration beteiligt ist. Allerdings ist die Oxalat-Decarboxylase bei Braunfäule-Pilzen extrazellulär lokalisiert (Micales 1997). Beim Holzabbau sind für die Produkte der Oxalat-Decarboxylase (Formiat oder Kohlenstoffdioxid) keine Funktionen bekannt.

Mit dieser qualitativen Studie können die in der Literatur genannten Vermutungen weder korrigiert noch als richtig dargestellt werden, weil dafür eine quantitative Studie ergänzend durchgeführt werden müsste.

### **5.2.2 Proteasen und der Stickstoff-Stoffwechsel**

Die Proteasen sind an dem Lignocellulose-Abbau nicht direkt beteiligt.

Nach Sato et al. (2007) wurden diese extrazellulären Holz abbauenden Enzyme nicht umfassend untersucht und keine Signifikanz angenommen. Obwohl Stickstoff die am meisten limitierende Komponente für das Wachstum auf Holz darstellt, wurde die Produktion der Proteasen mit dem Ligninabbau nicht in Verbindung gebracht, da die meisten Studien mit *Phanerochaete chrysosporium* unter Stickstoffmangel durchgeführt wurden (Van Soest 1994).

Die Synthese des Ligninabbau-Systems wird durch die Begrenzung des Nährstoffs Stickstoff ausgelöst (Keyser et al. 1978). Kirk et al. (1987) nehmen an, dass Kohlenstoffmangel physiologisch vielmehr relevant ist. Sato et al. (2007) vermuten, dass der Pilz während des Wachstums im Holz einen Überschuss an Kohlenstoff zur Verfügung hat. Die Autoren gehen davon aus, dass ein Teil der Ligninolyse oder des Holzabbaus die Produktion der Proteasen darstellt. Pilze bauen Lignin ab, um Zugang zum im Holz befindlichen Stickstoff und nicht nur zur Cellulose zu bekommen. Es wird angenommen, dass der größte Teil des Stickstoffs in den Proteinen enthalten ist. Bei dieser Annahme ist zu berücksichtigen, dass der Stickstoffgehalt des Holzes zwischen 1 und 2% schwankt (Van Soest 1994). Keller et al. (1989 a, b) zeigen, dass in pflanzlichen Zellwänden eingebettete Proteine mit dem Lignin verbunden sein können.

Um an den Stickstoff der an das Lignin gebundenen Proteine zu gelangen, wird außerdem die in den Pilzkulturen detektierte Glutaminase benötigt. Der Zugang zum Stickstoff wird ebenfalls durch die Freisetzung von Ammoniak aus den vernetzten Proteinen für die holzabbauenden Pilze möglich. Die Glutaminase, die ebenfalls in anderen Pilzen gefunden wurde, deaminiert Glutamin zu Glutamat (Yano et al. 1991a, b).

Obwohl diese Proteasen gebildet werden, sind die lignocellulolytischen Enzyme von *Phanerochaete chrysosporium* nach Sato et al. (2007) verhältnismäßig beständig. Die Autoren stellen fest, dass eine Inkubation von bis zu 6 Stunden keinen relevanten Abbau extrazellulärer Proteine zeigt. Studien von Pease et al. (1992) erhalten ähnliche Ergebnisse. Sie liefern den Nachweis der Beständigkeit extrazellulärer Proteine für über 1 Monat.

Ravalason et al. (2008) hingegen detektieren eine Reihe von Protein-Spots im 2D-PAGE mit niedrigem Molekulargewicht, vermuten, dass es sich hierbei um abgebaute Peroxidase-Formen handeln könnte, und erklären dies mit dem Vorhandensein von proteolytischen Enzymen. Bonnarme et al. (1993) zeigen einen beginnenden, aber geringen proteolytischen Abbau von Ligninperoxidasen durch Thiol- und Aspartylproteasen (letztere wurden mit dieser Arbeit nachgewiesen) durch *Phanerochaete chrysosporium* über Nadelholz.

Eine abschließende Deutung kann mit dieser Arbeit, die qualitative Ergebnisse lieferte, nicht getroffen werden und muss mit einer quantitativen Studie erstellt werden.



### **5.2.3 Proteine weiterer Stoffwechselwege**

Ebenso wie Wymelenberg et al. (2006) wurden in den Flüssigkulturen Zellwand und Endoplasmatisches Reticulum (ER) gebundene Proteine gefunden.

Weiterhin wurden Proteine für den Lipid-Transport und den dazugehörigen Metabolismus, mitochondriale Proteine, Proteine des Zellkerns, des Cytoskeletts, der Zellzyklus-Kontrolle und der Zellteilung, Proteine die im Zusammenhang mit Translation, ribosomalen Strukturen und der Biogenese sowie der RNA stehen, Wachstums-, Vakuolen-, Membran gebundene und Membran-Transport-Proteine, Protein-Transport-Proteine (Intrazellulärer Transport, Sekretion und vesikulärer Transport) und intrazelluläre proteolytische und peptidolytische Proteine detektiert.

### **5.2.4 Hydrolasen und der Cellulose- und Hemicellulose-Stoffwechsel**

Enzyme, die der Familie der Kohlenhydrat metabolisierenden Hydrolasen angehören, sind sowohl am Cellulose- als auch am Hemicellulose-Stoffwechsel beteiligt. *Phanerochaete chrysosporium* bildet die Cellulasen (Cellulose-Stoffwechsel) und Xylanasen (Hemicellulose-Stoffwechsel) im Gegensatz zu den meisten anderen holzabbauenden Pilzen koordiniert (Han et al. 2004; Sato et al. 2007). In diesem Zusammenhang zeigen Dobozi et al. (1992) und Sato et al. (2007), dass die Xylanasen in Kulturen über natürlichem Substrat stärker als in Kulturen mit künstlichem Cellulose-Medium produziert werden. In dieser Arbeit wurden die sekretierten Proteine von *Phanerochaete chrysosporium* nur über natürlichem Substrat untersucht, weshalb über diese verstärkte Produktion keine Aussage getroffen werden kann.

Endoglucanasen, Exoglucanasen, Cellobiasen /  $\beta$ -Glucosidasen, die alle 3 wiederum viele Isozyme aufweisen, und die Cellobiose-Dehydrogenase sind an der Cellulose-Hydrolyse beteiligt. Die genannten Enzyme konnten in dieser Studie durch Homologie-Suche in den bereits erwähnten Datenbanken detektiert werden und wurden auch in ähnlichen proteomischen Studien über natürlichem Substrat (Abbas et al. (2005), Sato et al. (2007) und Sato et al. (2009) über Roteiche) erhalten. Die bei der Homologie-Suche gefundenen Sequenzen ähneln hypothetischen Proteinen und sind konzeptuelle Translationen aus anderen Pilz-Genom-Projekten, ohne die eine Annotation unbeschriebener Proteine aber nicht möglich wäre.

Auch die Proteine, die am Abbau der Hemicellulose im Laub- und Nadelholz beteiligt sind und in dieser Arbeit gemessen werden konnten, wurden in vergleichbaren Studien (Sato et al.

(2007) und Sato et al. (2009) über Roteiche) detektiert: Der Hauptbestandteil der Nadelholz-Hemicellulose ist O-Acetylgalactoglucomannan. Am Abbau sind die  $\alpha$ -Galactosidase,  $\beta$ -Mannosidase,  $\beta$ -Glucosidase, Endomannanasen und Acetylmannanesterasen beteiligt (Johnson 1990).

Der hauptsächliche Bestandteil der Hemicellulose im Laubholz stellt O-Acetylglucuronoxylan dar und wird von den Enzymen Endoxylanase, Acetylerase,  $\alpha$ -Glucuronidase,  $\alpha$ -Arabinosidase und  $\beta$ -Xylosidase degradiert (Coughlan et al. 1993). Nur die  $\alpha$ -Glucuronidase wurde sowohl in dieser Studie als auch bei Sato et al. (2007) und Sato et al. (2009) nicht gemessen.

### **5.2.5 Peroxidasen und der Lignin-Stoffwechsel**

Es wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass die Glyoxaloxidase das vorwiegende Enzym im Ligninmetabolismus darstellt, das extrazellulär  $H_2O_2$  produziert (Kersten et al. 1987). Sato et al. (2009) detektieren ebenfalls ein Enzym, das eine große Ähnlichkeit mit der homologen Alkohol-Dehydrogenase von *Gloeophyllum trabeum* aufweist. In dieser Arbeit wurde nicht nur die Glyoxaloxidase, sondern auch ein Homolog der Arylalkohol-Oxidase von *Pleurotus eryngii* nachgewiesen. Sowohl die von Sato et al. (2009) gefundene homologe Alkohol-Dehydrogenase als auch die in dieser Studie detektierte homologe Arylalkohol-Oxidase sind in der Pilz-Zellwand zu finden und es wird angenommen, dass beide wie die Glyoxaloxidase extrazelluläres  $H_2O_2$  produzieren (Ferreira et al. 2009, Hernández-Ortega et al. 2012).

Auch die in dieser Arbeit detektierte Cellobiose-Dehydrogenase produziert  $H_2O_2$ . Die in-vivo-Funktion der Cellobiose-Dehydrogenase beim pilzlichen Lignin-Abbau ist noch immer unklar und muss weiter erforscht werden. Es wird aber angenommen, dass es eine Verbindung zwischen dem Cellulose- und Lignin-Abbau, aber auch bei der Hemicellulose- und Pektin-Degradation darstellt (Henriksson et al. 2000, Li 2003).

*Phanerochaete chrysosporium* sekretiert Peroxidasen, um nicht nur Wasserstoffperoxid zu produzieren, sondern auch um die Pilzzellen vor dem toxischen  $H_2O_2$  zu schützen. Quantitative Studien von Sato et al. (2009) verdeutlichen, dass bei der Bildung extrazellulärer Proteine der Expressionslevel der Lignin-Peroxidasen sehr hoch liegt. Durch die in der vorliegenden Studie detektierte Lignin-Peroxidase wird eine Katalyse der Oxidation von phenolischen und nicht-phenolischen aromatischen Verbindungen im Lignin bewirkt und Kationen-Radikale entstehen (Kersten et al. 1985, Sato et al. 2009). Dadurch werden C-C-

Verbindungen gespalten und das Lignin depolymerisiert (Hammel et al. 1985, Sato et al. 2009). Aufgrund der ebenfalls in dieser Arbeit detektierten Mangan-Peroxidase wird eine Katalyse der Oxidation von  $Mn^{2+}$  zu  $Mn^{3+}$  bewirkt und die phenolischen Strukturen im Lignin werden oxidiert (Glenn et al. 1985, Sato et al. 2009). Dabei wird die Mangan-Peroxidase weniger stark als die Lignin-Peroxidase exprimiert. Daraus ist aber nicht zu schlussfolgern, dass die Mangan-Peroxidase eine geringere Aktivität aufweist, sondern sie besitzt eine höhere spezifische Aktivität als die Lignin-Peroxidase (Kuan et al. 1993, Sato et al. 2009).

Folgende lignolytische Enzymgruppen der Weißfäulepilze werden unterschieden: Lignin-Peroxidase–Laccase–Gruppe, Mangan-Peroxidase–Laccase–Gruppe, Mangan-Peroxidase–Lignin-Peroxidase–Laccase–Gruppe, Mangan-Peroxidase–Laccase–Gruppe und Mangan-Peroxidase–Lignin-Peroxidase–Gruppe (Peters 2004). Entsprechend der erhaltenen Ergebnisse kann die Zuordnung von *Phanerochaete chrysosporium* zur letztgenannten Gruppe bestätigt werden.

### **5.2.6 Proteine, die oxidativen Stress anzeigen**

Das als Substrat für die Peroxidasen dienende  $H_2O_2$  gehört zu den sogenannten Prooxidantien, die oxidativen Stress hervorrufen, und ist für die Zelle toxisch. Obwohl von  $H_2O_2$  angenommen wird, dass es extrazellulär gebildet wird, zeigt die Detektion der Katalase cta1, dass der Pilz oxidativem Stress ausgesetzt ist (Sato et al. 2009). Auch die Messung einer Proteindisulfid-Oxidoreductase-Aktivität und des Stress-Antwort-Proteins rds1p verdeutlichen dies. Über die Kulturen wurde mit Wasser gesättigter Sauerstoff am 2. und 5. Tag geleitet. Dies steigert den Ligninabbau in Oberflächen-Flüssigkulturen (Keyser et al. 1978). Es trägt zur Bildung der genannten Proteine bei, die oxidativen Stress anzeigen.

### **5.3 Schwierigkeiten bei der Protein-Identifizierung mittels Datenbanken und Massenspektrometrie**

Die JGI-Datenbank der Genmodelle mit den annotierten „vorhergesagten“ Genen weist Fehler auf, die wahrscheinlich auf Gen-Fragmente von Exon-Intron-Grenzen, Transkripte aus Gen-Regionen, die schwierig zu klonen sind, oder Sequenzier-Artefakte zurückzuführen sind (Sato et al. 2009). Weiterhin ergibt eine Blast-Suche in den Datenbanken eine geringere Anzahl an Proteinen aufgrund unvollständiger N-Termini, die durch Introns, die kurze Exons unterbrechen, hervorgerufen werden (Wymelenberg et al. 2006). Computerberechnete

Annotationen enthalten immer Zusammenstellungs-, Modell- und Sequenzfehler (Wymelenberg et al. 2010).

Damit ist das errechnete Sekretom unvollständig, sodass die angezeigten Ergebnisse nur ein „Gerüst“ interessanter Proteine darstellen (Wymelenberg et al. 2006).

Somit ist eine Überarbeitung des 2006 berechneten Genoms und der dafür verwendeten Algorithmen der JGI-Datenbank vonnöten.

Weiterhin ist nicht nur die Annotation durch ein unvollständiges Sekretom in der Datenbank schwierig, sondern auch eine massenspektrometrische Identifizierung weist Anwendungsgrenzen auf. Eine geringe Menge an sekretierten Proteinen, ein niedriges Molekulargewicht oder instabile Proteine sind schwer zu messen. Stark glykosylierte Proteine, solche, die an Zellwänden oder am Substrat haften, Proteine, die mit Signalpeptiden in die Zellwand oder in die Vakuolen sekretiert oder im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten werden, können schlechter nachgewiesen werden.

## 6. Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte ein sehr umfangreiches funktionelles Proteom von 120 extrazellulären lignocellulolytischen Proteinen von *Phanerochaete chrysosporium* über Fichten-Holzpuder und ein Proteom von 113 Proteinen über Rotbuchen-Holzpuder erhalten werden.

62 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO als unbeschrieben deklarierte, homologe Proteinsequenzen konnten mithilfe des ExPASy Proteomics Servers für die *Phanerochaete chrysosporium*-Kulturen über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder annotiert werden.

Diese Annotation sowie die Charakterisierung der ca. 10.000 Proteinsequenzen (Größenordnung vor Eliminierung der sich mehrfach wiederholenden Hits je Protein und der Auswahl jener mit der besten prozentualen Absicherung) und einheitliche Benennung und Klassifizierung der Proteine mit Hilfe des numerischen EC-Nummer-Klassifikationssystems von BRENDA umfasste ca. ¼ der Bearbeitungszeit für diese Studie.

Damit ist für weitere Studien eine umfangreiche Datenbank zur Identifikation und zum Vergleich der Proteine des Pilz-Lignocellulose-Metabolismus' erarbeitet worden.

Die Arbeit bietet eine umfassende Darstellung des Lignocellulose-Abbaus durch *Phanerochaete chrysosporium*. Anhand der Literatur und der erhaltenen Ergebnisse wurde auf der Grundlage eines allgemeinen hypothetischen Schemas für Weißfäulepilze erstmalig für einen höher systematischen Pilz (*Phanerochaete chrysosporium*) ein detailliertes hypothetisches Schema des Lignocellulose-Abbaus erstellt. Weiterhin konnte nicht nur das Cellulose-Abbausystem und die Protease-Aktivität basierend auf der existierenden Literatur bestätigt und das Hemicellulose- und Lignin-Depolymerisationssystem modifiziert und vervollständigt, sondern auch ein Pektin-Abbausystem entwickelt werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen sowohl eine Bestätigung der bisher bekannten, lignocellulolytisch degradierenden Proteine mit vergleichbaren Publikationen als auch 126 extrazelluläre unbeschriebene Proteine. Diese bieten für zukünftige Studien einen großen Datensatz, dessen Funktion noch bestimmt werden muss.

Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass eine quantitative Studie zwingend angeschlossen werden sollte, die nicht nur die sekretierten Proteine darstellt, sondern mit der auch der Zeitpunkt der Exprimierung und die Konzentration der einzelnen lignocellulolytischen Enzyme bestimmt werden kann. Zu verschiedenen in der Literatur dargestellten Sachverhalten kann keine Aussage getroffen werden, ohne dass eine solche quantitative Arbeit ergänzt würde.

Weiterhin ist festzustellen, dass sowohl zwischen den Kulturen über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder als auch während 1 und 3 Wochen der Anzucht keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen sind. Dafür wurden Tabellen erstellt, die die sekretierten Proteine von *Phanerochaete chrysosporium* nach Substrat (Rotbuche und Fichte) und nach der Zeit der Kultivierung (1 und 3 Wochen) vergleichen. Da in diesen Tabellen aber nur sehr geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Parametern zu verzeichnen sind und eine Diskussion darüber sehr schwierig ist, wurden diese vergleichenden Tabellen nicht einbezogen und stattdessen in den Ergebnissen und der Diskussion das zusammengefasste funktionelle Proteom betrachtet und anhand signifikanter Proteine der einzelnen Stoffwechselwege diskutiert.

Es lässt sich erkennen, dass *Phanerochaete chrysosporium* nicht nur ubiquitär auf sehr vielen einheimischen Laub- und Nadelholzarten (z. B. *Acer*, *Betula*, *Fagus*, *Quercus*, *Picea* und *Pinus*) wächst, sondern auch über den Substraten Laub- und Nadelholz universell extrazelluläre Proteine sekretiert, die sowohl nach 1 Woche als auch nach 3 Wochen Anzucht einen Abbau der einzelnen Bestandteile Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektin anzeigen. Dabei zählt dieser Pilz zwar zu den effizienten Lignin degradierenden Mikroorganismen, ist aber nicht nur in der Lage, Lignin, sondern auch Cellulose, Hemicellulose und Pektin abzubauen. Damit stellt die Art einen Weiß- und Braunfäuleerreger dar. Somit vollzieht *Phanerochaete chrysosporium* im Vergleich zu anderen Weiß- und Braunfäulepilzen einen effektiveren, vollständigeren und auch schnelleren Abbau der einzelnen Bestandteile Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Pektin.

Für die Kultivierung von *Phanerochaete chrysosporium* könnten weitere Parameter während der Anzucht wie die Temperatur oder der pH-Wert, aber auch das Substrat (z. B. über Eibe (*Taxus baccata*) und Wacholder (*Juniperus communis*)) variiert werden. Da *Phanerochaete*

*chrysosporium* ubiquitär auf Laub- und Nadelhölzern wachsen kann, könnte in einer weiteren Studie die Holzdegradation über diesem speziellen Substrat untersucht werden.

## 7.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das funktionelle lignocellulolytische Proteom von *Phanerochaete chrysosporium* mittels Massenspektrometrie charakterisiert.

Ziel war es, den Einfluss des natürlichen Substrats Rotbuche (*Fagus sylvatica*) und Gemeine Fichte (*Picea abies*) auf die Proteinexpression der Lignocellulose abbauenden Proteine zu vergleichen, das Cellulose-Abbausystem, Hemicellulose-Abbausystem, Lignin-Depolymerisationssystem und Pektin-Degradationssystem zu modifizieren bzw. zu vervollständigen und bezüglich ihrer Funktion bisher noch unbekannt Proteine zu annotieren. Weiterhin sollte ein hypothetisches Schema des Degradationssystems von *Phanerochaete chrysosporium* erstellt und Protokolle zur Kultivierung, Protein-Extraktion, 1D-PAGE und zum Protein-in-Gel-Verdau modifiziert werden.

Dazu wurde der Pilz in Fest- und Flüssigkultur angezüchtet, die sekretierten Proteine extrahiert, mit Hilfe der 1D-PAGE visualisiert und nach einem Protein-in-Gel-Verdau mittels nano-LC-ESI-MS/MS detektiert.

Dabei konnten folgende Ergebnisse erhalten werden:

- Die Protokolle zur Kultivierung, Protein-Extraktion, 1D-PAGE und zum Protein-in-Gel-Verdau wurden modifiziert und eine Apparaturanordnung für die Flüssigkultur etabliert.
- Das extrazelluläre Cellulose-Abbausystem und die Protease-Aktivität konnten bestätigt, das Hemicellulose- und Lignin-Depolymerisationssystem ergänzt und ein umfassendes Pektin-Abbausystem entwickelt werden. Weiterhin wurde anhand der Literatur und der Ergebnisse ein hypothetisches Schema des Lignocellulose-Abbaus erstellt. 62 in den Datenbanken whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG und GO unbeschriebene Proteinsequenzen konnten mithilfe des ExPASy Proteomics Servers annotiert werden, 126 unbeschriebene Proteine bieten für zukünftige Studien einen großen Datensatz.
- Über Fichten-Holzpuder konnten 120 extrazelluläre lignocellulolytische und über Buchen-Holzpuder 113 Proteine erhalten werden. Zwischen den Kulturen über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder als auch während 1 und 3 Wochen der Anzucht konnten keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden. *Phanerochaete chrysosporium* wächst ubiquitär auf sehr vielen einheimischen Laub- und Nadelholzarten und sekretiert universell und gleichzeitig extrazelluläre Proteine. Zur Bestimmung des Zeitpunkts der Exprimierung und der Konzentration der einzelnen lignocellulolytischen Enzyme sollte eine quantitative Studie zwingend angeschlossen werden. Auch weitere Parameter während der Anzucht (Temperatur, pH-Wert oder das Substrat) könnten variiert werden.



## 7.2 Summary

In the present study the functional lignocellulolytic proteome of *Phanerochaete chrysosporium* was characterized by mass spectrometry.

The aim was to compare the influence of the natural substrates beech (*Fagus sylvatica*) and spruce (*Picea abies*) on protein expression of lignocellulose degrading proteins. Thus it was aimed to close knowledge gaps within the cellulose and hemicellulose degradation systems, as well as the lignin depolymerization and pectin degradation systems, and to annotate previously unknown proteins with respect to their function. Further, a hypothetical scheme of the *P. chrysosporium* wood degradation system was to be created and protocols of culturing, protein extraction, 1D PAGE, and protein in-gel digestion should be enhanced.

For this, the fungus was grown in solid substrate and liquid submerged cultures. Secreted proteins were extracted, visualized using 1D PAGE, and detected after a protein in-gel digestion using nanoLC-ESI MS/MS.

The following results were obtained:

- The protocols for culturing, protein extraction, 1D PAGE, and protein in-gel digestion were enhanced, and a novel apparatus arrangement for the liquid submerged cultures was established.
- Presence of the extracellular cellulose degradation system and protease activity was confirmed, whereas the hemicellulose and lignin depolymerization system could be supplemented, and a comprehensive pectin degradation system was developed. Furthermore, a hypothetical scheme of lignocellulose degradation was created based on both own results and literature. Using the ExPASy Proteomics server, 62 previously undescribed protein sequences in the databases whiterot1 v2.0, UniProtKB / Swiss-Prot, KEGG, KOG, and GO were annotated, and 126 still undescribed proteins provide a large data set for future studies.
- Cultures with spruce wood powder yielded 120 extracellular lignocellulolytic proteins, while 113 proteins were obtained from beech wood powder cultures. The comparison of extracellular proteins from beech and spruce cultures, as well as harvesting after 1 and 3 weeks of cultivation, showed no significant differences. *P. chrysosporium* grows ubiquitously on a large number of native deciduous and coniferous wood species and secretes extracellular proteins universally and simultaneously. To determine the expression time and concentration of the individual lignocellulolytical enzymes, a quantitative study would be necessary. Variation of other parameters (temperature, pH, or

substrate) during the cultivation might also lead to valuable insights on possible adaptive strategies on different substrates.

## 8. Literaturverzeichnis

- 1.) Abbas, A., Koc, H., Liu, F., Tien, M. (2005). Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate. *Current Genetics* 47: 49-56.
- 2.) Adler, E. (1977). Lignin Chemistry - Past, Present and Future. *Wood Science and Technology* 11: 169-218.
- 3.) Arjmand, M., Sandermann Jr., H. (1985). Mineralization of Chloroaniline/Lignin Conjugates and of Free Chloroanilines by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33 (6): 1055-1060.
- 4.) Baker, A. J. (1973). Effect of Lignin on the In Vitro Digestibility of Wood Pulp. *Journal of Animal Science* 36 (4): 768-771.
- 5.) Balachandra Dass, S., Dosoretz, C. G., Reddy, C. A., Grethlein, H. E. (1995). Extracellular proteases produced by the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic and non-ligninolytic conditions. *Archives of Microbiology* 163 (4): 254-258.
- 6.) Bandoni, J. R. (1972). Terrestrial occurrence of some aquatic Hyphomycetes. *Canadian Journal of Botany* 50: 2283-2288.
- 7.) Bednarska, E., Lenartowska, M., Niekraś, L. (2005). Localization of pectins and Ca<sup>2+</sup> ions in unpollinated and pollinated wet (*Petunia hybrida* Hort.) and dry (*Haemanthus albiflos* L.) stigma. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 43 (4): 249-259.
- 8.) Bertinetti, D., Schweinsberg, S., Hanke, S. E., Schwede, F., Bertinetti, O., Drewianka, S., Genieser, H.-G., Herberg, F. W. (2009). Chemical tools selectively target components of the PKA system. *BMC Chemical Biology* 9 (3). doi: 10.1186/1472-6769-9-3.
- 9.) Binder, M., Hibbett, D. S., Larsson, K.-H., Larsson, E., Langer, E., Langer, G. (2005). The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *Systematics and Biodiversity* 3 (2): 113-157.
- 10.) Bogan, B. W., Schoenike, B., Lamar, R. T., Cullen, D. (1996). Manganese Peroxidase mRNA and Enzyme Activity Levels during Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (7): 2381-2386.

- 11.) Bonnarne, P., Asther, M., Asther, M. (1993). Influence of primary and secondary proteases produced by free or immobilized cells of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on lignin peroxidase activity. *Journal of Biotechnology* 30: 271-282.
- 12.) Brodkorb, T. S., Legge, R. L. (1992). Enhanced Biodegradation of Phenanthrene in Oil Tar-Contaminated Soils Supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (9): 3117-3121.
- 13.) Bumpus, J. A., Aust, S. D. (1987). Biodegradation of Environmental Pollutants by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the Lignin Degrading System. *BioEssays* 6 (4): 166-170.
- 14.) Bumpus, J. A., Tatarko, M. (1994). Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: Identification of Initial Degradation Products and the Discovery of a TNT Metabolite That Inhibits Lignin Peroxidases. *Current Microbiology* 28: 185-190.
- 15.) Burdsall Jr., H. H. (1985). A Contribution to the Taxonomy of the Genus *Phanerochaete* (Corticaceae, Aphyllophorales). *Mycologia Memoir* 10: 61-63.
- 16.) Burdsall Jr., H. H., Esllyn, W. E. (1974). A new *Phanerochaete* with a chrysosporium imperfect state. *Mycotaxon* 1 (2): 123-133.
- 17.) Coughlan, M. P., Hazlewood, G. P. (1993). beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 17 (3): 259-289.
- 18.) Crawford, D. L., Crawford, R. L. (1980). Microbial degradation of lignin. *Enzyme and Microbial Technology* 2: 11-22.
- 19.) Davis, M. W., Glaser, J. A., Evans, J. W., Lamar, R. T. (1993). Field Evaluation of the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete sordida* to Treat Creosote-Contaminated Soil. *Environmental Science & Technology* 27 (12): 2572-2576.
- 20.) Dobozi, M. S., Szakács, G., Bruschi, C. V. (1992). Xylanase Activity of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (11): 3466-3471.
- 21.) Dosoretz, C. G., Chen, H.-C., Grethlein, H. E. (1990). Effect of Environmental Conditions on Extracellular Protease Activity in Lignolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (2): 395-400.
- 22.) Dutton, M. V., Kathiara, M., Gallagher, I. M., Evans, C. S. (1994). Purification and characterization of oxalate decarboxylase from *Coriolus versicolor*. *FEMS Microbiology Letters* 116: 321-326.

- 23.) Eriksson, J., Hjortstam, K., Ryvarde, L. (1978). The Corticiaceae of North Europe. Vol. 2. Fungiflora, Oslo. 887-1048.
- 24.) Ferreira, P., Hernandez-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, Á. T., Medina, M. (2009). Aryl-alcohol Oxidase Involved in Lignin Degradation: a mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two alcohol substrates. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (37): 24840-24847.
- 25.) Glenn, J. K., Gold, M. H. (1985). Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II)-Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 242 (2): 329-341.
- 26.) Gold, M. H., Alic, M. (1993). Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* 57 (3): 605-622.
- 27.) Green III, F., Kuster, T. A., Highley, T. L. (1996). Pectin degradation during colonization of wood by brown-rot fungi. *Recent Research Development in Plant Pathology* 1: 83-93.
- 28.) Gusse, A. C., Miller, P. D., Volk, T. J. (2006). White-Rot Fungi Demonstrate First Biodegradation of Phenolic Resin. *Environmental Science & Technology* 40 (13): 4196-4199.
- 29.) Hammel, K. E., Tien, M., Kalyanaraman, B., Kirk, T. K. (1985). Mechanism of Oxidative C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> Cleavage of a Lignin Model Dimer by *Phanerochaete chrysosporium* Ligninase. *The Journal of Biological Chemistry* 260 (14): 8348-8353.
- 30.) Han, S. O., Cho, H.-Y., Yukawa, H., Inui, M., Doi, R. H. (2004). Regulation of Expression of Cellulosomes and Noncellulosomal (Hemi)Cellulolytic Enzymes in *Clostridium cellulovorans* during Growth on Different Carbon Sources. *Journal of Bacteriology* 186 (13): 4218-4227.
- 31.) Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 125-135.
- 32.) Henriksson, G., Ander, P., Pettersson, B., Pettersson, G. (1995). Cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) from *Phanerochaete chrysosporium* as a wood-degrading enzyme. Studies on cellulose, xylan and synthetic lignin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 790-796.

- 33.) Henriksson, G., Zhang, L., Li, J., Ljungquist, P., Reitberger, T., Pettersson, G., Johansson, G. (2000). Is cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* a lignin degrading enzyme? *Biochimica et Biophysica Acta* 1480: 83-91.
- 34.) Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., Martínez, A. T. (2012). Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (4): 1395-1410.
- 35.) Holden, H. M., Rayment, I., Thoden, J. B. (2003). Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 43885-43888.
- 36.) <http://enzyme.expasy.org/> (Datenbank ExPASy Proteomics Server; 30.03.10 / 05.07.13).
- 37.) <http://genome.jgi.doe.gov/Phchr1/Phchr1.info.html#refs> (Datenbank whiterot1 v2.0; 12.10.08 / 05.07.13).
- 38.) <http://genomeportal.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Phchr1> (Datenbank KOG; 12.10.08 / 05.07.13).
- 39.) <http://genomeportal.jgi-psf.org/cgi-bin/metapathways?db=Phchr1> (Datenbank KEGG; 12.10.08 / 05.07.13).
- 40.) <http://genomeportal.jgi-psf.org/cgi-bin/ToGo?species=Phchr1> (Datenbank GO; 12.10.08 / 05.07.13).
- 41.) <http://www.brenda-enzymes.org/> (Datenbank BRENDA; 30.03.10 / 05.07.13).
- 42.) <http://www.uniprot.org/uniprot/> (Datenbank UniProtKB / Swiss-Prot; 12.10.08 / 05.07.13).
- 43.) Jellison, J., Connolly, J., Goodell, B., Doyle, B., Illman, B., Fekete, F., Ostrofsky, A. (1997). The Role of Cations in the Biodegradation of Wood by the Brown Rot Fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39 (2-3): 165-179.
- 44.) Johnson, K. G. (1990). Exocellular  $\beta$ -mannanases from hemicellulolytic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 6: 209-217.
- 45.) Keller, B., Schmid, J., Lamb, C. J. (1989 a). Vascular expression of a bean cell wall glycine-rich protein –  $\beta$ -glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco. *The EMBO Journal* 8 (5): 1309-1314.
- 46.) Keller, B., Templeton, M. D., Lamb, C. J. (1989 b). Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 1529-1533.

- 47.) Kersten, P. J., Kirk, T. K. (1987). Involvement of a New Enzyme, Glyoxal Oxidase, in Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* 169 (5): 2195-2201.
- 48.) Kersten, P. J., Tien, M., Kalyanaraman, B., Kirk, T. K. (1985). The Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Generates Cation Radicals from Methoxybenzenes. *The Journal of Biological Chemistry* 260 (5): 2609-2612.
- 49.) Kersten, P., Cullen, D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genetics and Biology* 44 (2): 77-87.
- 50.) Keyser, P., Kirk, T. K., Zeikus, J. G. (1978). Lignolytic Enzyme System of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in the Absence of Lignin in Response to Nitrogen Starvation. *Journal of Bacteriology* 135 (3): 790-797.
- 51.) Kirk, T. K., Cullen, D. (1998). *Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi*. In: Young, R. A., Akhtar, M. (1998). *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. 1. Auflage. John Wiley & Sons, New York. 273-307.
- 52.) Kirk, T. K., Farrell, R. L. (1987). Enzymatic "Combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.
- 53.) Kuan, I.-C., Johnson, K. A., Tien, M. (1993). Kinetic Analysis of Manganese Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (27): 20064-20070.
- 54.) Lamar, R. T., Dietrich, D. M. (1990). In Situ Depletion of Pentachlorophenol from Contaminated Soil by *Phanerochaete* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (10): 3093-3100.
- 55.) Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M., Rogalski, J. (1999). Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27: 175-185.
- 56.) Li, K. (2003). The Role of Enzymes and Mediators in White-Rot Fungal Degradation of Lignocellulose. In: Goodell, B., Nicholas, D. D., Schultz, T. P. (2003). *Wood Deterioration and Preservation*. American Chemical Society Symposium Series, American Chemical Society. Washington, DC: 196-209.
- 57.) Lyman, E. S., Li, B., Renganathan, V. (1995). Purification and Characterization of a Cellulose-Binding  $\beta$ -Glucosidase from Cellulose-Degrading Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8): 2976-2980.

- 58.) Mäkelä, M., Galkin, S., Hatakka, A., Lundell, T. (2002). Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 542-549.
- 59.) Manimekalai, R., Swaminathan, T. (2000). Removal of hazardous compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Engineering* 22: 29-33.
- 60.) Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D. S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramaiya, P., Detter, J. C., Larimer, F., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., Rokhsar, D. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology* 22 (6): 695-700.
- 61.) Micales, J. A. (1997). Localization and Induction of Oxalate Decarboxylase in the Brown-Rot Wood Decay Fungus *Postia placenta*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39 (2-3): 125-132.
- 62.) Millipore (2007). Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 Centrifugal Filter Devices for volumes up to 15 mL. User Guide. Millipore Corporation, Ireland. 1-20.
- 63.) Moser, M. (1960). Die Gattung *Phlegmacium* (Schleimköpfe). J. Klinkhardt, Bad Heilbrunn, Austria. 1-440.
- 64.) Orth, A. B., Denny, M., Tien, M. (1991). Overproduction of Lignin-Degrading Enzymes by an Isolate of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (9): 2591-2596.
- 65.) Pastusiak, R. (2003). Charakterisierung von Zellstoffkomponenten - Analytik, Spektroskopie, Reaktionskinetik und Modellierung -. Dissertation, Universität München. 1-197.
- 66.) Pease, E., Tien, M. (1992). Heterogeneity and Regulation of Manganese Peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* 174 (11): 3532-3540.
- 67.) Peters, T. (2004). Extrazelluläre Enzyme aus Basidiomyceten. Dissertation, Universität Hannover. 1-155.
- 68.) Pieper, D. H., Winkler, R., Sandermann Jr., H. (1992). Bildung eines toxischen Dimerisierungsproduktes aus 3,4-Dichloranilin durch Lignin-Peroxidase von *Phanerochaete chrysosporium*. *Angewandte Chemie* 104 (1): 60-61.
- 69.) Ravalason, H., Jan, G., Mollé, D., Pasco, M., Coutinho, P. M., Lapierre, C., Pollet, B., Bertaud, F., Petit-Conil, M., Grisel, S., Sigoillot, J.-C., Asther, M., Herpoël-Gimbert, I. (2008). Secretome analysis of *Phanerochaete chrysosporium* strain CIRM-BRFM41 grown on softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80 (4): 719-733.



- 70.) Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. (2006). *Biologie der Pflanzen*. 4. Auflage. de Gruyter, Berlin. 1-942.
- 71.) Renganathan, V., Usha, S. N., Lindenburg, F. (1990). Cellobiose-oxidizing enzymes from the lignocellulose-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: interaction with microcrystalline cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32: 609-613.
- 72.) Sato, S., Feltus, F. A., Iyer, P., Tien, M. (2009). The first genome-level transcriptome of the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on red oak. *Current Genetics* 55: 273-286.
- 73.) Sato, S., Liu, F., Koc, H., Tien, M. (2007). Expression analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on different liquid and solid substrates. *Microbiology* 153: 3023-3033.
- 74.) Schmidt, O. (2006). *Wood and Tree Fungi. Biology, Damage, Protection, and Use*. 1. Auflage. Springer, New York. 273-307.
- 75.) Servent, D., Ducrocq, C., Henry, Y., Guissani, A., Lenfant, M. (1991). Nitroglycerin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*: evidence for nitric oxide and nitrite formation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1074: 320-325.
- 76.) Shanley, N. A., van den Broek, L. A. M., Voragen, A. G. J., Coughlan, M. P. (1993). Isolation and characterization of an endopolygalacturonase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology* 28: 179-197.
- 77.) Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry* 68 (5): 850-858.
- 78.) Singh, D., Chen, S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 399-417.
- 79.) Staszczak, M., Nowak, G., Grzywnowicz, K., Leonowicz, A. (1996). Proteolytic activities in cultures of selected white-rot fungi. *Journal of Basic Microbiology* 36 (3): 193-203.
- 80.) Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A. F. W. (begr.); Sitte, P., Weiler, E. W., Kadereit, J. W., Bresinsky, A., Körner, C. (neubearb.) (2002). *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. 35. Auflage. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg. 1-1123.

- 81.) Szakács Dobozi, M., Szakács, G., Bruschi, C. V. (1992). Xylanase Activity of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (11): 3466-3471.
- 82.) Takada, S., Nakamura, M., Matsueda, T., Kondo, R., Sakai, K. (1996). Degradation of Polychlorinated Dibenzo- $\rho$ -Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans by the White Rot Fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (12): 4323-4328.
- 83.) Thelen, R. (1996). Anzucht und Einsatz von *Phanerochaete chrysosporium* (Weißfäulepilz) - Abbau von Abwasserinhaltsstoffen. *Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie* 8 (1): 16-22.
- 84.) Tien, M., Kirk, T. K. (1988). Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* 161: 238-249.
- 85.) Valli, K., Brock, B. J., Joshi, D. K., Gold, M. H. (1992). Degradation of 2,4-Dinitrotoluene by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (1): 221-228.
- 86.) Valli, K., Gold, M. H. (1991). Degradation of 2,4-Dichlorophenol by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* 173 (1): 345-352.
- 87.) van Rensburg, H., Anterola, A. M., Levine, L. H., Davin, L. B., Lewis, N. G. (2000). Monolignol Compositional Determinants in Loblolly Pine: Aromatic Amino Acid Metabolism and Associated Rate-Limiting Steps. In: Glasser, W. G., Northey, R. A., Schultz, T. P. (1999). *Lignin: Historical, Biological, and Materials Perspectives*. American Chemical Society. Washington, DC: 118-144.
- 88.) Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2. Auflage. Cornell University Press, United States of America. 1-463.
- 89.) Wymelenberg, A. V., Gaskell, J., Mozuch, M., BonDurant, S. S., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., Mansfield, S. D., Blanchette, R. A., Grigoriev, I. V., Kersten, P. J., Cullen, D. (2011). Significant Alteration of Gene Expression in Wood Decay Fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by Plant Species. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (13): 4499-4507.
- 90.) Wymelenberg, A. V., Gaskell, J., Mozuch, M., Kersten, P., Sabat, G., Martinez, D., Cullen, D. (2009). Transcriptome and Secretome Analyses of *Phanerochaete chrysosporium* Reveal Complex Patterns of Gene Expression. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (12): 4058-4068.

- 91.) Wymelenberg, A. V., Gaskell, J., Mozuch, M., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., Mansfield, S. D., Blanchette, R. A., Martinez, D., Grigoriev, I., Kersten, P. J., Cullen, D. (2010). Comparative Transcriptome and Secretome Analysis of Wood Decay Fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (11): 3599-3610.
- 92.) Wymelenberg, A. V., Minges, P., Sabat, G., Martinez, D., Aerts, A., Salamov, A., Grigoriev, I., Shapiro, H., Putnam, N., Belinky, P., Dosoretz, C., Gaskell, J., Kersten, P., Cullen, D. (2006). Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins. *Fungal Genetics and Biology* 43 (5): 343-356.
- 93.) Wymelenberg, A. V., Sabat, G., Martinez, D., Rajangam, A. S., Teeri, T. T., Gaskell, J., Kersten, P. J., Cullen, D. (2005). The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: Database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. *Journal of Biotechnology* 118 (1): 17-34.
- 94.) Yano, T., Ashida, S., Tachiki, T., Kumagai, H., Tochikura, T. (1991 a). Development of a Soft Gel Cultivation Method. *Agricultural and Biological Chemistry* 55 (2): 379-385.
- 95.) Yano, T., Ashida, S., Tachiki, T., Kumagai, H., Tochikura, T. (1991 b). Production and Localization of Enzymes on Soft Gel Cultivation. *Agricultural and Biological Chemistry* 55 (2): 387-391.
- 96.) Yoshida, M., Igarashi, K., Kawai, R., Aida, K., Samejima, M. (2004). Differential transcription of  $\beta$ -glucosidase and cellobiose dehydrogenase genes in cellulose degradation by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters* 235 (1): 177-182.
- 97.) Young, H. E., Guinn, V. P. (1966). Chemical elements in complete mature trees of seven species in Maine. *Technological Association of the Pulp and Paper Industry* 49: 190-195.

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Anordnung der Cellulose in der Zellwand der Pflanzen (verändert nach Raven et al. 2006).....	5
Abb. 1.2:	Struktur des Lignins (Strasburger et al. 2002) .....	5
Abb. 1.3:	Schema des extrazellulären Cellulose-Abbausystems bei <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (verändert nach Renganathan et al. 1990, Yoshida et al. 2004) .....	8
Abb. 1.4:	Extrazelluläres Lignin-Depolymerisationssystem unter Beteiligung der Lignin-Peroxidase bei <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (verändert nach Kersten et al. 2007, Singh et al. 2008) .....	9
Abb. 1.5:	Fließschema des extrazellulären Ligninabbaus durch die MnP bei <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (verändert nach Kersten et al. 2007, Singh et al. 2008) .....	10
Abb. 1.6:	Extrazelluläres Hemicellulose-Abbausystem bei <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (verändert nach Schmidt 2006) .....	11
Abb. 1.7:	Hypothetisches Schema des Lignocellulose-Abbaus bei Weißfäulepilzen (verändert nach Leonowicz et al. 1999, Peters 2004) .....	12
Abb. 1.8:	Pektin-Abbau bei <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	14
Abb. 3.1:	Flüssigkulturen im Kulturschrank bei 37°C und Wasser gesättigtem Sauerstoff ..	20
Abb. 3.2:	Für den Protein-in-Gel-Verdau verwendete, selbst hergestellte Reaktionsgefäße.	22
Abb. 4.1:	Für die Festkultur verwendete Polypropylen-Wachstumsbeutel (links) und Fermentation im Glasgefäß (rechts).....	24
Abb. 4.2:	Festkultur im Polypropylen-Wachstumsbeutel, der vom Pilz abgebaut wurde (siehe Markierung).....	24
Abb. 4.3:	Temperaturspanne während der 1. Anzucht von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> im Kulturkolben (21.08.-26.08.2008).....	26
Abb. 4.4:	Temperaturspanne während der 1. Anzucht von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> im Kulturschrank (21.08.-26.08.2008).....	26
Abb. 4.5:	Temperaturspanne während der biologischen Reproduktion von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> im Kulturkolben (19.02.-11.03.2009).....	26
Abb. 4.6:	Temperaturspanne während der biologischen Reproduktion von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> im Kulturschrank (19.02.-11.03.2009) .....	27
Abb. 4.7:	1D-PAGE der extrazellulären Proteine von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> der Flüssigkultur mit Rotbuchen-Holzpuder (Tasche 2, 6) bzw. Fichten-Holzpuder (Tasche 4, 8), 1 bzw. 3 Wochen angezchtet, und eine Leerkontrolle mit Stickstoff-Glucose-Mangelmedium, Holzpuder und ohne Mycel (Tasche 9). Coomassie Blau-Färbung, MW = Molekulargewicht in kDa (Tasche 1) .....	28
Abb. 4.8:	1D-PAGE der extrazellulären Proteine von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> aus der Flüssigkultur mit Holzpuder (Rotbuche und Fichte) und Stickstoff-Glucose-Mangelmedium (Tasche 2, 3, 6, 7), Flüssigkultur mit Holzpuder und Stickstoff-Glucose-Medium (Tasche 4, 5) und eine Leerkontrolle mit Stickstoff-Glucose-Mangelmedium, Holzpuder und ohne Mycel (Tasche 8, 9). Das Gel wurde mit Coomassie Blau gefärbt. MW = Molekulargewicht in kDa (Tasche 1).....	29
Abb. 4.9:	Fließschema der Identifizierung der Proteine mit Hilfe von Genom- und Proteindatenbanken .....	32
Abb. 4.10:	Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder 1 und 3 Wochen angezchtet) je Datenbank (KEGG, ExPASy, KOG, GO, SwissProt und whiterot) .....	33

Abb. 4.11: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder 1 und 3 Wochen angezuchtet) für die Datenbank KEGG .....	34
Abb. 4.12: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder 1 und 3 Wochen angezuchtet) für die Datenbank ExPASy .....	35
Abb. 4.13: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder 1 und 3 Wochen angezuchtet) für die Datenbank KOG.....	35
Abb. 4.14: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder 1 und 3 Wochen angezuchtet) für die Datenbank GO .....	36
Abb. 4.15: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder 1 und 3 Wochen angezuchtet) für die Datenbank SwissProt .....	37
Abb. 4.16: Verteilung der identifizierten Proteine der 10 Datensätze (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion jeweils über Rotbuchen- und Fichten-Holzpuder 1 und 3 Wochen angezuchtet) für die Datenbank whiterot.....	37
Abb. 4.17: Zusammengefasster funktioneller Proteomdatensatz von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> über Fichten-Holzpuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen .....	38
Abb. 4.18: Zusammengefasster funktioneller Proteomdatensatz von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> über Rotbuchen-Holzpuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen .....	39
Abb. 4.19: Zusammengefasster funktioneller Proteomdatensatz von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> über Fichten- und Rotbuchen-Holzpuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen im Vergleich .....	39
Abb. 4.20: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion zusammengefasst) .....	40
Abb. 4.21: Proteom über Fichten-Holzpuder (1. Anzucht, biologische und technische Reproduktion zusammengefasst) .....	41
Abb. 4.22: Proteom von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> über Fichten- und Rotbuchen-Holzpuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen im Vergleich.....	42
Abb. 4.23: Cellulolytische, hemicellulolytische, ligninolytische, Pektin und Chitin abbauende Proteine, Proteasen und nicht beschriebene Proteine von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> über Fichten- und Rotbuchen-Holzpuder der 1. Anzucht und der beiden Reproduktionen im Vergleich .....	43
Abb. 4.24: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (1. Kultivierung).....	44
Abb. 4.25: Proteom über Fichten-Holzpuder (1. Kultivierung).....	49
Abb. 4.26: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (biologische Reproduktion, 1 Woche Anzucht).....	55
Abb. 4.27: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (biologische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht).....	60
Abb. 4.28: Proteom über Fichten-Holzpuder (biologische Reproduktion, 1 Woche Anzucht).....	65
Abb. 4.29: Proteom über Fichten-Holzpuder (biologische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht) .....	70
Abb. 4.30: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (technische Reproduktion, 1 Woche Anzucht) .....	75
Abb. 4.31: Proteom über Rotbuchen-Holzpuder (technische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht).....	81
Abb. 4.32: Proteom über Fichten-Holzpuder (technische Reproduktion, 1 Woche Anzucht). .....	87

Abb. 4.33: Proteom über Fichten-Holzpuder (technische Reproduktion, 3 Wochen Anzucht)	92
Abb. 5.1: Modifiziertes Schema des extrazellulären Cellulose-Abbausystems bei <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	97
Abb. 5.2: Modifiziertes Schema des extrazellulären Hemicellulose-Abbausystems bei <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	98
Abb. 5.3: Extrazelluläres Pektin-Abbausystem bei <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	99
Abb. 5.4: Hypothetisches Schema des kooperierenden Lignin-, Cellulose-, Hemicellulose- und Pektinabbaus von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> auf der Grundlage des Lignocellulose-Abbauschemas bei Weißfäulepilzen nach Leonowicz et al. (1999), Henriksson et al. (2000) und Peters (2004)	100

## 10. Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1:	Extrazellulärer Proteinkomplex über Rotbuchen-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet.....	45
Tab. 4.2:	Extrazellulärer Proteinkomplex über Fichten-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet.....	50
Tab. 4.3:	Extrazellulärer Proteinkomplex über Rotbuchen-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet.....	56
Tab. 4.4:	Extrazellulärer Proteinkomplex über Rotbuchen-Holzpuder, 3 Wochen angezüchtet.....	61
Tab. 4.5:	Extrazellulärer Proteinkomplex über Fichten-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet.....	66
Tab. 4.6:	Extrazellulärer Proteinkomplex über Fichten-Holzpuder, 3 Wochen angezüchtet.....	71
Tab. 4.7:	Extrazellulärer Proteinkomplex über Rotbuchen-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet.....	76
Tab. 4.8:	Extrazellulärer Proteinkomplex über Rotbuchen-Holzpuder, 3 Wochen angezüchtet.....	82
Tab. 4.9:	Extrazellulärer Proteinkomplex über Fichten-Holzpuder, 1 Woche angezüchtet.....	88
Tab. 4.10:	Extrazellulärer Proteinkomplex über Fichten-Holzpuder, 3 Wochen angezüchtet.....	93

## 11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ewald Langer danke ich für die Überlassung des interessanten und interdisziplinären Themas, die Unterstützung sowie Diskussionsbereitschaft und das ständige Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Friedrich W. Herberg für die sehr gute Kooperation und seine konstruktiven Diskussionen.

Der Universität Kassel danke ich für die Finanzierung durch das Promotionsstipendium.

Ein großer Dank gilt Dr. Susanne Hanke für ihre Unterstützung, die hilfreichen Diskussionen und vielen Tipps und Tricks im Labor, ihre Motivation, methodische Anleitung und die zahlreichen kritischen Ratschläge.

Oliver Bertinetti danke ich sehr für die Messungen am Massenspektrometer und seine methodischen Hilfestellungen im Labor.

Bei Dr. Daniela Bertinetti, Dr. Matthias Gube, Dr. Gitta Langer, Dr. Anke Prinz, Dr. Alexandra Riethmüller, Flavius Popa und Malte Zirpel bedanke ich mich für ihr Interesse an meiner Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Biochemie möchte ich für das freundliche Arbeitsklima und die Unterstützung im Labor danken.

Herrn Prof. Dr. Kurt Weising und der Abteilung Botanik danke ich für die freundliche Aufnahme und die Benutzung des Labors.

Dr. Horst Koenies gilt mein großer Dank für seine Unterstützung, das Korrekturlesen, die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen kritischen Anregungen.

Den biologisch-technischen Assistentinnen Carola Weißkopf, Ulrike Frieling, Inge Aufenanger und Sylvia Heinemann sowie den technischen Kräften Barbara Janas und Anna



Koik danke ich sehr für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor. Durch ihre herzliche und fröhliche Art sorgten sie für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dr. Clovis Douanla-Meli, Dr. Anna Magdalena Barniske, Fee Becker, Anna Kuntzsch, Janett Riebesehl und Robin Schwerbrock gilt ebenso mein Dank für die freundliche Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe.

Auch Manuela Roth möchte ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, ihre konstruktive Kritik und erfrischende Art und gute Laune danken.

Weiterhin danke ich Christian Rau, Manuel Punzet und Lievin Mugabushaka für die Hilfe bei der Lösung technischer Probleme, Erklärung von Access und der Beratung zur Auswertung riesiger Datensätze.

Kerstin Polikowski und Martina Strauß möchte ich für ihre Hilfe bei vielen Problemen des Computer-Alltages und organisatorischen Dingen danken.

Besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern für ihre vielfältige Unterstützung und ihr Verständnis über all die Jahre, ohne die meine Promotion schwer möglich gewesen wäre.

## **12. Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe Dritter angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Dritte waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Dissertation nicht beteiligt; insbesondere habe ich hierfür nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Torsten Bernauer