

**Charakterisierung des MATE-Transporters Mte1 und
Etablierung eines Transformationssystems für den
Ektomykorrhiza-Pilz *Tricholoma vaccinum***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

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

von
Dipl.-Troph. **Ines Schlunk**
geboren am 23.11.1978 in Zittau

Jena, Dezember 2010

Gutachter

1. Prof. Dr. Erika Kothe, Friedrich Schiller Universität Jena
2. Prof. Dr. Axel A. Brakhage, Hans-Knöll-Institut Jena
3. Prof. Dr. Uwe Nehls, University of Bremen

Tag der öffentlichen Disputation: 16.05.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung/ Summary	1
2. Einleitung	5
3. Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Chemikalien, Medien, Lösungen und Enzyme	19
3.1.2 Oligonukleotide	19
3.1.3 Stämme und Plasmide	20
3.2 Methoden	22
3.2.1 Arbeiten mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
3.2.1.1 Anzucht	22
3.2.1.2 Plasmidisolierung	22
3.2.2 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	23
3.2.2.1 Anzucht	23
3.2.2.2 Transfektion	23
3.2.2.3 Plasmidisolierung	24
3.2.2.4 Mikrodilutionstest	25
3.2.3 Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.2.3.1 Anzucht	25
3.2.3.2 Transformation mit Lithiumacetat	26
3.2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe	26
3.2.3.4 Indirekte Immunfluoreszenz	27
3.2.3.5 Drop-Test	27
3.2.3.6 Agardiffusionstest	28
3.2.3.7 Bestimmung der Glutathionkonzentration	28
3.2.4 Arbeiten mit Basidiomyceten	28
3.2.4.1 Anzucht von <i>Schizophyllum commune</i>	28
3.2.4.2 Anzucht von <i>Tricholoma</i> sp.	29
3.2.4.3 In vitro Mykorrhiza-Synthese	29
3.2.4.4 Anfertigen von Dünnschnitten	30
3.2.4.5 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte Transformation von <i>Tricholoma</i> sp.	30
3.2.4.6 Visualisierung der Transportereffluxaktivität	31
3.2.4.7 Präparation genomischer DNA	31
3.2.4.7.1 Schnellisolierung genomischer DNA	31
3.2.4.7.2 Isolierung genomischer DNA mit CTAB	31
3.2.4.8 Isolierung von Gesamt-RNA	32
3.2.4.9 Synthese von cDNA	33
3.2.4.10 Untersuchung der Genexpression durch Mikroarray-Analyse	33
3.2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren	34
3.2.5.1 Messung der Nukleinsäurekonzentration	34
3.2.5.2 Gelelektrophorese	34
3.2.5.3 Restriktion von DNA	34
3.2.5.4 Klonierung	35
3.2.6 Amplifizierung von DNA	35
3.2.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
3.2.6.2 Thermal Asymmetric InterLaced-PCR (TAIL-PCR)	36
3.2.6.3 3`Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR (3`RACE-PCR)	37
3.2.6.4 RNA Ligase-Mediated-RACE-PCR (RLM-RACE)	37
3.2.7 DNA-DNA-Hybridisierung	38
3.2.7.1 Herstellen DIG-markierter Sonden	38
3.2.7.2 Southern-Blot	38
3.2.8 Sequenzierung, <i>In silico</i> - und phylogenetische Analysen	39

4. Ergebnisse	41
4.1 Untersuchung von <i>mte1</i> aus <i>Tricholoma vaccinum</i>	41
4.1.1 Isolierung und Charakterisierung von <i>mte1</i> aus <i>T. vaccinum</i>	41
4.1.2 Phylogenetische Analyse	44
4.1.3 Anzahl der MATE-Gene im Genom von <i>T. vaccinum</i>	48
4.1.4 Expression in <i>Escherichia coli</i>	49
4.1.5 Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
4.1.5.1 Charakterisierung der MATE-Transporter von <i>S. cerevisiae</i>	51
4.1.5.2 Expression von <i>mte1</i>	53
4.1.5.3 Untersuchung des Substratspektrums des heterolog in <i>S. cerevisiae</i> exprimierten Gens <i>mte1</i>	54
4.1.6 Transportmechanismus von Mte1	59
4.2 Induktion der Transporteraktivität bei <i>T. vaccinum</i> und <i>Schizophyllum commune</i>	60
4.3 Gene der MATE-Familie von <i>S. commune</i>	62
4.4 Genexpression in <i>S. commune</i> unter Stressbedingungen	66
4.5 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte Transformation (ATMT) von <i>Tricholoma</i> sp.	68
4.5.1 Etablierung des Transformationsystems	68
4.5.2 Untersuchung der <i>T. vaccinum</i> -Transformanten	70
4.5.3 Mitotische Stabilität	72
4.5.4 Expression von <i>egfp</i>	74
4.5.5 Mykorrhizierungsverhalten der Transformanten	75
5. Diskussion	78
5.1 Charakterisierung von MATE-Transporterproteinen aus Pilzen	78
5.1.1 Das Gen <i>mte1</i> aus <i>Tricholoma vaccinum</i>	78
5.1.2 Phylogenetische Analyse der pilzlichen MATE-Transporter	90
5.1.3 <i>In vitro</i> Adaption an Fungizide	93
5.1.4 Die MATE-Transporter von <i>Schizophyllum commune</i>	94
5.2 Genexpression unter Fungizidexposition	96
5.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte Transformation	99
5.4 Ausblick	104
6. Literaturverzeichnis	107
7. Abkürzungsverzeichnis	116
Selbstständigkeitserklärung	
Danksagung	
Anhang	

1. Zusammenfassung

Die Ektomykorrhiza ist vor allem in den borealen Laub- und Nadelwäldern weit verbreitet und bietet als mutualistische Symbiose beiden Interaktionspartnern Vorteile. Untersuchungen zu den molekularbiologischen Prozessen wurden in den letzten Jahren vermehrt durchgeführt und rücken immer weiter in den Vordergrund. Der mit der Interaktion einhergehende Nutzen für den Baum wurde bei einigen Ektomykorrhiza-Symbiosen beschrieben, darunter eine höhere Toleranz gegenüber Schwermetallen und anderen Stressoren. Zudem sind Pilze im Allgemeinen in der Lage, erhöhte Konzentrationen an Schwermetallen zu tolerieren. Die Mechanismen, die zu dieser Toleranz führen, sind bisher kaum bekannt und wurden weitestgehend an nicht-mykorrhizierenden Pilzen untersucht. Die Isolierung und Charakterisierung eines Gens der „Multidrug and toxic compound extrusion“ (MATE)-Familie aus dem Basidiomyceten *Tricholoma vaccinum*, *mte1*, konnte einen Teil zur Aufklärung des Mechanismus beitragen. Dieses Gen war in der Symbiose mit seinem kompatiblen Interaktionspartner Fichte (*Picea abies*) differentiell exprimiert. Durch die heterologe Expression von *mte1* in *Saccharomyces cerevisiae* wurde das Substratspektrum des Transporters ermittelt, wobei neben Metallen und Schwermetallen auch verschiedene Xenobiotika wie DNA-interkalierende Farbstoffe und Fungizide identifiziert werden konnten. Zudem konnte für Kupfer gezeigt werden, dass ein Transport von Glutathion-Konjugaten über Mte1 möglich ist. Ebenso kann Mte1 auch Sekundärmetabolite anderer bodenbewohnender Organismen transportieren und ist in der Lage, antibiotisch wirksame Monoterpene aus dem Harz der Fichtenwurzel zu detoxifizieren. Somit scheint *mte1* auch an der Umgehung der pflanzlichen Abwehrreaktion beim Kontakt mit dem potentiellen Symbiosepartner beteiligt zu sein. Für eine weitergehende Analyse im homologen System wurde ein auf *Agrobacterium tumefaciens* basierendes Transformationssystem für *T. vaccinum* und *T. terreum* etabliert. Sowohl das eingebrachte Markergen als auch das Reportergen konnten unter dem heterologen *gpd*-Promotor von *Agaricus bisporus* exprimiert werden. Die Transformanten zeigten keine phänotypischen Veränderungen, waren mitotisch stabil und konnten mit ihrem kompatiblen Interaktionspartner eine voll ausgeprägte Symbiose eingehen.

Außerdem wurden zwei MATE-Paraloga von dem Weißfäuleerreger *Schizophyllum commune* näher untersucht. Die Sequenz des Gens *mte1* aus dem sequenzierten *S. commune*-Stamm H4-8 wurde mit der *mte1*-Sequenz anderer *S. commune*-Stämme verglichen, wobei eine größere Sequenzheterogenität bei einigen Stämmen beobachtet wurde. Das Protein Mte2 aus *S. commune* wurde hinsichtlich seiner Sequenz untersucht.

Andere MATE-Gene von Pilzen sind bisher nicht detailliert untersucht worden. Eine phylogenetische Analyse von MATEs aus sequenzierten Pilzgenomen und untersuchten bakteriellen, humanen und pflanzlichen MATE-Proteinen zeigte, dass die pilzlichen MATEs als eigenständige Gruppe in drei Untergruppen clustern, eine Ascomyceten-spezifische, eine Basidiomyceten-spezifische sowie eine allgemein pilzliche Gruppe. Sowohl Mte1 aus *T. vaccinum* als auch Mte1 aus *S. commune* gehören der Basidiomyceten-spezifische Gruppe an, wohingegen Mte2 aus *S. commune* der Ascomyceten-spezifischen Gruppe angehört. Eine Induktion der Transporteraktivität in *T. vaccinum* und *S. commune* wurde durch eine schrittweise Adaption des Myzels an ein Epoxiconazol- bzw. ein Strobilurin-Fungizid erreicht. Der Transporterefflux konnte mikroskopisch durch Färbungen mit den DNA-interkalierenden Farbstoffen Ethidiumbromid und Hoechst33342 visualisiert werden. Zudem konnten hochregulierte bzw. reprimierte Gene im adaptierten Stamm von *S. commune* unter Fungizidexposition in Microarray-Analysen identifiziert werden. Ein Vergleich mit Myzel, welches auf Medium mit Cadmium bzw. mit Schwermetallen belasteten Haldensickerwasser inkubiert wurde, ergab eine geringe Anzahl von Genen, die als stressrelevant exprimiert angesehen werden können.

Summary

Ectomycorrhiza as an mutualistic symbiosis, which is widely distributed in boreal deciduous and coniferous forests, provides advantages for both partners. Investigations of the molecular background were increasingly done the last years and will be more famous in the future. Benefits for the tree partner are known from some ectomycorrhizas and comprise a tolerance against heavy metals and other stresses. Furthermore, most fungi are able to grow on heavy metal containing soil. Mechanisms for tolerance are not well known at the moment and were studied mostly on non-mycorrhizal fungi. The isolation and characterization of a gene of the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family of the basidiomycete *Tricholoma vaccinum*, *mte1*, which was higher expressed in the symbiotic tissue with its host spruce (*Picea abies*), allows new insights into metal detoxification. Heterologous expression of *mte1* in *Saccharomyces cerevisiae* revealed a broad substrate spectrum including different metals and heavy metals as well as xenobiotics as DNA intercalating dyes and fungicides. Moreover, Mte1 was able to detoxify copper ions through an efflux of glutathione conjugates. It was also shown that Mte1 could transport secondary metabolites of other soil growing organisms and detoxify resin monoterpenes with antibiotic activity of *Picea abies*. Therefore, Mte1 seems to be involved in the avoidance of plant defence reaction, when getting in contact with its host. For further investigations of *mte1* a transformation system based on *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transfer was established for *T. vaccinum* and *T. terreum*. The marker gene and the reporter construct were expressed under the control of the heterologous *gpd* promoter of *Agaricus bisporus*. The transformants showed no phenotypically differences, were mitotically stable and could form a complete ectomycorrhiza.

Two MATE paralogs of the white rot fungus *Schizophyllum commune* were also investigated. Sequence of *mte1* of *S. commune* strain H4-8 was compared to sequences of other *S. commune* strains in order to detect sequence heterogeneity, which was shown in some cases. The sequence of the second MATE protein, Mte2, was also investigated.

Other fungal MATEs are not investigated yet in detail. A phylogenetic analysis of MATEs derived from fungal genomes and still investigated bacterial, human and plant MATEs showed that they clustered together as a fungal group with three subgroups, an ascomycetes specific, a basidiomycetes specific and a group with MATEs of all fungal phyla. Mte1 of *T. vaccinum* as well as Mte1 of *S. commune* belong to the basidiomycetes specific group and Mte2 of *S. commune* is a protein of the group with MATEs of all fungal phyla

Induction of transporter activity in *T. vaccinum* and *S. commune* was done by stepwise adaptation of mycelia to an epoxiconazole and a strobilurine fungicide. Transporter efflux activity could be detected by staining adapted hyphae with DNA intercalating dyes as

ethidium bromide and Hoechst33342. In addition, up or down regulated genes in the adapted strain under fungicide exposure were identified in microarray analysis. The comparison of expressed genes under cadmium stress or growth on contaminated waste water revealed a small amount of genes generally stress regulated.

2. Einleitung

Pilze sind Organismen, die sich durch ihre Vielseitigkeit und eine ubiquitäre Verbreitung auszeichnen. Sie werden in der Forschung als Modellorganismen für die Untersuchung zellbiologischer und genetischer Fragestellungen und zur Herstellung von Metaboliten und Proteinen herangezogen. Die Erforschung grundlegender molekularbiologischer Mechanismen dient u.a. dem besseren Verständnis der Organisation und der Lebensbedingungen der Pilze und deren Einfluss auf das Ökosystem. Ein wichtiger Bestandteil des Ökosystems ist dabei die mutualistische Symbiose zwischen Pflanzenwurzeln und Pilzen, die Mykorrhiza, die erstmals 1885 von Frank unter diesen Namen beschrieben wurde. Sie ist gekennzeichnet durch den Stoffaustausch zwischen beiden Partnern, wobei der Pilz mit Photoassimilaten und Vitaminen von der Pflanze versorgt wird, andererseits der Pilz der Pflanze Bodenminerale, Wasser sowie Stickstoff- und Phosphatverbindungen liefert. Desweiteren profitiert die Pflanze vom Pilz, indem sie eine höhere Toleranz gegenüber Trockenheit, Phytopathogenen und Schwermetallstress aufweist (Smith & Read, 2008). Die Hyphen des Pilzes dringen in die Wurzel ein und je nachdem, welche Partner an der Symbiose beteiligt sind, verbleiben sie im Apoplasten und formen die Ektomykorrhiza, oder dringen direkt in die Pflanzenzellen ein und bilden eine Endomykorrhiza aus. Desweiteren gibt es auch Zwischenformen, die Ektendomykorrhizen, bei denen die typischen Merkmale der Ekto- und Endomykorrhiza in Kombination auftreten. Die Ektomykorrhiza, an der Pilze, v.a. der Basidiomycota aber auch einige Asco- und Zygomyceten beteiligt sind, tritt hauptsächlich bei Bäumen und Sträuchern der gemäßigten Zone auf und ist für ca. 8000 Pflanzen beschrieben worden. Obwohl nur ein kleiner Anteil der Pflanzen eine Ektomykorrhiza ausbilden kann, stellt sie aufgrund der weitläufigen Verbreitung und der großen Biomasse eine bedeutende Form des Zusammenlebens von Pflanzen und Pilzen dar (Martin *et al.*, 2007). Pilze der Ektomykorrhiza können entweder als Generalisten eine Vielzahl von Bäumen als Partner wählen oder sind als Spezialisten auf einen Wirt festgelegt. Zu den Letzteren zählt der Basidiomycet *Tricholoma vaccinum*, der Bärtige Ritterling, der mit seinem kompatiblen Wirt Fichte (*Picea abies*) eine Symbiose ausbildet (Molina *et al.*, 1992). Zudem ist er als Spätbesiedler in der Natur an der Mykorrhizierung älterer, bereits mit anderen Pilzen assoziierter Bäume beteiligt. Die Ausbildung von Fruchtkörpern kann nur im symbiotischen Zustand mit dem kompatiblen Partner erreicht werden und ist unter Laborbedingungen, wie bei den meisten Ektomykorrhiza-Pilzen, kaum nachvollziehbar (Trappe, 1962). Das Myzel von *T. vaccinum* kann aber saprophytisch auf geeigneten Nährmedien wachsen, so dass er als Modellorganismus für die Erforschung molekularbiologischer Ereignisse während der Ektomykorrhiza-Ausbildung dient.

Die typischen Strukturen der Ektomykorrhiza sind der Hyphenmantel um die Kurzwurzeln der Pflanze und das Hartig'sche Netz im Interzellularraum der kortikalen Zellen (Abb. 2.1).

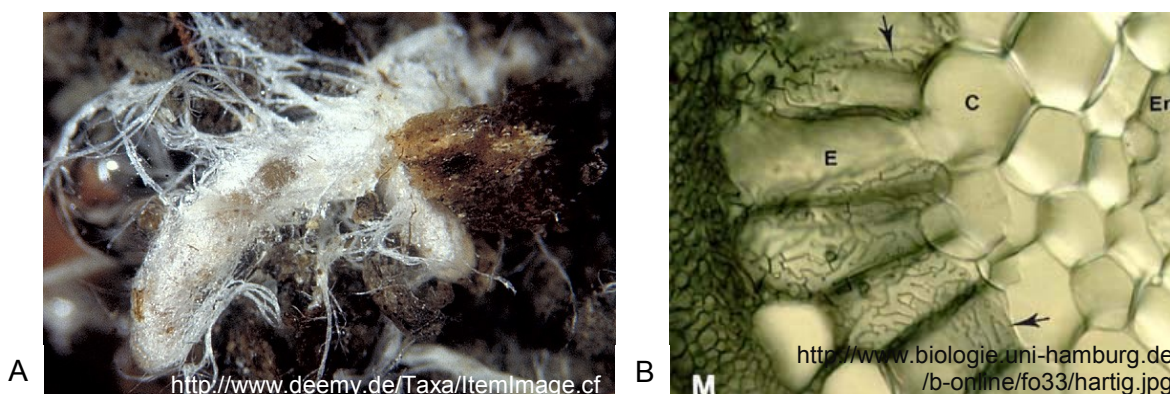


Abb 2.1 Merkmale der Ektomykorrhiza

Die Ektomykorrhiza zwischen *Tricholoma vaccinum* und *Picea abies* führt zu Ausbildung eines dichten, weißen Mantels, von dem viele Rhizomorphen abgehen (A). Der Querschnitt durch eine mykorrhizierete *Pinus strobus*-Kurzwurzel zeigt die typischen Merkmale der Symbiose (B). M = Mantel, E = Epidermale Zellen, C = Cortex, En = Endodermis.

Die Exkretion verschiedener Moleküle und flüchtiger Substanzen durch die Pflanzenwurzel bewirkt eine Chemoattraktion der Hyphen, die sich daraufhin vergrößern und verstärkt verzweigen (Fries *et al.*, 1987; Horan & Chilvers, 1990; Weiss *et al.*, 1997). Die verzweigten Hyphen bilden Aggregate, heften sich an die Wurzeloberfläche der Kurzwurzeln an und bilden eine pseudoparenchymatische Struktur, den Mantel aus (Kottke & Oberwinkler, 1986). Dieser kann bei verschiedenen Symbiosepartnern in der Anordnung der Hyphen, der Bildung verschiedener Hyphenschichten und hinsichtlich seiner Farbe variieren, so dass er ein charakteristisches Merkmal bei der Bestimmung von Ektomykorrhizen darstellt (Agerer, 1987-2002). Die Hyphen isolieren damit die Kurzwurzeln und übernehmen die Funktion der Wurzelhaare. Durch die weite Verbreitung des Myzels im Boden und durch den geringen Hyphendurchmesser im Vergleich zu einer Pflanzenwurzel können sie Nährstoffe und Wasser aus weiter entfernt liegenden Regionen mobilisieren und zur Pflanze transportieren. Zudem vernetzen sie verschiedene Pflanzen durch die Bildung weiterer Ektomykorrhizen miteinander (Smith & Read, 2008).

Durch Veränderungen an der Zellwand des Pilzes und der Pflanze dringen die Hyphen anschließend in die Wurzel ein und formen das Hartig'sche Netz aus (Barker *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999). Die Hyphen des Hartig'schen Netzes sind stark verzweigt und bilden die Verbindungstelle zwischen Pflanze und Pilz, an welcher der Nährstoffaustausch stattfindet. Einige Proteine, die an der Nährstoffaufnahme und dem Austausch beteiligt sind, wurden bereits beschrieben und geben Einblicke in die molekularen Mechanismen. So haben Untersuchungen gezeigt, dass bei einer bestehenden Symbiose vermehrt Kohlenhydrate von

der Pflanze in die Wurzel transportiert werden und dass die Abgabe in Form von Saccharose in den Apoplast erfolgt. Die Pilzzelle kann das Disaccharid jedoch nicht aufnehmen, deshalb erfolgt eine Hydrolyse in Glucose und Fruktose, die durch eine pflanzliche Invertase katalysiert wird. Die anschließende Aufnahme der Hexosen erfolgt über Monosaccharid-Importer, wobei Glucose von der Pilzzelle bevorzugt aufgenommen wird und der Import von Fruktose reduziert ist (Nehls *et al.*, 2010). Zudem konnten wichtige Erkenntnisse über die Stickstoffaufnahme der Pilze aus dem Boden und der Umwandlung in der Zelle gewonnen werden. Sowohl Nitrat, Ammonium, Aminosäuren, Dipeptide als auch Oligopeptide dienen als Stickstoffquelle und werden über spezifische Transporter von der Pilzzelle aufgenommen. Enzyme des Pilzes wandeln diese Verbindungen in Peptide und Ammonium um, die als mögliche Transportformen von Stickstoff in Frage kommen (Müller *et al.*, 2007). Die genauen Mechanismen der Aufnahme von Stickstoffverbindungen in die Pflanze sind bislang nicht geklärt, Untersuchungen konnten jedoch die erhöhte Expression eines pflanzlichen Aminosäuretransporters in mykorrhizierten Wurzeln durch die Analyse von „expressed sequence tags“ (ESTs) identifizieren (Couturier *et al.* 2010). Für die Aufnahme von Wasser stehen der Pflanze u.a. Aquaporine zur Verfügung, von denen einige in der Mykorrhiza höher exprimiert sind und deren Wassertransportvermögen zudem in der Assoziation mit dem Pilz ansteigt (Marjanović *et al.*, 2005). Neuere Untersuchungen widmen sich auch der Analyse von Genen, die spezifisch in der Ektomykorrhiza exprimiert werden. Die Analyse der Genexpression in den Interaktionen von *Betula pendula* mit *Paxillus involutus* sowie *Eucalyptus globulus* mit *Pisolithus microcarpus* ergab bei der Kolonisierung des Wirts eine vermehrte Expression von Genen der Zellwandsynthese, der Abwehr und des Stresses in beiden Partnern, in höherem Maße jedoch auf der Seite des Pilzes. Bei der Bildung des Mantels waren v.a. Gene des Kohlenhydrat- und Hormon-Metabolismus exprimiert, deren Transkriptmenge im Zuge der Bildung des Hartig'schen Netzes abnahm. In diesem Gewebe stieg die Expression von Genen des Aminosäuremetabolismus und der Proteinfaltung an (Martin *et al.*, 2007). Die Analyse von differenziell während der Mykorrhiza zwischen *Tricholoma vaccinum* und *Picea abies* exprimierten Genen zeigte eine erhöhte Transkriptmenge bei Genen der Stressantwort, der Signaltransduktion, des Stoffaustauschs und dem Wachstum des Pilzes in der Pflanze sowie der Antwort auf Pflanzenabwehrstoffe (Krause & Kothe, 2006). Durch die Entschlüsselung und Annotierung des Genoms von *Laccaria bicolor*, einem Ektomykorrhiza-Pilz, können weitergehende Studien an Genen, die eine Rolle in der Symbiose spielen, erfolgen. In ersten Analysen zeichnete sich bereits ab, dass *L. bicolor*, der mit ca. 19.000 Genen ein sehr großes Genom vorweisen kann, viele Gene besitzt, die möglicherweise mit der Symbiose assoziiert sind. Weiterhin zeigte sich, dass eine hohe Anzahl transponierbarer Elemente im Genom enthalten sind (Martin *et al.* 2008; Martin & Nehls, 2009). Durch die Genomsequenzierung eines zweiten

Ektomykorrhiza-Pilzes, *Tuber melanosporum*, können zudem Vergleiche zu einem Ascomyceten genutzt werden, um weitere Symbiose-relevante Gene zu untersuchen (Martin *et al.*, 2010). Auch kann der Vergleich mit Genomen und Genfunktionen von pathogenen oder saprophytisch lebenden Pilzen Anhaltspunkte für Gemeinsamkeiten und Unterschiede geben. So können Pilze wie beispielsweise der Weißfäuleerreger *Schizophyllum commune* gute Vergleichsorganismen darstellen, da dieser ebenfalls mit Bäumen assoziiert ist, aber nicht als Symbiosepartner, sondern vornehmlich als Totholz befallender Ligninzer-setzer. *S. commune* wird seit Jahrzehnten als Modellorganismus, v.a. für die sexuelle Interaktion, genutzt, da er innerhalb von zwei Wochen seinen kompletten Lebenszyklus unter Laborbedingungen vollzieht und sowohl als Mono- als auch als Dikaryon kultiviert werden kann. Mit der Veröffentlichung des Genoms ist auch für diesen Pilz ein Grundstein für die intensive molekularbiologische Forschung gesetzt worden (Ohm *et al.*, 2010).

Durch ihre ubiquitäre Verbreitung müssen Pilze in der Lage sein, die verschiedensten Umweltbedingungen und Abwehrstrategien anderer Organismen zu bewältigen. Die im Boden natürlicherweise vorkommenden aber auch durch den Menschen eingebrachten Schwermetalle stellen aufgrund ihrer Toxizität hohe Ansprüche an die Detoxifikationsmechanismen der Bodenorganismen, darunter Pilze. Es ist bekannt, dass Ektomykorrhizapilze ihre Wirtspflanze vor erhöhter Schwermetallexposition schützen können, wodurch die Symbiose einen hohen Stellenwert bei der Remediation kontaminierter Flächen erfährt (Leyval *et al.*, 1997; Jentschke & Godbold, 2000; Iordache *et al.*, 2009). Verschiedene Prozesse können direkt zur Metalltoleranz beitragen, darunter die Exkretion von Chelatoren, die Veränderung der Bodenverhältnisse, bspw. durch die Reduktion des pH-Wertes in der Rhizosphäre, ein modifiziertes Aufnahmesystem der Plasmamembran oder durch die intrazelluläre Entgiftung. Der Pilz kann aber auch indirekt zur Metalltoleranz beitragen, indem er Veränderungen physiologischer Prozesse der Pflanze, z.B. durch die Aktivierung von Phytohormonen, bewirkt (Jentschke & Godbold, 2000).

Der erste Kontakt der Pilzzelle mit dem Schwermetall findet über die Zellwand statt. Die Biosorption kann an freien Carboxyl-, Hydroxyl-, Amin-, Phosphat- und Sulfhydrylgruppen erfolgen und so die Schädigung der Zelle unterbinden (Gadd, 1993). Effektiv ist auch die Exkretion organischer Säuren durch den Pilz, die zur Verminderung des Boden-pHs führt. Die Säuren können der Komplexbildung von Metallionen dienen, aber auch toxische Metalle aus der Bodenmatrix mobilisieren. Die Art der Säuren sowie Spezies- und Isolat-spezifische Eigenschaften spielen bei diesem Mechanismus eine entscheidende Rolle und bestimmen über die Detoxifikation (Meharg, 2003).

Der intrazellulären Entgiftung kommt trotz der vorher beschriebenen Mechanismen eine wesentliche Bedeutung zu, weil ein großer Anteil der Metalle in die Zelle gelangen kann

(Bellion *et al.*, 2006). Nach der Gabe von radioaktiv markierten Cadmium zu einer *P. involutus*-Kultur wurden 20% des Metalls im Cytosol und 30% in der Vakuole nachgewiesen (Blaudez *et al.*, 2000). Eine effiziente Entgiftung in der Zelle ist somit für die Aufrechterhaltung der Vitalität notwendig. Die Detoxifizierung findet mit Hilfe verschiedener Proteine statt, darunter thiolhaltige Moleküle wie Metallothioneine und Glutathione, die als Ligand die Metalle binden können. Die Exposition mit Kupfer und Cadmium führte bei dem Ektomykorrhizapilz *P. involutus* zu einer erhöhten Expression eines Metallothioneins, zudem stieg der Gehalt an Glutathion und γ -Glutamylcystein im Myzel unter Cadmiumstress an (Courbot *et al.*, 2004, Bellion *et al.*, 2007). Ebenso konnten Phytochelatine von *Boletus edulis* in Anwesenheit von Cadmium detektiert werden, die zur Entgiftung beitragen (Collin-Hansen *et al.*, 2007).

Die in der Biotransformation an Moleküle gebundenen Metalle werden entweder zur Detoxifizierung in die Vakuole oder aus der Zelle hinaus transportiert. Dafür müssen der Zelle effektive Efflux-Transporter zur Verfügung stehen. Hierfür gibt es einerseits spezialisierte Transporter, die den Efflux eines bestimmten Metalls steuern oder aber sogenannte „Multi-Drug“-Transporter, die neben Schwermetallen auch Stoffe mit verschiedenen chemischen Charakteristika transportieren können. Eingeteilt werden die „Multi-Drug“-Transporter in fünf große Familien: die „ATP-binding cassette“ (ABC)-Familie, die „Major facilitator superfamily“ (MFS), „Small multidrug resistance“ (SMR)-Familie, die „Resistance nodulation cell division“ (RND)-Familie und die „Multidrug and toxic compound extrusion“ (MATE)-Familie (Moriyama *et al.*, 2008). Der Transport über ABC-Transporter, die transmembrane ATPasen darstellen, erfolgt energiegebunden über die Hydrolyse von ATP. Die anderen Transporter nutzen hingegen den elektrochemischen Protonengradienten und regulieren den Efflux über einen Antiport von Protonen, bzw. bei MATE-Transportern auch von Natrium-Ionen.

Die ersten MATE-Transporter, NorM aus *Vibrio parahaemolyticus* und das dazu homologe YdhE aus *E. coli*, wurden 1998 beschrieben (Morita *et al.*, 1998). Durch die Untersuchung weiterer MATE-Gene und die Analyse annotierter Genome konnte gezeigt werden, dass diese in allen Domänen des Lebens vertreten sind. Eine Unterteilung der MATE-Familie erfolgte durch phylogenetische Analysen in drei große Unterfamilien; zur ersten zählen bakterielle MATE-Transporter, die zweite Familie wird nochmals unterteilt und trennt sich auf in die Gruppe 2A mit pilzlichen, 2B mit pflanzlichen, 2C mit menschlichen und tierischen MATE-Genen und Gruppe 2D mit Transportern von Protozoen. In der dritten Gruppe sind MATE-Transporter von Archaeen und Bakterien vertreten (Omote *et al.*, 2006, Abb. 2.2).

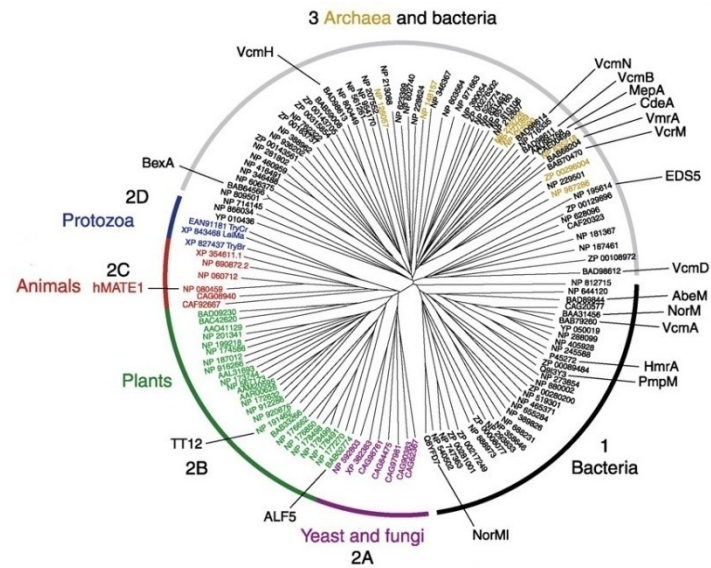


Abb. 2.2 Verbreitung der MATE-Gene und phylogenetische Einteilung (Omote *et al.*, 2006)

Die meisten Proteine dieser Familie haben eine Größe zwischen 450 und 550 Aminosäuren (AS), aber auch größere Proteine mit bis zu 700 AS, z.B. bei *S. cerevisiae* sowie kleinere Transporterproteine bei Archäen sind bekannt (Hvorup *et al.*, 2003). Diese Beobachtung stimmt mit der generellen Hypothese überein, dass eukaryotische Transporterproteine größer sind als bakterielle und diese wiederum größer als die der Archaeen (Chung *et al.*, 2001). Die Sequenzähnlichkeit innerhalb der MATE-Proteine beträgt nur ca. 40%. In Alignments konnten einige höher konservierte Regionen in der Nähe der Transmembran-Helices (TM) 1 und TM7, in der extrazellulären Schleife zwischen TM1 und TM2 sowie TM7 und TM8 und in der intrazellulären Region zwischen TM2 und TM3, TM4 und TM5, TM8 und TM9 sowie TM10 und TM11 gefunden werden (Omote *et al.*, 2006, Abb. 2.3).

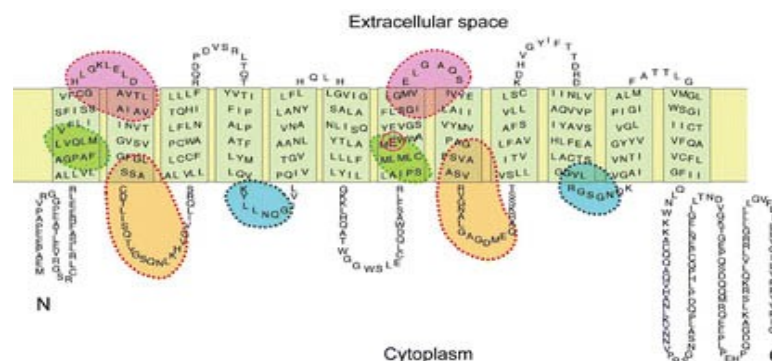


Abb. 2.3 Struktur und konservierte Regionen der MATE-Transporter-Proteine

Dargestellt ist das menschliche MATE1-Protein, an dem die konservierten Regionen hervorgehoben wurden (Omote *et al.*, 2006)

Die konservierten Regionen sind sehr symmetrisch im Protein verteilt und können darauf hinweisen, dass die MATE-Proteine von einem gemeinsamen ursprünglichen Gen abstammen, bei dem eine Genduplikation stattgefunden hat. Konservierte Aminosäuren außerhalb der Transmembran-Helices könnten als Bindestellen für die Substrate dienen. Zudem bieten sich die langen, im Cytoplasma befindlichen Enden des Transporters für die Interaktion mit zellulären Proteinen an (Moriyama *et al.*, 2008).

Die Substrate bakterieller MATE-Transporter sind äußerst divers, gemeinsam ist ihnen aber der Efflux von Fluorochinonen wie Norfoxacin. Ebenso sind Ethidiumbromid und Acriflavin Substrate vieler bakterieller MATE-Transporter (Kuroda & Tsuchiya, 2009). Der Efflux findet dabei über den Antiport von Protonen oder Natrium-Ionen statt. Dabei verwenden Bakterien überwiegend Natrium-Ionen, z.B. YdhE von *E. coli*, VcmA von *Vibrio cholerae*, CdeA von *Clostridium difficile* und NorM von *Neisseria gonorrhoeae* (Huda *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003a; Dridi *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2008). Nur zwei bakterielle MATE-Transporter sind bisher bekannt, die den Einstrom von Protonen zum Antiport nutzen. Dabei handelt es sich um AbeM von *Acinetobacter baumannii* und PmpM von *Pseudomonas aeruginosa* (He *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2005). Da bakterielle MATE-Transporter in der Lage sind, Antibiotika zu transportieren und damit ein wichtiges klinisches Risiko für die Entstehung von Resistenzen darstellen, werden sie im Zusammenhang mit Pathogenese und Virulenz eingehend studiert. Untersuchungen einer *norM*-Deletionsmutante von *Erwinia amylovora*, dem Erreger des Feuerbrands bei Äpfeln und Birnen, zeigten keine Unterschiede bei der Infektion im Vergleich zum Wildtyp (Burse *et al.*, 2004). Ebenso war die Sterblichkeitsrate von Mäusen, die mit einem *mdtK*-Deletionsstamm von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium infiziert wurden, vergleichbar mit der bei einer Infektion mit dem Wildtyp (Nishino *et al.*, 2006). Andererseits zeigte die Infektion von Tomatenpflanzen mit einer *dinF*-Mutante des Phytopathogens *Ralstonia solanacearum* abgeschwächte Krankheitssymptome (Brown *et al.*, 2007).

Sehr gut untersucht sind die beiden MATE-Proteine des Menschen. Beide Gene, *hMATE1* und *hMATE2*, liegen in divergenter Orientierung auf Chromosom 17 und werden vor allem in der Niere exprimiert, *hMATE1* zusätzlich noch in der Leber, im Skelettmuskel und im Herz. Mit Antikörpern konnte *hMATE1* in der luminalen Membran der Harnwege und der Gallengänge lokalisiert werden, wo der Transporter für die Exkretion toxischer Substanzen über den Urin und die Gallenflüssigkeit verantwortlich ist (Otsuka *et al.*, 2005). Zu den Substraten der menschlichen MATE-Transporter zählen einige Arzneistoffe, die z.B. in der Diabetes-Therapie oder in der Chemotherapie von Tumoren eingesetzt werden (Tanihara *et al.*, 2007). Orthologe zu *hMATE1* und *hMATE2* konnten auch in anderen Säugetieren nachgewiesen werden und bestätigten die Rolle bei der renalen Exkretion (Hiasa *et al.* 2006; Ohta *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007).

Die Funktion einiger MATE-Transporter von Pflanzen konnte ebenfalls in den letzten Jahren aufgeklärt werden. Das erste beschriebene pflanzliche MATE-Protein ist Alf5 aus *Arabidopsis thaliana*, welches in der Wurzel exprimiert wird und zum Schutz der Pflanze Stoffe aus dem Boden detoxifizieren kann (Diener *et al.*, 2001). Im Genom von *A. thaliana* existieren weitere 57 MATE-Paraloge, deren Funktion größtenteils noch unbekannt ist. Untersucht wurden bisher neben *alf5* noch einige weitere MATE-Gene von *A. thaliana*, darunter bspw. *frd3*, welches hauptsächlich in der Wurzel exprimiert wird und für eine korrekte Eisenverteilung in der Pflanze verantwortlich ist (Green & Rogers, 2004). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Frd3 den Efflux von Citrat in den Apoplasten steuert aber nicht direkt Eisen transportieren kann. Es wird deshalb angenommen, dass das Citrat Eisen bindet und dieser Komplex aus der Wurzel zu den Blättern transportiert wird (Durrett *et al.*, 2007). Weitere Homologe, die ebenfalls Citrat transportieren können und dadurch zu einer Aluminiumtoleranz bei der Pflanze führen, wurden in Getreide, darunter Gerste, Hirse, Reis, Mais und Weizen gefunden (Furukawa *et al.*, 2007; Magalhaes *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2009; Yokosho *et al.*, 2009; Maron *et al.*, 2010) (Abb. 2.4). Ein ebenso interessantes Gen ist *Atdtx1* aus *A. thaliana*, welches in der heterologen Expression in *E. coli* eine Cadmium-Resistenz sowie den Efflux von pflanzlichen Alkaloiden und Antibiotika vermitteln konnte (Li *et al.*, 2002). In *Nicotiana tabacum* kann das toxische Alkaloid Nikotin durch den MATE-Transporter Nt-Jat1 in die Vakuole transportiert werden und die Pflanze vor einer Intoxikation schützen (Morita *et al.*, 2009). Andere Substrate pflanzlicher MATE-Transporter sind Flavonoide, Ethidiumbromid, Norfloxacin, Tetramethylammonium und Polyvinylpyrrolidone (Yazaki *et al.*, 2007).

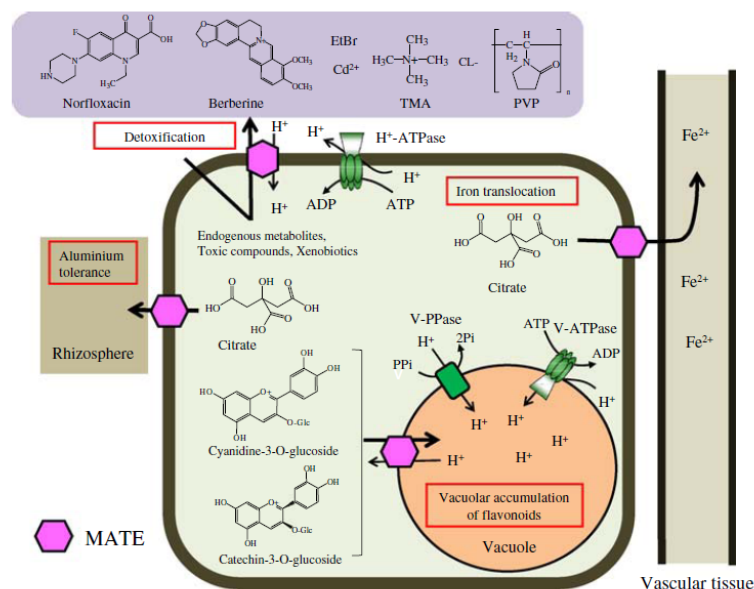


Abb. 2.4 Funktion und Verteilung von MATE-Transportern in Pflanzenzellen (Yazaki *et al.*, 2007)

Erkenntnisse zur Funktion von pilzlichen MATE-Transportern sind hingegen kaum vorhanden. Bisher wurde lediglich ein Gen, ERC1 von *S. cerevisiae*, näher charakterisiert. Entdeckt wurde ERC1 bei Suche nach Genen, die eine Resistenz gegenüber dem Methionin-Analogon Ethionin vermitteln. In Überexpressions-Studien konnte gezeigt werden, dass ERC1 zur Ethionin-Resistenz beiträgt, zudem akkumulierten die Zellen vermehrt S-Adenosylmethionin (Shiomi *et al.*, 1991). Weiterführende Untersuchungen zu anderen Substraten wurden nicht durchgeführt. Die Experimente fanden unter dem Gesichtspunkt der Ethionin-Resistenz statt, es gab keinen Bezug von ERC1 zu „Multi-Drug“-Transportern und erst acht Jahre später wurde die Familie der MATE-Transporter beschrieben.

Besser erforscht bei Pilzen sind hingegen Transporter der ABC- und MFS-Familie, die vor allem im Hinblick auf Pathogenität und quantitative Resistenzen gegenüber Fungiziden beschrieben sind. Im Fokus der Forschung stehen dabei besonders humanpathogene, aber auch phytopathogene Pilze, die in der Landwirtschaft erheblichen Schaden durch die Entwicklung von Resistenzen gegenüber den verwendeten Substanzen verursachen. Gut untersucht ist bspw. der phytopathogene Ascomycet *Botrytis cinerea*, bei dem in den letzten Jahren vermehrt Populationen mit „Multi-Drug“-Resistenzen (MDR) isoliert werden konnten. Diese MDR-Phänotypen äußern sich in einer erhöhten Resistenz gegenüber Fungiziden und einer erhöhten Expression relevanter Efflux-Transportergene. In den resistenten Stämmen konnte eine Mutation des Transkriptionsfaktors Mrr1 nachgewiesen werden. Diese führte zur einer erhöhten Aktivität, was wiederum den ABC-Transporter AtrB beeinflusst. Außerdem konnte in der Promotorregion des MFS-Transportergens *mfsm2* ein Sequenzabschnitt eines Retrotransposons gefunden werden, der zur Überexpression von *mfsm2* und damit zum MDR-Phänotyp beiträgt (Kretschmer *et al.*, 2009). Weitere, gut untersuchte ABC-Transporter stammen aus dem Modelorganismus *S. cerevisiae* und sind dort für die Resistenzen gegenüber verschiedenen Substanzen, darunter Fungizide, verantwortlich (Jungwirth & Kuchler, 2006). Ebenso vermitteln ABC-Transporter des weizenpathogenen Pilzes *Mycosphaerella graminicola* die Resistenz gegenüber einigen Azolen, aber auch gegenüber Pflanzenabwehrstoffen (de Waard *et al.*, 2006). Der MFS-Transporter MgMfs1 aus *M. graminicola* ist in der Lage, Fungizide der Strobilurin-Klasse zu transportieren (Roohparvar *et al.*, 2008). Durch das intensive Ausbringen von Fungiziden auf die Agrarflächen sind jedoch nicht nur phytopathogene Arten betroffen. Durch die Verteilung im Boden und der Anreicherung im Grundwasser sind auch Ektomykorrhiza-Pilze oder Saprophyten den Substanzen ausgesetzt. Diese brauchen zum Überleben ebenfalls Schutzmechanismen und zelluläre Detoxifikationssysteme, die bisher jedoch kaum erforscht sind.

Genetische Arbeiten an und mit Pilzen sind an das Vorhandensein von effizienten und erprobten Methoden gekoppelt. Ein wichtiges Werkzeug ist dabei die Transformation des

Pilzes mit genetischer Information. Die Gene können dabei vom Pilz selbst stammen oder als Fremdgene in das Genom integriert werden. Sowohl eine Überexpression als auch die Deletion oder die Repression eines Gens kann wertvolle Hinweise über dessen Funktion geben. Außerdem können Promotorstudien zur Überprüfung der Expression eines Gens und Lokalisierungsstudien stattfinden. Die erste Transformation eines Pilzes wurde 1973 bei *Neurospora crassa* beschrieben. Dabei wurde DNA des Wildtypstamms zu einer Inositol-defizienten Mutante gegeben und die Transformation mit Calcium vermittelt. Inositol-unabhängige Transformanten konnten selektiert werden, wiesen jedoch eine geringe Stabilität auf (Mishra & Tatum, 1973; Fincham, 1989).

Für andere Pilze wurde in den darauffolgenden Jahren die Transformation in Protoplasten beschrieben. Dabei wird die Zellwand durch lytische Enzyme entfernt und die DNA-Aufnahme durch die Zugabe von Calciumchlorid ermöglicht oder es findet eine PEG-vermittelte Protoplasten-Fusion statt. Die Herstellung von stabilen Protoplasten wurde auch bei Ektomykorrhiza-Pilzen beschrieben (Kropp & Fortin, 1986; Barrett *et al.*, 1989). Indem die Protoplasten von *Hebeloma cylindrosporum* mit UV-Strahlung behandelt wurden, konnten zudem Mutanten isoliert werden, die eine Resistenz gegenüber Fungiziden aufwiesen und für die weitere Forschung dienen (Hebraud & Fevre, 1988). Der erste Ektomykorrhiza-Pilz, der mittels Protoplastierung erfolgreich transformiert werden konnte, ist *Laccaria laccata*. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Sequenzen des *gpd*-Promotors und *trpC*-Terminators, die beide von *Aspergillus nidulans*, einem Ascomyceten stammten, in dem Basidiomyceten voll funktionsfähig waren. Damit wurde eine erste Transformationsmethode für die Erforschung von molekularen Mechanismen in der Ektomykorrhiza etabliert (Barrett *et al.*, 1990).

Weitere Transformationsmethoden umfassen die Elektroporation, bei der häufig Protoplasten oder Sporen eingesetzt werden und die biolistische Transformation, bei der die zu übertragende DNA an Gold- oder Wolfram-Partikel gebunden und anschließend mit hohem Druck in die Zelle geschossen wird. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass keine Protoplasten hergestellt werden müssen, da nicht alle Pilze ausreichend Biomasse für die Protoplasten-Isolierung bilden oder keine geeignete Enzymmischung für den Abbau der Zellwand bekannt ist. Zudem ist die Effizienz mit der der Protoplasten-Transformation vergleichbar und teilweise sogar höher (Weld *et al.*, 2006).

Im Jahr 1995 wurde zum ersten Mal die Übertragung von genetischem Material durch *Agrobacterium tumefaciens* in ein Pilzgenom, dem von *Saccharomyces cerevisiae*, beschrieben (Bundock *et al.*, 1995). Die Methode wurde aus der Pflanzen-Biotechnologie übernommen und macht sich die natürliche Übertragung der T-DNA-Region aus dem Ti (Tumor-induzierendes)-Plasmid von *A. tumefaciens* in die Pflanze zunutze. Auf dem Ti-Plasmid sind die *vir*-Gene, die für die Übertragung der T-DNA zuständig sind, codiert. Die T-

DNA-Region enthält Pflanzenhormongene und Gene für die Opinin-Synthese. Die T-DNA-Region wird durch 25 bp große Tandemwiederholungen abgegrenzt, die sogenannte linke und rechte Grenze. Die Übertragung bewirkt durch die Expression der Phytohormongene in der Pflanze die Bildung von Tumoren, die sogenannten Wurzelhalsgallen (Madigan *et al.*, 2001). In der Biotechnologie werden modifizierte Plasmide verwendet, die zwischen der rechten und linken Grenze anstatt der Tumor-auslösenden Gene die einzubringende Fremd-DNA enthalten. Diese sogenannten binären Plasmide enthalten zusätzlich einen Resistenzmarker für die Kultivierung von *A. tumefaciens*. Die *vir*-Gene sind auf einem zweiten Plasmid, einem Derivat des Ti-Plasmids, codiert, das selbst jedoch keine T-DNA-Region mehr besitzt (Abb. 2.5).

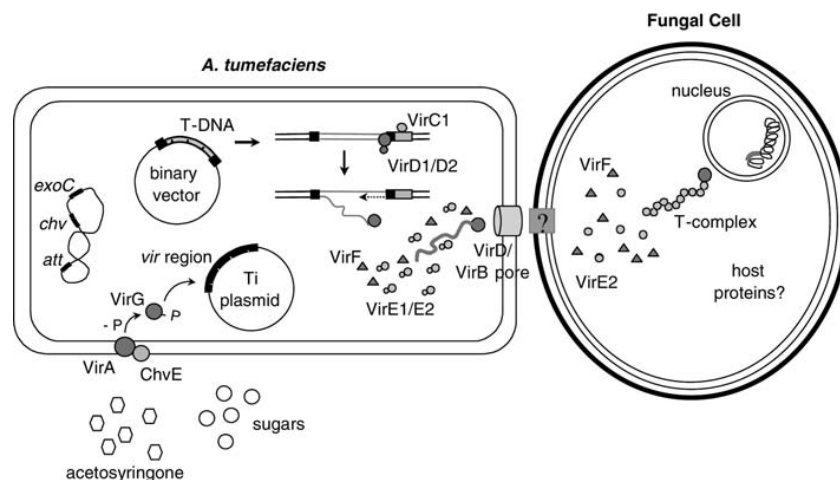


Abb. 2.5 Transformation durch *Agrobacterium tumefaciens* (Michielse *et al.*, 2005)

Die Chemotaxis von *A. tumefaciens* erfolgt durch die Attraktion der Signalstoffe der verwundeten Pflanzenzelle und kann bei der Transformation von Pilzen durch die externe Zugabe dieser phenolischen Substanzen, wie z.B. Acetosyringon, initiiert werden. Danach folgt die Aktivierung der verschiedenen *vir*-Gene. Das membrangebundene VirA interagiert mit Acetosyringon und kann nach erfolgter Autophosphorylierung das Phosphat auf VirG übertragen. VirG agiert als Transkriptionsregulator und aktiviert die Promotoren der anderen *vir*-Gene. Beteiligt an der Synthese des Einzelstrangs sind VirC, VirD1 und VirD2. Die Proteine VirD1 und VirD2 wirken zusammen als strangspezifische Endonuklease und führen durch die Restriktion zur Freigabe einzelsträngiger T-DNA, wobei VirD2 weiterhin an der T-DNA gebunden bleibt. Um die DNA vor zellulären Nukleasen zu schützen und zur besseren Übertragung wird VirE2 gebunden und ein gewundener Komplex geformt. VirD4 und VirB bilden eine Pore, die die Bakterien- und die Wirtszelle miteinander verbindet und durch die der T-DNA-Komplex zusammen mit VirE2 und VirF in die Pflanzen- bzw. Pilzzelle übertragen werden kann. Der Transport zum Zellkern wird durch Nukleus-

Lokalisierungssignale (NLS) gesteuert, die in VirD2 und VirE2 vorkommen. Danach interagiert VirF im Zellkern mit dem Proteasom-Komplex des Wirtes und scheint zudem am Abbau des T-DNA-Komplexes beteiligt zu sein. Dadurch wird die T-DNA freigesetzt und kann in das Wirts-Genom eingebaut werden (Tzfira & Citovsky, 2002; Michielse *et al.*, 2005; Pitzschke & Hirt, 2010). Viele weitere Proteine und Signale von Bakterium und Pflanze bzw. Pilz spielen bei diesem komplexen Vorgang eine entscheidende Rolle und sind teilweise noch nicht im Detail erforscht.

Zur Transformation werden hypervirulente Stämme verwendet, die eine sehr hohe Transformationseffizienz besitzen. Dabei besteht das allgemeine Prozedere darin, den Rezipienten mit *A. tumefaciens* in Co-Kultur zu inkubieren und danach auf geeignetem Selektionsmedium mögliche Transformanten zu selektieren. Für jeden Pilz müssen jedoch individuell die Bedürfnisse angepasst und ein effizientes Protokoll empirisch erprobt werden. Als Variablen der Transformation gelten dabei der Pilz, der verwendete *A. tumefaciens*-Stamm, die Acetosyringon-Konzentration und die Bedingungen während der Co-Kultivierung (Michielse *et al.*, 2005). Als Ausgangsmaterial bieten sich Protoplasten, Sporen, Keimlinge, Fruchtkörpergewebe oder auch vegetatives Myzel an. Dabei ist es speziesabhängig, inwiefern Protoplasten und intakte Zellen auf die Transformation reagieren. Beim Ascomyceten *Mycosphaerella graminicola* können Protoplasten genauso effizient transformiert werden wie intakte Pilzzellen, bei den Zygomyceten *Mucor circinelloides* und *Rhizopus oryzae* konnte die Übertragung der T-DNA nur bei Protoplasten erreicht werden (Zwiers & de Waard 2001; Michielse *et al.*, 2005). Das Alter des Ausgangsmaterials spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle, da bei älteren Kulturen die Vitalität reduziert ist, was die Effizienz verringern kann. So sinkt die Transformationsrate bei Sporen von *Aspergillus awamori* und *Aspergillus niger*, wenn diese längere Zeit bei 4°C gelagert wurden. Möglicherweise spielt dabei die schlechtere Keimungsrate der Sporen eine Rolle (Michielse *et al.*, 2005).

Die Wahl des *A. tumefaciens*-Stammes sowie die Konzentration von Acetosyringon, das entweder in der Vorkultur oder während der Co-Kultur zugesetzt werden kann, können die Transformationsrate ebenfalls beeinflussen (Michielse *et al.*, 2005). Eine Acetosyringon-Konzentration von 200 µM bis 500 µM scheint geeignet zu sein, um eine hohe Ausbeute an Transformanten zu erhalten. Ohne Induktion der *vir*-Gene durch Acetosyringon kann ebenfalls eine Übertragung der DNA stattfinden, jedoch mit einer extrem niedrigen Effizienz (Leclerque *et al.*, 2004).

Desweiteren spielt die Anzahl der Bakterien- und Pilzzellen und deren Verhältnis zueinander eine bedeutende Rolle. Bei *Aspergillus giganteus* konnte gezeigt werden, dass bei einem optimalen Verhältnis von *A. tumefaciens* und Konidien von *A. giganteus* eine fünffach höhere Transformationseffizienz erzielt wird (Meyer *et al.*, 2003).

Die Temperatur während der Co-Kultivierung hat ebenfalls einen Einfluss auf die Transformation. Bei *H. cylindrosporum* wurde bei einem Temperaturanstieg von 20°C auf 23°C, was der optimalen Wachstumstemperatur von *H. cylindrosporum* entspricht, eine Verdopplung der Transformationsrate beobachtet. Eine weitere Erhöhung der Temperatur brachte keine Vorteile und bei 37°C, bei dem beide Transformationspartner noch vital waren, fand keine Übertragung der T-DNA mehr statt (Comber *et al.*, 2003). Der pH-Wert während der Co-Kultivierung, wie auch die Art des Filters, der dabei verwendet werden kann, können sich ebenfalls auf die Effizienz auswirken (Michielse *et al.*, 2005).

Mit der *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformation (ATMT) konnten bereits viele Asco- und Basidiomyceten, aber auch einige Oomyceten und Zygomyceten transformiert werden (Michielse *et al.*, 2005). Die ersten, mit *A. tumefaciens* transformierten Ektomykorrhiza-Pilze, waren *Suillus bovinus*, *H. cylindrosporum* und *Paxillus involutus* (Hanif *et al.*, 2002; Pardo *et al.*, 2002). Die Transformation von *S. bovinus* erfolgte zum einen mit dem Phleomycin-Resistenz-Gen unter der Kontrolle des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (*gpd*)-Promotors von *S. commune* und andererseits mit dem Hygromycin B-Resistenz-Gen unter dem *gpd*-Promotor von *Agaricus bisporus*. Bei allen Transformationen waren die Resistenz-Gene, die kein Intron enthielten voll funktionsfähig, so dass die Transformanten auf dem jeweiligen Selektionsmedium wachsen konnten. Die Expression des transformierten Gens kann aber unter Umständen von der Anwesenheit eines Introns abhängig sein. Bei *S. commune* konnte bei der Transformation des Hydrophobin-Gens *abh1* von *A. bisporus*, aber auch bei den homologen Genen *sc3* und *sc6* sowie bei der Transformation der Hygromycin-B-Phosphotransferase (*hph*) aus *E. coli* lediglich bei der Verwendung genomischer DNA, bzw. durch das Einbringen eines artifiziellen Introns in das Gen, ein Transkript nachgewiesen werden (Lugones *et al.*, 1999; Scholtmeijer *et al.*, 2001). Ebenso zeigte sich bei *Trichoderma viride* die Expression des antifungalen Protein-Gens (*afp*) abhängig von der Anwesenheit eines Introns (Xu & Gong, 2003b). Auch bei der Verwendung des Grün Fluoreszierenden-Proteins (GFP) in Lokalisierungsstudien sind manche Pilze auf ein Intron in der Sequenz angewiesen. Bei *S. commune* und *Phanerochaete chrysosporum* konnte durch Northern Blot-Analysen gezeigt werden, dass die Expression von GFP bei Vorhandensein eines Introns stark erhöht ist. Verdeutlicht wurden die Resultate durch mikroskopische Untersuchungen, bei denen keine Fluoreszenz bei nativem GFP vorhanden war, aber bei GFP mit Intron die Hyphen deutlich grün fluoreszierten (Lugones *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001). Das gleiche Ergebnis wurde für *Coprinus cinereus* und *A. bisporus* gezeigt (Chen *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu *S. commune* ist jedoch bei *A. bisporus* die Hygromycin-Resistenz nicht an ein Intron gekoppelt. Bei der Transformation mit *hph* aus *E. coli* konnten Transformanten auf Hygromycin B-haltigem Medium selektiert werden (Chen *et al.*, 2000). Einige Pilze benötigen

hingegen keine Introns und können GFP in hohem Maße exprimieren. Dazu zählen beispielsweise die Ektomykorrhiza-Pilze *Tuber borchii* und *Pisolithus tinctorius*, bei denen die Fluoreszenz im Myzel nachweisbar war (Grimaldi *et al.*, 2005; Rodríguez-Tovar *et al.*, 2005). In *H. cylindrosporum* wurde zum einen natives *egfp* transformiert und andererseits *sgfp* mit flankierenden Introns. Beide Gene konnten exprimiert werden und zeigten eine deutliche Fluoreszenz (Müller *et al.*, 2006; Rekanalt *et al.*, 2007).

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung eines Gens aus der MATE-Transporter-Familie aus dem Ektomykorrhiza-Pilz *T. vaccinum*, das in vorherigen Untersuchungen als Mykorrhiza-spezifisch exprimiert beschrieben wurde. Das Substratspektrum sollte analysiert und mögliche Transportmechanismen untersucht werden, um die Rolle in der Symbiose aufzuklären.

Die Entwicklung und Etablierung eines effizienten Transformationssystems für *T. vaccinum* sollte als Voraussetzung für zukünftige Untersuchungen erfolgen. Basierend auf der T-DNA-Übertragung mit Hilfe von *A. tumefaciens* war das Ziel die *T. vaccinum*-Transformanten im Hinblick auf ihre morphologischen Eigenschaften, die mitotische Stabilität und ihre Mykorrhizierungsfähigkeit hin zu überprüfen.

Die Basidiomyceten *T. vaccinum* und *S. commune* sollten zudem an Fungizide adaptiert werden, um molekulargenetischen Grundlagen der Resistenz zu untersuchen. Zum einen sollten Transporter-Efflux-Färbungen durchgeführt werden, andererseits die differentielle Expression von Genen in Microarrays analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Medien, Lösungen und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel, Puffer, Antibiotika und Enzyme stammen, wenn nicht gesondert im Text vermerkt, von folgenden Firmen: Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt), Fisher Scientific GmbH (Schwerte), Roche Diagnostic (Mannheim), Boehringer (Mannheim) und Riedel de Haën (Seelze).

Medien wurden mit *A. dest.* angesetzt und zur Sterilisation bei 1 bar und 120°C für 30 min autoklaviert. Substanzen, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden als Lösung angesetzt und mit einem Filter (Porengröße 0,22 µm) steril filtriert. Für alle Puffer und Lösungen wurde als Lösungsmittel, wenn nicht anders angegeben, *A. dest.* verwendet.

DNA-modifizierende Enzyme und Lösungen für molekularbiologische Anwendungen stammen von JenaBioscience GmbH (Jena), peqlab Biotechnology GmbH (Erlangen), Promega GmbH (Mannheim), New England Biolabs GmbH (Frankfurt), Bioline GmbH (Luckenwalde), Genomed GmbH (Löhne), Invitrogen GmbH (Karlsruhe) und GE Healthcare (München).

Die verwendeten Naturstoffe β-Rubromycin, Herbimycin A, Fungichromin, Enniatin D, Nodakenin, Geldanamycin, Helioferin B, Pamamycin und Tunicamycin wurden durch die Naturstoffsammlung des Hans-Knöll-Instituts, Jena bereitgestellt.

3.1.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Einzige Ausnahme bildet das RNA-Oligonukleotid RNA-Oligo, dass von JenaBioscience (Jena) synthetisiert wurde.

Tabelle 3.1: Oligonukleotide

Name	Sequenz, 5'→3' Orientierung
Oligonukleotide für die <i>A. tumefaciens</i> vermittelte Transformation	
Egfp 1	ATG GTG AGC AAG GGC
Egfp 2	TTA CTT GTA CAG CTC GTC
Hph-F	AAG CCT GAA CTC ACC GCG AC
Hph-R	CTA TTC CTT TGC CCT CGG AC
EGFP-fwd	CAC ATG AAG CAG CAC GAC TT
EGFP-rev	TGC TCA GGT AGT GGT TGT CG

rf13a	GCA AGA AAG GCA TAC AAA ACT
rf13b	GCG TCG CTG GTG AAA AT
Oligonukleotide für die TAIL-PCR	
TAIL 1	(AGCT) GTC GA(GC) (AT) GA (AGCT) A (AT) GAA
TAIL 2	(AGCT) CAG CT (AT) (GC) CT (AGCT) T (GC) CTT
TAIL 3	GT (AGCT) CGA (GC) (AT) CA (AGCT) A (AT) GTT
TAIL 4	CA (AGCT) GC (AGCT) (AT) (GC) GT (AGCT) T (GC) CAA
TAIL 5	(AT) GTG (AGCT) AG (AT) A (AGCT) CA (AGCT) AGA
TAIL 6	(GC) CAC (AGCT) TC (GC) T (AGCT) GT (AGCT) TCT
MATE Fwd	CGG CGG CTT CTT CTT CCT CTG
MATE-up 1	CTT CGT GAT CCC AAT CCG TAC
MATE up 5	CTG ACC TGA GAT TCA GGA GGG CTC C
MATE upA0	CTGGAAAGTAGTCGAGGCTAG
MT 1	ATT CGT AAC TCC TCCC AGA AGA
MT 2	ATT GAG CAG CGG CGT GTT TT
MT 3	AGC GTT GGG GAC GAA GAC AG
MS 1	CCA TAT ACA AAG TGTG GGC TGA GG
MS 2	CGA CAG CTG ATG GAT TTG TAA AGT C
MS 3	TTG AGG CTG AGA AGA TGT CCA TG
Oligonukleotide für die Isolation des <i>mte1</i>-Fragments von <i>T. vaccinum</i>	
DegM 1	CC (AGT) GT (AC) TTT GG (AG) AC (CT) CA
gMDNA1	TTG GAA CTC ACG TAT TGG AG
Oligonukleotide für die Isolation des <i>mte1</i>-Fragments von <i>T. vaccinum</i>	
Mup 6	ACC TGT TTC CCT CTG GAC CT
MATE-F	CTA CTG GGA GAG GGG AAA GCA CTG
MATE-R	AAA GAA ACC GTC AAG CCA ATC CAC
Oligonukleotide für die 3'RACE und RLM-RACE-PCR	
OligodT-1	GCC ACG CGT CTA CTA ATA (T) ¹⁹ AGC
MATE do4	GTC TCA CAT CGC TTA TAG GTT CC
RLM-RACE 1	CCC CAA CGT GAT GGC AGC AAG AGC A
RLM-RACE 2	CAT CAG ACG TCT GTT CTA TTG GCT CAT
RNA-Oligo	CGA CUG GAG CAC GAG GAC ACU GAA A
Racer5	CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA
Oligonukleotide für die Klonierung des <i>mte1</i>-Fragments von <i>T. vaccinum</i>	
TvM1 start	ATG TCT TCA ACA TTA GCG CAC
TvM1 rev	ATG CCT TGG ACC AGT TTC AGC
TvM1-Eco-ATG	GGA CGA ATT CAT GTC TTC AAC ATT A
TvM1-Bam-ATG	TAG TGG ATC CAT GTC TTC AAC ATT AGC GCA C
Oligonukleotide für die Isolierung von <i>mte2</i> aus <i>T. vaccinum</i>	
M2-LP1	CG(CT) (GT)GC AGC GTT CTC ACT GAT G
M2-LP2	GCT C(AG)T (CT)CA (CT)CA CAC (GC)(CT)C TCT
M2-LPr5	TCG TCA CTG AAA A(AG)A TAG CCA
M2-LPr10b	CCG A(AT)A CC(AT) AC(AG) AT(AG) AAC AGC G
M2-LPr11	TCC CA(AG) TC(CT) GT(GT) CCC A(AG)C CA
Oligonukleotide für die Sequenzanalyse des <i>mte1</i>-Fragments von <i>S. commune</i>	
ScM1-1F	GGC AGC CGC ACC AGC ACT AAT G
ScM1-1R	CGG CGG CTG ACG TTG TTG AAG AC

3.1.3 Stämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und neu klonierten Plasmide sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Verwendete Organismen und Stämme sowie die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Organismen sind in Tabelle 3.3 und 3.4 aufgeführt.

Tab. 3.2: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Typ	Herkunft
pDrive	Klonierungsvektor, Amp ^R	Qiagen, Hilden
pGem T-easy	Klonierungsvektor, Amp ^R	Promega GmbH, Mannheim
pBGgHg	pCAMBIA1300, Kan ^R , <i>A. bisporus</i> P _{gpd} , <i>hph</i> , <i>egfp</i> , Term CaMV35S	Chen <i>et al.</i> , 2000
pTrc99A	Expressionsvektor, Amp ^R	Amann & Brosius, 1985
pYES260	Expressionsvektor, Amp ^R , URA3	Euroscarf, Frankfurt
pTvM1	pDrive, <i>mte1</i>	diese Arbeit
pTvM1c	pDrive, <i>mte1</i> cDNA	diese Arbeit
pTrc- <i>mte1</i>	pTrc99A, <i>mte1</i> cDNA, kloniert mit <i>EcoRI</i> und <i>PstI</i>	diese Arbeit
pYes- <i>mte1</i>	pYES260, <i>mte1</i> cDNA, kloniert mit <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i>	diese Arbeit

Tab. 3.3: Verwendete Organismen

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
Bakterienstämme		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1	(C58 pTiBo542) recA::bla, T-region deleted Mop(+) Cb(R)	Lazo <i>et al.</i> , 1991
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F-, <i>endA1</i> , <i>hsdRA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>f80d/lacZΔM15</i>	Gibco Life Technologies (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> TG1	<i>subE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) F`[traD36 proAB+ lacIq lacZ ΔM15]</i>	Sambrook & Russel, 2001
<i>E. coli</i> KAM3	AcrAB-Mutante von TG1	Morita <i>et al.</i> , 1998
KAM3 pTrc99A	KAM3 pTrc99A	diese Arbeit
KAM3 <i>mte1</i>	KAM3 pTrc- <i>mte1</i>	diese Arbeit
DH5α pTrc99A	DH5α pTrc99A	diese Arbeit
DH5α <i>mte1</i>	KAM3 pTrc- <i>mte1</i>	diese Arbeit
Saccharomyces cerevisiae-Stämme		
BY4741	MATa, <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>met15D0</i> , <i>ura3D0</i>	Euroscarf, Frankfurt
YDR338c	BY4741, Mat a, <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>met15D0</i> , <i>ura3D0</i> , YDR338c::kanMX4	Euroscarf, Frankfurt
YHR032w	BY4741, Mat a, <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>met15D0</i> , <i>ura3D0</i> , YHR032w::kanMX4	Euroscarf, Frankfurt
YOR153w	BY4741, Mat a, <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>met15D0</i> , <i>ura3D0</i> , YOR153w::kanMX4	Euroscarf, Frankfurt
YDR011w	BY4741, Mat a, <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>met15D0</i> , <i>ura3D0</i> , DR011w::kanMX4	Euroscarf, Frankfurt
YGR281w	BY4741, Mat a, <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>met15D0</i> , <i>ura3D0</i> YGR281w::kanMX4	Euroscarf, Frankfurt
BY pYes	BY4741 pYES260	diese Arbeit
BY <i>mte1</i>	BY4741 pYES260- <i>mte1</i>	diese Arbeit
YDR pYES	YDR338c pYES260	diese Arbeit
YDR <i>mte1</i>	YDR338c pYES- <i>mte1</i>	diese Arbeit
YHR pYes	YHR032w pYES260	diese Arbeit
YHR <i>mte1</i>	YHR032w pYES- <i>mte1</i>	diese Arbeit
YOR pYES	YOR153w pYES260	diese Arbeit
YOR <i>mte1</i>	YOR153w pYES- <i>mte1</i>	diese Arbeit
YGR pYES	YGR281w pYES260	diese Arbeit
YGR <i>mte1</i>	YGR281 pYES- <i>mte1</i>	diese Arbeit
YDR11 pYES	YDR011w pYES260	diese Arbeit
YDR11 <i>mte1</i>	YDR011w pYES- <i>mte1</i>	diese Arbeit

S. commune-Stämme

W22	A4,6; B3,2	*
E6	A4,6; B2,1; ura-; trp-	*
T1	A4,1; B2,2; ura-; trp-	*
T40	A-, -; B8,4; ura-	*
2-2	A1,4; B7,4	*
2-7	A1,102; B6,5	*
4-40	A4,6; B1,1	*
W21	A1,1; B1,1	*
12-44	A-, -; B-, -	*
W22 _{Op}	W22, adaptiert an das Fungizid Opus 1,0 mg/l	Bugge, 2009

* Die *S. commune* Stämme entstammen der Stammsammlung der Mikrobiellen Phytopathologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Tab. 3.4: Tricholoma-Stämme

Stamm/ Linie	Fundort, Herkunft
<i>T. terreum</i> (Schaeff.: Fr.) Kumm KR7216	unter Kiefer, K. H. Rexer (Universität Marburg)
<i>T. vaccinum</i> (Pers.: Fr.) Staude GK6514	unter Fichte, G. Kost (Universität Marburg)
<i>T. vaccinum</i> _{Op}	GK6514. adaptiert an das Fungizid Opus, Bugge, 2009
<i>T. vaccinum</i> _{Am}	GK6514, adaptiert an das Fungizid Amistar, Bugge, 2009
T1 bis T10	<i>T. vaccinum</i> GK6514, transformiert mit pBGgHg T-DNA, diese Arbeit

Die *in vitro* Mykorrhizierung erfolgte mit Keimlingen der gewöhnliche Fichte (*Picea abies* (L.) Karsten), deren Baumsamen vom Thüringer Forstamt, Schmalkalden bezogen wurden.

3.2 Methoden**3.2.1. Arbeiten mit *Agrobacterium tumefaciens*****3.2.1.1 Anzucht**

A. tumefaciens wurde aerob in Minimalmedium (MM: 10,5 g/l K₂HPO₄, 4,5 g/l KH₂PO₄, 1 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/l Na₃Citrat, 0,2 g/l MgSO₄*7 H₂O, 0,001 g/l Thiamin, 2 g/l Glucose) (Pardo *et al.*, 2001) oder in Standard I-Medium (StdI: 15 g/l Pepton, 3 g/l Hefeextrakt, 6 g/l NaCl, 1 g/l Glucose, pH 7,5; Roth GmbH, Karlsruhe) bei 28°C im Schüttelinkubator angezogen. Dem Medium wurden bei Bedarf 100 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

3.2.1.2 Plasmidisolierung

Eine Über-Nacht-Kultur wurde für 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl STET (0,1 M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8, 0,5% Triton-X-100; Sambrook *et al.*, 1989) resuspendiert und zur Lyse der Zellen wurde 200 µg Lysozym zugegeben. Einer Inkubation auf Eis für 10 min folgte ein weiterer Inkubationsschritt von 2

min im kochendem Wasserbad. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (20 min bei 13.000 rpm) und die DNA im Überstand mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl *A. dest.* resuspendiert. Zur Vervielfältigung wurde das Plasmid im Anschluss in Calcium-kompetente *E. coli* transformiert und diese auf geeignetem Selektivmedium inkubiert.

3.2.2 Arbeiten mit *Escherichia coli*

3.2.2.1 Anzucht

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte aerob auf einem Schüttelinkubator in LB-Medium (10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt), Superbroth-Medium (32 g/l Trypton, 20 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0) oder StdI-Medium bei 37°C. Dem Medium wurden bei Bedarf Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) zugesetzt. Zur Kultivierung auf Festmedium erfolgte die Zugabe von Agar Agar (1,8 %).

Bei der Klonierung in Plasmiden mit *lacZ*-Gen wurden dem Festmedium zur Identifikation positiver Klone der Indikator 5-Brom-4-chlor-3-indol- α -D-galaktosid (X-Gal, gelöst in DMSO, 40 mg/ml) beigefügt.

3.2.2.2 Transfektion

Elektrotransfektion (Dower *et al.*, 1988, Calvin & Hanawalt, 1988). Die Herstellung elektrokompeter Zellen erfolgte durch die Anzucht einer *E. coli* DH5 α -Über-Nacht-Kultur in StdI-Medium. Diese wurde zur Inokulation der Hauptkultur im Verhältnis von 1:100 in 500 ml Superbroth genutzt. Unter Schütteln bei 37°C wuchsen die Zellen bis zu einer OD₆₀₀=0,6 bis 0,7. Durch die Abkühlung auf Eis wurde das Zellwachstum gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 4000 rpm und 4°C pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in eiskaltem *A. dest.* resuspendiert und zweimal mit 10%iger Glycerinlösung gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 2-3 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und auf 100 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die Transfektion fand durch die Zugabe der Plasmid-DNA zu 100 µl elektrokompeter Zellen statt. Der Ansatz wurde in eine kalte Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) gegeben und durch einen elektrischen Impuls von 2,8 kV bei 25 µF und 220 Ω im Gene Pulser (E-C Apparatus Corporation, Holbrook, USA) wurde die Zellmembran permeabilisiert und die DNA in die Zellen eingeschleust. Die transformierten Zellen wurden sofort in 900 µl LB- oder Standard I-Medium aufgenommen und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Ansatzes auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht

bei 37°C inkubiert. Bei Bedarf wurde der Ligationsansatz vor der Elektrotransfektion entsalzt. Dafür wurde der gesamte Ansatz auf einen, auf *A. dest* aufgebrauchten Membranfilter (0,025 µm, Millipore GmbH, Schwalbach) pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Transfektion Calcium-kompetenter Zellen. Für die Vermittlung der Calciumkompetenz wurde eine Vorkultur in 25 ml StdI angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Zur Herstellung der Hauptkultur wurde 400 ml StdI 1:100 mit der Vorkultur beimpft und bei 37°C geschüttelt. Die optische Dichte wurde regelmäßig kontrolliert und bei einer $OD_{578}=0,2$ wurde das Zellwachstum durch Abkühlung auf Eis unterdrückt. Die Zellen wurden bei 4000 rpm für 15 min und 4°C pelletiert und anschließend in einer 100 mM $CaCl_2$ /20% Glycerin-Lösung resuspendiert. Der Ansatz wurde für 20 min auf Eis inkubiert und die Lösung abzentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4°C). Zum Abschluss wurden die Zellen in 2 ml der $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen, jeweils 100 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Transfektion wurden die calciumkompetenten Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurde der Ligationsansatz bzw. das Plasmid zur Verringerung der Viskosität auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe der Zellen erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Nach einem 5-minütigen Hitzeschock bei 37°C wurde vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und die Kultur zur Regeneration bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Nach dem Ausplattieren auf dem entsprechenden Selektionsmedium wurde die Kultur bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.2.3 Plasmidisolierung

(Sambrook *et al.*, 1989)

Analytische Präparation. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde 1 ml Über-Nacht-Kultur von *E. coli* in einem geeignetem Selektivmedium angezogen. Durch Zentrifugation (1 min bei 13.000 rpm) wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 200 µl Sol A (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0) vollständig resuspendiert. Die Suspension wurde mit 400 µl Sol B (0,2 M NaOH, 1% SDS) vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µl kaltem Sol C (7,5 M NH_4 Acetat, pH 7,8) und einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden die Zelltrümmer für 20 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Vol kaltem Isopropanol gefällt und durch anschließende Zentrifugation für 25 min bei 13.000 rpm pelletiert. Die DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl *A. dest.* resuspendiert.

Lithiumchlorid-Präparation. Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine LiCl-Präparation durchgeführt. Eine 200 ml Über-Nacht-Kultur wurde für 10 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml SolA resuspendiert, vorsichtig mit 20 ml SolB gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 15 ml kaltem SolC und eine anschließende Inkubation von 5 min auf Eis. Der Ansatz wurde zentrifugiert (20 min bei 11.000 rpm, 4°C) und die Nukleinsäuren aus dem Überstand mit 0,7 Vol kaltem Isopropanol gefällt und zentrifugiert (30 min bei 11.000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde getrocknet und in 6 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA; Ausubel *et al.*, 1999) resuspendiert. Zur Fällung der RNA wurde der Ansatz mit 1 Vol kaltem 5 M LiCl versetzt und anschließend mindestens eine Stunde oder über Nacht auf Eis inkubiert. Die RNA wurde abzentrifugiert (20 min bei 11.000 rpm, 4°C) und die DNA im Überstand erneut mit 0,7 Vol kaltem Isopropanol gefällt und zentrifugiert (30 min bei 11.000 rpm, 4°C). Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer aufgenommen.

Zur Gewinnung besonders reiner Plasmid-DNA, bspw. für Sequenzierarbeiten, wurden kommerzielle Kits verschiedener Hersteller nach dem jeweils angegebenen Protokoll verwendet: peqGOLD Plasmid Miniprep Kit (peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen) und GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot).

3.2.2.4 Mikrodilutionstest

Die verschiedenen *E. coli*-Stämme wurden über Nacht in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C angezogen. Die optische Dichte bei 600 nm wurde bestimmt und auf 0,1 eingestellt. Zudem wurden zur Promotorinduktion verschiedene Konzentrationen an IPTG zugegeben. In einer Mikrotiterplatte wurde in der ersten Reihe jeweils 90 µl Medium mit 10 µl Substanz versetzt und gemischt. Es folgte eine serielle 1:2 Verdünnung im gleichen Medium. Anschließend wurden pro well 50 µl Bakteriensuspension gegeben und die Platte bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit dem VersaMax (Molecular Devices, Sunnyval, USA) und der Software SofMaxPro 4.8.

3.2.3 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.3.1 Anzucht

S. cerevisiae-Kulturen wurden aerob in YPD-Vollmedium (10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Trypticase-Peptone, 20 g/l Glucose) oder Minimalmedium, SD (0,79 g/l CSM (MP Biomedicals, Solon, USA), 20 g/l Glukose, 1,7 g/l „Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfat“) bzw. SD-Ura (0,77 g/l CSM-Ura (MP Biomedicals, Solon, USA), 20 g/l Glukose, 1,7 g/l „Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfat“), bei 30°C auf

einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Kultivierung auf Festmedium erfolgte durch einen Zusatz von Agar Agar (1,8 %).

3.2.3.2 Transformation mit Lithiumacetat

(Gietz *et al.*, 1995)

S. cerevisiae wurde über Nacht in 50 ml YPD bei 30°C kultiviert. Anschließend wurde die OD bei 600 nm gemessen und mit YPD-Medium eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt. Nach einer Inkubation bei 30°C für 4 h wurden die Zellen 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, mit *A. dest.* gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml *A. dest.* vollständig resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation (10 sec, 13.000 rpm) wurden die Zellen in 1,5 ml Lithiumacetatlösung (100 mM Lithiumacetat, 1 x TE) resuspendiert. Dieser Zellsuspension wurden 100 µl entnommen und mit 100 µg Einzelstrang-DNA und der zu transformierenden DNA gemischt, mit 600 µl PEG/LiAcetat (50% PEG 4000, 100 mM LiAcetat, 1 x TE) versetzt und 15 sec gemixt. Anschließend erfolgte eine 30-minütigen Inkubation bei 30°C und der Probe wurden 70 µl DMSO zugesetzt und der Transformationsansatz vorsichtig invertiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 42°C wurde die Probe 1 min auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert (15 sec bei 13.000 rpm). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 500 µl Selektionsmedium resuspendiert und ausplattiert. Nach 2 bis 4 Tagen zeigten sich die transformierten Kolonien.

3.2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe

(Rose *et al.*, 1990)

Die Anzucht von 5 ml Hefe-Kultur in SD-Ura erfolgte für 24 h bei 30°C. Die Kultur wurde zentrifugiert (20 sec bei 13.000 rpm) und die pelletierten Zellen in 500 µl STE-Puffer (1 M Sorbitol, 50 mM Tris, 100 mM EDTA) resuspendiert. Zur Protoplastierung der Hefezellen wurde 100 u Lyticase zugegeben, der Ansatz gemischt und für 30 min bei 30°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Protoplastenbildung wurde durch Mikroskopieren überprüft. Nach der Zugabe von 50 µl 10% SDS erfolgte eine 30-minütige Inkubation im Wasserbad bei 65°C. Anschließend wurden 250 µl 2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8 zugegeben und auf Eis 30 min inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 min bei 13.000 rpm) pelletiert und die DNA im Überstand durch die Zugabe von 1 Vol Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm gefällt. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in *A. dest.* resuspendiert. Die Plasmid-DNA konnte zur Amplifizierung mittels PCR direkt verwendet werden oder sie wurde, wenn größere Mengen benötigt wurden, durch Transformation in *E. coli* angereichert.

3.2.3.4 Indirekte Immunfluoreszenz

(modifiziert nach Egner *et al.*, 1995)

Eine Über-Nacht-Kultur wurde auf eine optische Dichte (600 nm) von 0,2 eingestellt und bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wachsen gelassen. Die Zellen wurden fixiert durch die Zugabe von 1/10 Volumen 37% Formaldehyd und 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min) und mit 1 ml IF1 (100 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM EDTA) gewaschen. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 600 µl Lösung IF2 (100 mM Tris/HCl pH 9,4, 2% β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 10 min bei RT wurden die Zellen mit Sphäroplasten-Puffer (0,1 M NaCitrat pH 7, 60 mM EDTA, 1 M Sorbitol) gewaschen und die Zellwand durch die Zugabe von 1 ml Sphäroplasten-Puffer mit 1,6 % β-Mercaptoethanol und 250 U Lyticase durch eine 45-minütige Inkubation bei 30°C unter leichtem Schütteln lysiert. Die Sphäroplasten wurden einmal mit 1 ml Lösung IF3 (50 mM Tris/HCl pH 7,6, 20 mM EDTA, 1,2 M Sorbitol) gewaschen und darauffolgend einmal mit 1 ml PBS-T (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,08 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, 0,05% Tween 20). Anschließend wurden die Sphäroplasten in 100 µl PBS-T resuspendiert und auf Polylysin-beschichtete Objeträger (Polysin Slides, Thermo Scientific, Braunschweig) aufgetragen. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die restliche Flüssigkeit entfernt und die Sphäroplasten 6 mal mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,08 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄) gewaschen. Unspezifische Antikörperbindestellen wurden in einer 30-minütigen Inkubation mit Blocking-Puffer (PBS + 5% BSA) abgesättigt und der erste Antikörper 1:1000 verdünnt in Blocking-Puffer zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der erste Antikörper wurde entfernt durch 15faches Waschen mit PBS und anschließend der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte innerhalb von 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Durch 10maliges Waschen wurde der Antikörper entfernt und die Zellen mit DAPI gefärbt. Dazu wurde 1 µg/ml DAPI in PBS gelöst, für 2 min zu den Sphäroplasten gegeben und anschließend durch 3maliges Waschen mit PBS entfernt. Für die Mikroskopie wurde Einbettungsmedium (0,1 M Tris/HCl pH 8, 50% Glycerin, 1 mg/ml Phenylendiamin, pH 8,0; modifiziert nach Fischer & Timberlake, 1995) zugegeben.

3.2.3.5 Drop-Test

Die Kultur der *S. cerevisiae*-Stämme erfolgte in SD- oder SD-Ura-Medium, dem zur Induktion der Genexpression Galaktose als Kohlenhydratquelle zugesetzt wurde. Von einer Über-Nacht-Kultur in SD-Medium wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen und auf OD₆₀₀=1 eingestellt. Es folgte eine Verdünnungsreihe bis 10⁻⁴ im entsprechenden Medium.

Jeweils 10 µl Zellsuspension wurden auf SD-Agar, dem nach dem Autoklavieren verschiedene Substanzen zugesetzt wurden, pipettiert. Die Inkubation von 2 bis 10 d erfolgte bei 28°C.

3.2.3.6 Agardiffusionstest

Eine *S. cerevisiae*-Kultur wurde über Nacht in SD- oder SD-Ura-Medium bei 30°C schüttelnd inkubiert, am Folgetag die optische Dichte bei 600 nm bestimmt und auf $OD_{600}=1$ eingestellt. SD-Agar (mit oder ohne Uracil) wurde mit Galaktose hergestellt, autoklaviert und im Anschluss auf 50°C abgekühlt. Es wurden zu 50 ml flüssigen Agar 1 ml Hefesuspension zugegeben, der Ansatz gründlich gemischt und in Petrischalen mit einem Durchmesser von 145 mm gegossen. Nach Abkühlen wurden entweder Testblättchen (Durchmesser 1 cm) aufgelegt und die jeweilige Substanz darauf pipettiert oder Löcher von 1 cm Durchmesser gestanzt und bis zu 50 µl Flüssigkeit hineingegeben. Nach einer Inkubation von 2 d bei 28°C wurden die Hemmhöfe mit dem Lineal vermessen.

3.2.3.7 Bestimmung der Glutathionkonzentration

Die optische Dichte einer, in der exponentielle Wachstumsphase befindlichen Über-Nacht-Kultur von *S. cerevisiae* wurde auf $OD_{600}=1$ eingestellt. Zu den Zellen wurde Kupfersulfat (0,25 mM bzw. 1 mM) zugegeben und nach einer 6 h Inkubation bei 30°C unter Schütteln wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand zur Messung der Glutathionkonzentration verwendet. Die Konzentrationsbestimmung von GSH und GSSG erfolgte mit dem Glutathion Assay Kit (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) unter Verwendung von 10 µl Kulturüberstand. Die Messung erfolgte in 96well-Mikrotiterplatten mit dem VersaMax (Molecular Device, Sunnyval, USA).

3.2.4 Arbeiten mit Basidiomyceten

3.2.4.1 Anzucht von *Schizophyllum commune*

Die Anzucht von *S. commune*-Stämmen erfolgte auf CYM-Medium („Complex Yeast Medium“: 2 g/l Trypticase Pepton, 2 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Glucose, 0,5 g/l $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,5 g/l KH_2PO_4 , 1,0 g/l K_2HPO_4) (Schwalb & Miles, 1967), dem bei vorliegender Tryptophan-Auxotrophie eines Stammes 4 mM Tryptophan zugestzt wurde. Zur Verfestigung des Mediums wurden 20g/l Agar Agar zugegeben. Für die Inokulation wurden 5 mm² große Agarblöckchen einer gut gewachsenen Ausgangkultur entnommen und auf neues Medium

überführt. Die Kultivierung erfolgte aerob stehend oder schüttelnd ca. 5-7 d bei 28°C. Zur Gewinnung größerer Myzelmengen wurden Flüssigkulturen mit 1-2 cm Kultur angeimpft und für ca. 1 min in einem Labormixer (Laboratory Blender, Waring Commercial, Conneticut, USA) zerkleinert.

3.2.4.2 Anzucht von *Tricholoma* sp.

Myzel von *Tricholoma* sp. wurde aerob bei Raumtemperatur auf MMNb-Medium (Modifiziertes Melin-Nokrans Medium + Casein: 0,05 g/l CaCl₂, 0,025 g/l NaCl, 0,5 g/l KH₂PO₄, 0,25 g/l (NH₄)₂ HPO₄, 1 µg/l FeCl₃ *6H₂O, 0,1 mg/l Thiaminhydrochlorid, 0,15 g/l MgSO₄ *7 H₂O, 10 g/l Glucose, 20 g/l Malzextrakt, 1 g/l Pepton aus Casein, 1% Spurenelementlösung nach Fortin (3,728 g/l KCl, 1,546 g/l H₃BO₃, 0,845 g/l MnSO₄*7 H₂O, 0,575 g/l ZnSO₄*7 H₂O, 0,125 g/l CuSO₄*5 H₂O) (Melin, 1921; Nokrans, 1949; modifiziert nach Kottke *et al.*, 1987; Fortin & Piche, 1979) kultiviert, bei Festmedium erfolgte eine Zugabe von 20 g/l Agar Agar. Dafür wurden ca. 5 mm² große Agarstücke einer mindestens 4 Wochen alten, gut bewachsenen Ausgangskultur mit einer Lanzettadel ausgeschnitten und auf eine neue MMNb-Platte überführt. Submerskulturen wurden ebenfalls mit Agarblöckchen angeimpft und stehend bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.4.3 *In vitro* Mykorrhiza-Synthese

Für die Herstellung axenischer Kulturen wurden Baumkeimlinge steril angezogen. Die Baumsamen wurden zur Quellung über Nacht in Leitungswasser gelegt und am Folgetag durch eine ca. 1,5 bis 2 h Behandlung mit 30% H₂O₂ sterilisiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit sterilem *A. dest.* wurden die Samen auf Keimmedium (2 g Pipes in 1 l *A. dest.*, mit NaOH pH 7 einstellen, 0,1 g/l KH₂PO₄, 0,2 g/l NH₄NO₃, 0,1 g/l MgSO₄*7 H₂O, 0,1 g/l CaCl₂*2 H₂O, 1 µg/l FeCl₃*6H₂O, 1% Spurenelemente nach Fortin, 0,1 N H₂SO₄ zum Einstellen auf pH 5, 10 g/l Agar) (Genenger, 1997) verteilt und die Kulturen in einem Klimaschrank mit 12 h Tag-Nacht-Rhythmus mit Temperaturwechsel von 23 /17 °C bei 80 % rel. Luftfeuchte inkubiert. Nach ca. 4 Wochen, als die ersten Keimblätter ausgekeimt waren, wurden die Keimlinge auf MMNa-Synthesemedium (0,05 g/l CaCl₂, 0,025 g/l NaCl, 0,5 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l (NH₄)₂ HPO₄, 1 µg/l FeCl₃ *6H₂O, 0,1 mg/l Thiaminhydrochlorid, 0,15 g/l MgSO₄ *7 H₂O, 10 g/l Glucose, 20 g/l Malzextrakt, 1 g/l Pepton aus Casein, 1% Spurenelementlösung nach Fortin) (Melin, 1921; Nokrans, 1949; modifiziert nach Kottke *et al.*, 1987) bzw. L-MMN (0,05 g/l CaCl₂, 0,025 g/l NaCl, 0,5 g/l KH₂PO₄, 0,25 g/l (NH₄)₂ HPO₄, 1 µg/l FeCl₃ *6H₂O, 0,01 g/l Thiaminhydrochlorid, 0,15 g/l MgSO₄ *7 H₂O, 1 g/l Glucose, 1% Spurenelementlösung nach Fortin, 3 µg/l Na₂MoO₄, 0,1 g/l Myo-Inositol, 0,001 g/l

Nicotinsäure, 0,001 g/l Pyridoxin-HCl) (Langer *et al.*, 2008) überführt. Dazu wurde jeweils eine nasse, sterile Cellophanfolie (Wilhelm Isermann KG, Walsrode) auf den Agar gelegt, der Baumkeimling auf der Folie ausgerichtet und bei Bedarf 200-500 µl *A. dest.* hinzugefügt. Auf den Keimling wurde eine weitere sterile Folie gelegt. Die Kultivierung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Keimung der Samen. Nach der Bildung erster Seitenwurzeln wurde die Pilzkultur zugegeben. Dafür wurden 2-4 ca. 5 mm² große, gut bewachsene Agarblöckchen einer mindestens 4 Wochen alten Kultur an die Wurzel gelegt. Die Ausbildung einer Mykorrhiza dauerte bei diesen Bedingungen mindestens 3 bis 7 Monate.

3.2.4.4. Anfertigen von Dünnschnitten

Mykorrhizierte Kurzwurzeln wurden für mindestens 1 Woche in Fixierlösung (50 mM PIPES pH 6,7, 25 mM EGTA pH 8,0, 5 mM MgSO₄, 4 Vol.-% Formaldehyd, modifiziert nach Fischer & Timberlake, 1995) gelagert und anschließend im Gefriermikrotom Leica CM1100 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) geschnitten. Dazu wurden die Wurzeln vertikal auf einen auf mindestens -20°C abgekühlten Stempel aufgesetzt und langsam und schichtweise in „Tissue Freezing Medium“ (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) eingebettet. Damit das Medium vollständig gefrieren konnte, erfolgte vor dem Schneiden eine Inkubation der Wurzel bei mindestens -20°C für ca. 10 bis 60 min. Die Dünnschnitte mit einer Schnittdicke von 25 µm wurden anschließend auf einem Objektträger gesammelt und bis zur Mikroskopie in Fixierlösung gelagert.

3.2.4.5 *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation von *Tricholoma* sp.

Von einer gut bewachsenen Kultur von *Tricholoma* sp. wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette ca. 2 mm² entnommen und auf eine ca. 1 cm² große, auf MMNb-Agar aufgelegte Nylonmembran (Maschenweite 41µm, Technische Gewebe Sommer, Balingen) transferiert. Die Kultur wurde bei Raumtemperatur inkubiert bis das Myzel auf eine Größe von ca. 1 cm² gewachsen war. *A. tumefaciens* wurde 2 d bei 28°C in MM mit 100 µg/ml Kanamycin schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert und das Pellet in MM mit 100 µg/ml Kanamycin und 200 mM Acetosyringon resuspendiert und erneut bei 28°C für 6 h schüttelnd inkubiert. Die Zelldichte wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt und auf 0,1 bzw. 0,2 eingestellt. Pro Myzel wurden 50 µl *A. tumefaciens*-Suspension zugegeben. Nach 1 bis 2 d wurden die Membranen mit Myzel auf MMNb-Selektivplatten überführt. Diese Platten enthielten zur Selektion der Transformanten 25 µg/ml Hygromycin B (Cayla - InvivoGen, Toulouse, Frankreich) und zur Inhibierung von *A. tumefaciens* 200 µg/ml Cefotaxim und 100 µg/ml Ampicillin. Nach ca. 1 bis

2 Wochen konnte bei erfolgreicher Transformation ein Myzelwachstum beobachtet werden und die Membran wurde erneut auf Selektivplatten überführt.

3.2.4.6 Visualisierung der Transportereffluxaktivität

(Reimann & Deising, 2005)

Myzel von 1-2 Wochen alten *Schizophyllum commune*-Kulturen bzw. 3-4 Wochen alten Kulturen von *Tricholoma vaccinum* wurde aus Flüssigkulturen entnommen und in 1 ml destilliertes Wasser gegeben. Das Myzel wurde zentrifugiert und 30 min mit einen der beiden fluoreszierenden Transportersubstraten Ethidiumbromid (5 µg/ml) und Hoechst 33342 (20 µg/ml) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde das Myzel dreimal für 30 sec mit PBSE (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,5 mM NaH₂PO₄*H₂O, pH 7,2) gewaschen, in 0,8% NaCl-Lösung aufgenommen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Zur Mikroskopie wurden die Proben in Einbettungsmedium aufgenommen und mit dem Mikroskop Axioplan 2 (Zeiss, Jena) und dem Filter 02 (Zeiss) für mit Hoechst 33342 behandeltes und dem Filter 15 für mit Ethidiumbromid gefärbtes Myzel mikroskopiert. Die Dokumentation erfolgte mit der Digitalkamera SPOT-Junior und der Software SPOT Version 2.1 (Diagnostics instruments, USA).

3.2.4.7 Präparation genomischer DNA

3.2.4.7.1 Schnellisolierung genomischer DNA

(modifiziert nach Cenis, 1992)

Das Myzel wurde direkt von einer Agarplatte entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zum Zellaufschluss wurden die Hyphen mit einer Lanzettnadel in 300 µl DNA-Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 8,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) zerrieben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und eine Inkubation von 10 min bei -20°C. Der Ansatz wurde 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 1 Vol Isopropanol gefällt (25 min bei 13.000 rpm). Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in *A. dest.* resuspendiert.

3.2.4.7.2 Isolierung genomischer DNA mit CTAB

(Ausubel *et al.*, 1999; Rozman & Komel, 1994)

Myzel einer Flüssigkultur wurde mit Hilfe einer Nylonmembran (Maschenweite 41µm, Technische Gewebe Sommer, Balingen) abfiltriert, mit *A. dest.* gewaschen, zwischen

Papiertüchern getrocknet und mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu feinem Pulver zerrieben. Es wurden ca. 50 mg Myzel zu 600 µl DNA-Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 2% SDS) gegeben. Die NaCl-Konzentration wurde mit 5 M NaCl-Stammlösung auf 0,7 M eingestellt und dem Ansatz 80 µl CTAB (10% CTAB, 0,7 M NaCl) erwärmt auf 65°C, zugegeben. Nach einer 30- bis 60-minütigen Inkubation bei 65°C und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min bei 14.000 rpm, 4°C). Dem Überstand wurden zur Ausfällung der Proteine und Polysaccharide 600 µl Chloroform zugegeben und für 15 min auf Eis extrahiert. Nach einer Zentrifugation (10 min bei 14.000 rpm, 4°C) wurde die DNA-enhaltende, obere wässrige Phase abgenommen und wiederum mit 80 µl CTAB versetzt. Es folgte eine erneute Inkubation bei 65°C für 15 min, anschließend die Abkühlung auf Eis und die Extraktion mit 600 µl Chloroform für 15 min auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation (10 min bei 14.000 rpm, 4°C) wurde die obere wässrige Phase abgenommen und zur Reinigung der DNA die Extraktion ab Zugabe von Chloroform zweimal wiederholt. Zur Fällung der DNA wurde im Anschluss 2,5 Vol 98% Ethanol zugegeben, der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert oder bei -20°C eingefroren und anschließend zentrifugiert (10 min bei 14.000 rpm, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 50 µl 70% Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert (5 min bei 14.000 rpm, 4°C), getrocknet und in 60 µl *A. dest.* oder TE-Puffer resuspendiert. Zur Inaktivierung von DNasen erfolgte vor der Lagerung bei -20°C eine Erwärmung auf 70°C für 10 min.

3.2.4.8 Isolierung von Gesamt-RNA

(modifiziert nach Wendland *et al.*, 1996; Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit aktiver RNase wurden Puffer und Lösungen mit 0,1% DEPC-H₂O angesetzt. Dazu wurde *A. dest.* mit 0,1% DEPC versetzt und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. DEPC bewirkt eine irreversible Carbonylierung von Aminogruppen und inaktiviert somit Enzyme. Im Anschluss wurde das DEPC-H₂O autoklaviert, wobei DEPC in die nicht toxischen Bestandteile Ethanol und CO₂ zerfällt.

Das Myzel wurde mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben. Zu ca. 150 mg Myzelpulver wurden 400 µl REP (4% SDS, 0,15 M NaAcetat pH 5,0) und 400 µl saures Phenol/ Chloroform (1:1) zugegeben, der Ansatz für 30 bis 60 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min bei 14.000 rpm, 4°C). Die obere Phase wurde abgenommen und zweimal mit 400 µl saurem Phenol/ Chloroform (1:1) für 15 min auf Eis extrahiert und zentrifugiert (5 min bei 14.000 rpm, 4°C). Anschließend wurde zweimal mit 400 µl Chloroform für 15 min auf Eis extrahiert und zentrifugiert (5 min bei 14.000 rpm, 4°C). Die obere Phase wurde erneut abgenommen und die RNA mit 2,5 Vol 98% Ethanol gefällt

bzw. in Ethanol bei -80°C gelagert. Die Probe wurde zentrifugiert (30 min bei 14.000 rpm, 4°C), getrocknet und in 50 μl DEPC- H_2O resuspendiert.

Für besonders reine RNA, beispielsweise zur Verwendung in der Real-Time-PCR, wurde das RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet.

3.2.4.9 Synthese von cDNA

Für die Untersuchung von Transkripten wurde aus der RNA cDNA synthetisiert. Dabei wurde das „iScript cDNA Synthesis Kit“ (BIO-RAD, München) sowie, wenn cDNA-Fragmente über 1 kb Größe benötigt wurden, die SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.4.10 Untersuchung der Genexpression durch Mikroarray-Analyse

S. commune Myzel wurde unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und anschließend die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) isoliert (Tab. 3.5). Das Markieren der RNA, die Hybridisierung mit dem Biochip der Firma Febit holding GmbH (Heidelberg) und alle weiteren Schritte wurden von der Firma Febit durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte mit dem „preprocessCore package“ der Bioconductor Software (Gentleman et al., 2004).

Tab. 3.5 *S. commune*-Stämme zur Expressionsanalyse

Stamm	Genotyp, Behandlung	Herkunft
W21	$A_{1,1}; B_{1,1}$	*
4-39	$A_{1,1}; B_{3,2}$	*
12-43	$A_{3,5}; B_{2,2}; \text{ura}^-$	*
A6	$A_{3,5}; B_{\text{null}}::\text{bar2}^{\Delta\text{Pst1}}; \text{trp1}$	Gola & Kothe, 2003
G11	$A_{3,5}; B_{\text{null}}::\text{bar2}^{\Delta\text{Pst1}}\text{-HA-gfp}; \text{trp1}$	Nolden, 2002
T	$A_{3,5}; B_{\text{null}}::\text{bar2}; \text{trp1}$	Senftleben, 2009
T2G12V	konstitutiv aktive <i>ras1</i> -Mutante	Knabe, 2008
Cdc42	konstitutiv aktive <i>cdc42</i> -Mutante	Weber et al., 2005
Delta gap	F15 ($A_{1,1}; B_{1,1}; \Delta\text{gap}$) x F28($A_{4,6}; B_{3,2}; \Delta\text{gap}$)	Schubert et al., 2006
12-43 HSW	12-43 auf 1 :10 Haldensickerwasser	Anhang Tab. AT15 *
W22 _{ad} auf Opus	W22 _{ad} auf 1 mg/l Opus	*
W22 auf Cd	W22 auf 0,01 mM CdNO_3	*
12-43 x 4-39 Stein	Dikaryon auf Schwarzschiefer	*

* Die *S. commune* Stämme entstammen der Stammsammlung der Mikrobiellen Phytopathologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

3.2.5 Arbeiten mit Nucleinsäuren

3.2.5.1 Messung der Nucleinsäurekonzentration

(Lottspeich & Zorbas, 1998)

Die Messung der Nucleinsäurekonzentration erfolgte mittels NanoVue (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) bzw. spektralphotometrisch. Im Spektralphotometer (Unicam Helios Gamma & Delta, Cambridge, UK) erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Berechnung der Konzentration der Nucleinsäuren basierte auf den gegebenen Werten für $OD_{260}=1$, die 50 µg/ml dsDNA entspricht bzw. 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Probe wurde durch das Messen bei 280 nm überprüft. Bei einem Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} von 1,8 für DNA und 2,0 für RNA konnte von einer weitgehend proteinfreien Probe ausgegangen werden.

3.2.5.2 Gelelektrophorese

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in horizontalen Agarosegelen bei einer Spannung von 6,5 V/cm. Die Agarosegele wurden mit 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 8,0, 1 mM EDTA) hergestellt, dabei variierte die Konzentration je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente von 0,8 bis 3 % Agarose. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 0,1 Vol Ladepuffer (0,2% Bromphenolblau, 0,2% Orange G, 0,2% Xylencyanol FF, 50% Saccharose, 1 mM EDTA) versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde die DNA für 10 bis 20 min in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht detektiert. Die Dokumentation erfolgte mit dem Infinity Video-Dokumentationssystem (Vilber Lourmat, Eberhardzell) und der Software Infinity Capt Version 14.1a.

DNA-Fragmente, die im Anschluss an die Gelelektrophorese wieder aus dem Gel isoliert werden sollten, wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem JetSorb Gel Extraction Kit (GENOMED, Bad Oyeshausen) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

3.2.5.3 Restriktion von DNA

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte in 20 µl Ansätzen, denen 1 U Restriktionsenzym, und wenn nötig zur Entfernung der RNA RNase A (Sigma Aldrich, Steinheim), zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte bei der entsprechenden Restriktionstemperatur für 2 h bzw.

über Nacht. Bei der Restriktion von genomischer DNA wurde ein entsprechend großer Ansatz über Nacht mit 10 U Restriktionsendonuklease inkubiert.

3.2.5.4 Klonierung

(Dower *et al.*, 1988; Calvin & Hanawalt, 1988)

Für die Klonierung wurden die DNA-Fragmente und der Vektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert. Wenn nötig wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase (Antarctic Phosphatase, New England Biolabs GmbH, Frankfurt) nach Herstellerangaben behandelt, um durch die Entfernung des 5'Phosphatrests eine Selbstligation des Vektors zu verhindern und die Effizienz der Klonierung zu erhöhen. Insert und Vektor wurden in einem Verhältnis von 3:1 zum Ligationsansatz zugegeben, der zudem 0,1 U T4 DNA Ligase und Ligasepuffer in einem Volumen von 20 µl enthielt, und über Nacht bei 16°C inkubiert.

PCR-Fragmente wurden nach der Gelextraktion direkt in die PCR-Klonierungsvektoren pDrive (Qiagen, Hilden) bzw. pGEM-T Easy (Promega GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers kloniert.

3.2.6 Amplifizierung von DNA

3.2.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Saiki *et al.*, 1987)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels spezifischer oder degenerierter Oligonukleotide erfolgte mit der GoTaq DNA Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. In einem 20 µl Standard-Ansatz wurden 4 µl 5X Green- oder Colorless GoTaq Reaction Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 2 µl Primer (10 pmol/µl), 1 - 2 µl cDNA, genomische oder Plasmid-DNA (1 pg-1 ng), 0,5 U GoTaq DNA Polymerase eingesetzt und mit sterilem *A. dest.* auf 20 µl aufgefüllt. Degenerierte Oligonukleotide sowie solche mit auffälligen Sekundärstrukturen wurden vor dem Zugeben für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis dem übrigen PCR-Ansatz beigefügt.

Die Amplifizierung erfolgte im Thermoblock (T3 Thermocycler bzw. TGradient, Biometra GmbH, Göttingen). Nach einer initialen Denaturierung von 5 min bei 95°C folgten 30 bis 35 Zyklen mit 30 sec Denaturierung, 30 sec Bindung der Oligonukleotide und anschließender Elongation des gewünschten Fragments bei 72°C. Als letztes wurde ein

Endpolymerisationsschritt von 10 min durchgeführt. Sollte das Fragment anschließend in einen PCR-Klonierungsvektor kloniert werden, wurde dieser Schritt bis auf 1 h verlängert.

Die Bindungstemperatur der Oligonukleotide basierte auf deren GC-Gehalt und die Polymerisationsgeschwindigkeit wurde anhand des gewünschten Fragments ermittelt, wobei von einer Geschwindigkeit von 1 kb/min ausgegangen wurde.

Zur Vermeidung von Fehlern während der Amplifikation wurde bei sensiblen Anwendungen die High Fidelity Pol von JenaBioscience (Jena) verwendet. Dieser thermostabile Polymerase-Mix besteht aus Taq DNA Polymerase und einem Enzym zur Fehlerkorrektur. In einem 20 µl Ansatz wurden 1,25 U High Fidelity Pol und 2 µl Puffer eingesetzt. Alle anderen Komponenten wurden wie im Standard-Ansatz beschrieben eingesetzt. Bei der Amplifikation wurden folgende Modifikationen vorgenommen: die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 2 min, danach folgten 30 Zyklen mit 20 sec Denaturierung bei 95°C, 30 sec Annealing und Elongation 1 kb/min bei 68°C. Die Endpolymerisation erfolgte wiederum bei 68°C und 1 kb/min.

3.2.6.2 Thermal Asymmetric InterLaced-PCR (TAIL-PCR)

(Liu & Whittier, 1995)

Durch die Anwendung der TAIL-PCR konnten unbekannte DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass sowohl ein sequenzspezifischer als auch ein willkürlicher degenerierter Primer, dessen Schmelztemperatur unterhalb des sequenzspezifischen liegt, eingesetzt werden. Als degenerierte Primer wurden TAIL1-TAIL6 (Yamagishi *et al.*, 2002) verwendet. Zuerst erfolgte die Bindung der TAIL-Primer bei niedriger Temperatur an unbekannte Sequenzen, danach konnten unter stringenten Bedingungen die spezifischen Primer an das bereits bekannte Fragment binden. Abwechselnde Zyklen mit stringenten und nicht stringenten Bedingungen ermöglichten die Amplifikation der unbekannt Sequenz. Zur Steigerung der Produktspezifität wurden nach dem Prinzip der „nested-PCR“ zwei weitere PCR-Reaktionen nachgeschaltet, wobei die spezifischen Primer näher in Richtung der unbekannt Sequenz lagen. Die dritte PCR wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und, wenn nur ein Fragment detektiert werden konnte, dieses kloniert und sequenziert oder bei mehreren interessanten Fragmenten mit einem Southern Blot genspezifische Amplifikate identifiziert.

3.2.6.3 3`Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR (3`RACE-PCR)

(Frohman, 1993)

Zur Untersuchung eines Genendes wurde das Verfahren der 3`RACE-PCR angewandt. Dabei wurde als Template cDNA eingesetzt. Als Oligonukleotide dienten ein genspezifischer Primer sowie ein Primer, der an den A-Überhang des Transkripts bindet.

3.2.6.4 RNA Ligase-Mediated-RACE-PCR (RLM-RACE)

(modifiziert nach Schaefer, 1995)

Der Transkriptionsstartpunkt eines Gens kann mit Hilfe der RLM-RACE-PCR ermittelt werden. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass intakte RNA-Fragmente durch eine 5` gelegene 7-Methylguanosin-CAP-Struktur geschützt sind und degradierte RNAs und Nicht-RNA-Moleküle dephosphoryliert werden können. Somit können in einem ersten Schritt intakte Gesamt-RNAs isoliert werden. Nach einem Reinigungsschritt wird von der intakten RNA die CAP-Struktur so entfernt, dass ein Phosphatrest übrig bleibt. Im Anschluss wird ein RNA-Oligonukleotid mit Hilfe der T4 RNA-Ligase angehängt und über eine PCR mit einem genspezifischen und einem Primer komplementär zum Oligonukleotid die Region um den Transkriptionsstartpunkt durch die Synthese von cDNA amplifiziert und das Produkt sequenziert.

Die Dephosphorylierung erfolgte mittels Calf Intestinal Phosphatase (CIP, New England Biolabs, Frankfurt) in einem 20 µl Ansatz, dem 5 µg Gesamt-RNA, 2 µl CIP-Puffer, 10 U CIP und 40 U RNaseOut (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zugegeben wurden. In dieser sowie in allen folgenden Reaktionen wurde mit DEPC-H₂O gearbeitet. Der Ansatz wurde gründlich gemischt und bei 37°C für 1 h inkubiert, kurz zentrifugiert und auf Eis abgekühlt. Es folgte eine Phenol:Chloroform-Extraktion, bei der dem Ansatz 80 µl DEPC-H₂O und 100 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt wurden. Der Ansatz wurde für 30 sec gemischt, 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Tube überführt. Es wurden 10 µl 3 M Natriumacetat, pH5,2 und 1 µl Glykogen (20 mg/ml, Fermentas, ST. Leon-Rot) zugegeben und gründlich gemischt. Nach der Zugabe von 2,5 Vol 95% Ethanol wurde der Ansatz 60 min bei -20°C inkubiert, im Anschluss bei 4°C und 14.000 rpm für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut bei 4°C und 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde in 17,75 µl DEPC-H₂O durch eine Inkubation von 5 min bei 55°C resuspendiert. Von diesem Ansatz wurde 1 µl abgenommen, um später die Effizienz der RNA-Fällung zu überprüfen. Als nächster Schritt folgte die Entfernung der CAP-Struktur mittels Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP), bei der ein 5`-Phosphat an der RNA erhalten

bleibt. Zu den 16,75 µl dephosphorylierter RNA wurden 2,5 U TAP (Epicentre Biotechnologies, Madison, USA), 2 µl TAP-Puffer und 40 U RNaseOut zugegeben, gründlich gemischt, 1 h bei 37°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Es schloss sich wiederum eine Phenol:Chloroform-Extraktion an, bei der zum Schluss das Pellet in 5 µl DEPC-H₂O resuspendiert wurde. Die Ligation erfolgte durch Zugabe von 2 µg RNA-Oligonukleotid zur RNA. Zur Aufwindung von Sekundärstrukturen wurde der Ansatz 5 min bei 65°C inkubiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Danach wurden noch 20 U T4 RNA Ligase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt), 2 µl 10X Ligase Puffer, 40 U RNaseOut und 10 µl PEG 8000, 40 % zugegeben. Nach gründlichem Mischen erfolgte eine Inkubation bei 16°C über Nacht. Die RNA wurde durch eine erneute Phenol:Chloroform-Extraktion gereinigt und in 12 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe der SuperScript III Reverse Transkriptase nach Herstellerangaben (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Im Anschluss wurde eine PCR mit einem genspezifischen und einem zum RNA-Oligonukleotid komplementären Primer durchgeführt.

3.2.7 DNA-DNA-Hybridisierung

3.2.7.1 Herstellen DIG-markierter Sonden

Die Herstellung DIG-markierter Sonden erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls „DIG-System für Filterhybridisierung“ (Boehringer, Mannheim). Dabei wurden 10 ng - 3 µg DNA bei 95°C für 10 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Es wurden 2 µl Hexanukleotidmix, 2 µl DIG-labeling Mix und 2 U Klenow Enzym zu 15 µl denaturierter DNA zugegeben und der Ansatz mindestens 20 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt und 1:2000 in DIG-Standardhybridisierungspuffer (5x SSC, 0,1% N-Lauroylsarcosin, 1% Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim), 0,02% SDS) verdünnt.

3.2.7.2 Southern-Blot

(Southern, 1975; Sambrook *et al.*, 1989)

Mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA bzw. ein PCR-Ansatz wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert. Wurden DNA-Fragmente mit einer Größe von mehr als 5 kb erwartet, wurde die DNA zuerst mit 250 mM HCl für 10 min depurinieren. Sonst wurde direkt nach der Dokumentation das Agarosegel 30 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) geschwenkt, mit *A. dest.* kurz gespült und anschließend 30 min mit Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 3 M NaCl) behandelt. Das Gel wurde in 20 x SSC (0,3 M Na₃Citrat, 3 M NaCl, pH 7 – 8) getränkt

und auf die ebenfalls in 20 x SSC getränkte amphoterische Nylonmembran (Parablot NY amp, Marchery-Nagel, Düren) luftblasenfrei aufgelegt. Umhüllt von je 3 Lagen mit 20 x SSC behandeltem Whatman-Papier wurde der gesamte Blot auf Papiertücher gelegt, über Nacht in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit Gewichten beschwert. Die Übertragung der Nukleinsäuren erfolgte nach dem Prinzip des horizontalen Kapillarblots, bei dem die DNA durch den Flüssigkeitsstrom auf die Membran übertragen wurde. Die Fixierung an die Membran erfolgte durch 2-3 min UV-Bestrahlung. Im Hybridisierungssofen wurde zur Absättigung unspezifischer Nukleotidbindestellen die Membran für mindestens 2 h mit DIG-Standardhybridisierungspuffer (20 ml/100 cm² Membranfläche) bei 55°C bzw. 68°C vorbehandelt. Die DIG-markierte Sonde wurde bei 95°C für 10 min denaturiert und die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Die Membran wurde anschließend 2 x 5 min mit 2 x WASH-Puffer (2 x SSC, 0,1% SDS) bei Raumtemperatur und 2 x 20 min mit 0,5 x WASH-Puffer (0,5 x SSC, 0,1% SDS) bei 55°C bzw. 68°C gewaschen, um so die restliche Sonde zu entfernen. Es folgte ein 2-minütiger Waschschrift mit Detektionswaschpuffer (0,1 M Maleinsäure pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,3 Vol.-% Tween 20) bei Raumtemperatur. Um unspezifische Antikörperbindestellen abzusättigen wurde die Membran mindestens 30 min mit Hybridisierungslösung (0,1 M Maleinsäure pH 7,5, 0,15 M NaCl, 1% Blocking-Reagenz) inkubiert. Die Bindung der Antikörper erfolgte anschließend durch eine 30-minütige Inkubation mit Hybridisierungslösung, der Anti-Digoxigenin-Antikörper gekoppelt mit alkalischer Phosphatase in einer Verdünnung von 1:10.000 zugegeben wurde. Ungebundene Antikörper wurden durch zwei Waschschriffe mit Detektionswaschpuffer für je 15 min entfernt, die Membran anschließend 3 min mit Detektionspuffer (10 mM Tris/HCl pH 9, 10 mM NaCl) inkubiert und das Substrat CSP-Star (Roche Diagnostics, Mannheim) direkt auf die Membran gegeben. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen, ein Film (CL-XPosur, Thermo Scinentific, Rockford, USA) aufgelegt und nach einer Inkubationszeit von wenigen Minuten bis über Nacht konnte die Chemolumineszenz detektiert werden.

3.2.8 Sequenzierung, *In silico*- und phylogenetische Analysen

Die Sequenzierarbeiten erfolgten durch die JenaGen GmbH (Jena) bzw. wurden von GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

DNA bzw. Proteinsequenzen wurden mittels „DNASTAR“ (Lasergene, Madison USA) ausgewertet, zudem wurden Chromatogramme von Sequenzierungen mit BioEdit bearbeitet. Zur Berechnung der Signifikanz mit dem t-Test sowie für die Darstellung von Diagrammen wurde das Programm SigmaPlot 9.0 verwendet.

Die Hydrophobizitätsanalysen wurden mit dem Programm *HMMTOP* Version 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>, G.E Tusnady and I. Simon, 2001) durchgefuhrt, die

Darstellung der Transmembrandomänenstruktur erfolgte mit dem Programm TOPO2 (<http://www.sacs.ucsf.edu/TOPO-run/wtopo.pl>). Die Analyse der Domänen erfolgte mit pfam (<http://pfam.janelia.org/>, Finn *et al.*, 2010) durchgeführt.

Die Aminosäuresequenzen wurden aus den vollständig sequenzierten und veröffentlichten Genomen der Pilze mit Hilfe von blastp-Analysen herausgesucht (Tab. 4.1). Das Alignment der Proteinsequenzen wurden mit MAFFT v6 (Kato & Toh, 2008) unter Verwendung von BLOSUM80 Aminosäure Substitution Matrix und E-INS-i Option durchgeführt. Treefinder (Version Oktober 2008, Jobb *et al.*, 2004) wurde zur Bestimmung der Maximum Likelihood-Stammbäume benutzt, unter der Verwendung von 1000 Replikaten mit LR-ELW. Das verwendete Aminosäure-Substitutionsmodell (MIX[Dayhoff, BLOSUM, JTT, LG, PMB, VT, WAG, mtREV, mtMam, mtArt, cpREV, rtREV, betHIV, witHIV] [Optimum,] :G [Optimum]:5) wurde ebenfalls mit Treefinder ausgewählt. Die Bearbeitung der phylogenetischen Stammbäume erfolgte mit FigTree v.1.2.3 (Rambaut, 2009).

Tab. 3.1 Verwendete Organismen zur Stammbaumanalyse

Organismus	Genom-Homepage (Stand 05/2010)
<i>Agaricus bisporus</i> var <i>bisporus</i> (H97) v2.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Broad Institute of MIT and Harvard, http://www.broadinstitute.org
<i>Aspergillus niger</i> v3.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Candida albicans</i> WO1	Broad Institute of MIT and Harvard, http://www.broadinstitute.org
<i>Coprinopsis cinerea</i> Okayama7	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Heterobasidion annosum</i> v1.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Laccaria bicolor</i>	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Magnaporthe grisea</i>	Broad Institute of MIT and Harvard, http://www.broadinstitute.org
<i>Malassezia globosa</i>	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Melampsora laricis-populina</i> v1.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Mucor circinelloides</i> CBS277.49, v2.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	Broad Institute of MIT and Harvard, http://www.broadinstitute.org
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> v2.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Phycomyces blakesleeianus</i> NRRL1555 v2.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Pleurotus ostreatus</i> PC9 v1.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Postia placenta</i> MAD-698	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	http://www.yeastgenome.org/
<i>Schizophyllum commune</i> v1.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Schizosaccaromyces pombe</i> 972h	Broad Institute of MIT and Harvard, http://www.broadinstitute.org
<i>Serpula lacrymans</i> S7.9 v1.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Sporobolomyces roseus</i> v1.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/
<i>Tremella mesenterica</i> Fries v1.0	DOE Joint Genome Institute, http://www.jgi.doe.gov/

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung von *mte1* aus *Tricholoma vaccinum*

4.1.1 Isolierung und Charakterisierung von *mte1* aus *T. vaccinum*

Proteine der MATE-Familie sind am Efflux toxischer Substanzen beteiligt und spielen somit für die Zelle eine wichtige Rolle bei der Detoxifikation. Ein Gen der MATE-Familie, *mte1*, aus *T. vaccinum* wurde isoliert und charakterisiert.

Durch Differential Display-Experimente konnten Gene identifiziert werden, deren Expression spezifisch während der Symbiose zwischen *T. vaccinum* und *Picea abies* hochreguliert war (Krause & Kothe, 2006). Das Genfragment mit der Nummer KI5r8-26 konnte der MATE-Familie zugeordnet werden. Ausgehend von dem 505 bp großen Fragment wurde das gesamte Gen *mte1* aus *T. vaccinum* mit verschiedenen PCR-Methoden isoliert. Mit den Primern MATE fwd, MATE up1 und MATE up5 konnte in einer TAIL-PCR mit verschiedenen TAIL-Primern ein ca. 400 bp großes Fragment in 5' Richtung amplifiziert werden. In einer weiteren TAIL-PCR unter Verwendung nur eines spezifischen Primers MATE upA0 und dem TAIL 2-Primer wurde ein ca. 500 bp großes Fragment vervielfältigt.

In den veröffentlichten Genomsequenzen der Basidiomyceten *Laccaria bicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* und *Coprinopsis cinereus* wurden homologe Gene zu *mte1* gesucht und aus den im Alignment ersichtlichen konservierten Regionen degenerierte Primer abgeleitet (Anhang Abb. A1). Mit den Primern DegM1 und Mup 6 konnte aus cDNA von *T. vaccinum* ein ca. 1 kb großes Fragment amplifiziert werden. Die dazugehörige genomische Sequenz wurde mit den Primern gMDNA1 und Mup6 mit einer Größe von ca. 1,7 kb ermittelt. Das Genende konnte mit Hilfe einer 3'RACE-PCR identifiziert werden. Die Primer OligodT-1 und MATEdo4 wurden in einer PCR-Reaktion mit cDNA eingesetzt und lieferten ein ca 450 bp großes Fragment, dass das Genende von *mte1* sowie ein Polyadenylierungssignal besitzt (Abb. 4.1).

Die Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes erfolgte mit der RLM-RACE-PCR. Die eingesetzte Gesamt-RNA von *T. vaccinum* wurde dephosphoryliert, die CAP-Struktur entfernt, das RNA-Oligonukleotid an die RNA gebunden und mit Reverser Transkriptase die RNA in cDNA umgeschrieben. Die darauffolgende PCR wurde mit den Primern Racer5 und RLM-RACE 1 bzw. RLM-RACE 2 durchgeführt. Aufgrund der Vielzahl von Banden wurde die PCR mittels Southern-Blot-Analysen unter stringenten Bedingungen auf *mte1*-ähnliche Sequenzen überprüft und 2 Banden isoliert und sequenziert. Es konnten 2 alternative Transkriptionsstartpunkte für *mte1* ermittelt werden, wobei sich der zweite 63 nt hinter dem

ersten Startpunkt befand (Anhang, Abb. A2). Das gesamte Gen *mte1* von *T. vaccinum* ist 2579 bp groß und besitzt 15 Introns. Die cDNA-Sequenz mit 1770 bp codiert für ein 590 AS großes Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 64,8 kDa.

M S S T L A H Y Q G P T S L P S D Y A L

```

1  AATTC TTC A TCATTGATCA  TATGTC TTCA  ACATTAGCGC  ACTACCAAGG  ACCAACTTCT  CTGCCTTCAG  ACTATGCTTT
  L S R Y A G N H P E E Q H S Q M E S D D E L T D N E S
81  GCTTCGCGC  TATGCTG GGA  ACCATCCGGA  AGAACAACAC  AGCCAAATGG  AATCTGATGA  CGAGTTGACA  GATAATGAAT
  T A R L N S T L R R A S A P A P R C L R P Q R S L G
161  CGACGCTCG  TTTAAATAGT  ACATTGC GCA  GGGCTAGTGC  GCCCGCACCA  CGCTGCTTTC  GTCCCAACG  CTCCTTGGT
  P M T S H P H H F A H I P L P G P I P S E N T P L N
241  CCAATGACCT  CTCATCCTCA  CCATTTGCG  CACATTCCAT  TACCAGTCC  AATTCCTTCG  GAAAACACGC  CGTGCTCAA
  P P V P R I D E P I E Q T S D D G S K M L I F W E E L
321  TCCTCCAGTT  CCTCGTATAG  ATGAGCCAAT  AGAACAACGC  TCTGATGACG  GCAGCAAGAT  GTTAATCTTC  TGGGAGGAGT
  R I L T R Y A L P V F A
401  TACGAATCCT  AACTAGATAT  GCTTACCTG  TTTTGGCGTC  AGTTC TGGA  TGGTGT TTTCT  ATGCTGCAGT  GGTACTTACT
  T H V L E F S L I M A S V V S I G H L S T T
481  CTCTCCTTTG  ATAGAACTCA  CGTATTGGAG  TTCAGTCTAA  TCATGGCTTC  TGTGT TTTCT  ATCGGTCA TC  TGTCTACTAC
  A L A A I T L G S M T A N V S G F S I I Q G F T S A L
561  TGCTTTTGCT  GCCATCAGT  TGGGTCAAAT  GACCCAAAT  GTTTCAGGTT  TCAGTATTAT  TCAAGCTTTT  ACCAGTGGTT
  D T M L P S A W T S S Q P Q L V G L W A Q R M S
641  TGGATACAAT  GCTTCCTTCG  GCATGGACAT  CTTCTCAGCC  TCAATTGGTC  GGGCTGTGGG  CCCAGCGTAT  GAGTCCGTCG
  V V M A G L L V
721  ATGATATTCG  TTTGACATTC  GTTGTGCACA  TCTGACTTTA  CAAATCCATC  AGCTGTCGTA  ATGGCTGGTT  TATTAGTAGT
  P T L C I W W N
801  AAGACTTAGA  CTTTAAATCT  CTAGTGTGTT  GTCTGACTGG  ACGTCGGATT  GCCCTCAGCC  CACACTTTGT  ATATGGTGGA
  A E S I L L F V K Q D P E V A R L A A I Y L R W V S
881  ATGCTGAAAG  TATTCTCCTT  TTCGTCAAAC  AAGATCCAGA  GGTGTCGCTG  CTCGCTGCTA  TATATCTTCG  TTGGGTGTCT
  L G L P A Y A F
961  TTGGGACTGC  CAGGTATCGC  ATCTTCACTT  TCGGGTCTGA  CAACATATTG  TTGACAAAGC  CACCTAATTA  GCTTATGCTT
  N C V S R R Y F Q
1041  TTAACGTGTG  CAGCCGGTAA  GTCCGAAAT  TTCCCAAAAT  ACATTACCTG  TCTGACCTTT  GGTACCAAGA  CCGTATTTC
  S Q G L F A V P T R
1121  AGTCCCAAGG  TCTGTTGTTT  TCGCTGTTTG  GAAGAGACCT  TATTCATTTG  CGAGCGTAGG  TCTCTTTGCC  GTTCCACCTC
  I I L I V A P I N V I L N Y M L
1201  GAATTATTCT  TATAGTGGCG  CCTATCAATG  TTATTCTAAA  TTACATGCTA  GGTACTTCTA  CCACAGTTTG  TCTTATTCGT
  V W G P E Q I R L G F I G A P I A T A I S
1281  TGCTTTGACT  TTCTACAGTG  TGGGGCCCG  AGCAGATTCG  TTTAGGTTTC  ATGGCGCGC  CGATCGCAC  GGCAATATCT
  F N L V S F M S I F Y G V F Y V P R T A W Q P L S R R
1361  TTTAATCTCG  TATCGTTTAT  GTCTATATTT  TATGGCTCT  TCTACGTGCC  TCGCACAGCA  TGGCAACCTC  TGTCTCGTCG
  T F T S L G V L V Q L G L A G V
1441  CACATTTACA  AGCCTTGGAG  TGTGGTGCA  GCTGGGCTA  GCGGGAGTAG  GTACGTGAAT  TGAATTTTCG  TCTAAGCTCC
  G Q T A T E W W A W E L V A L A A S
1521  TCGTTGAACA  GGGTAATATT  TCGTAGGCCA  AACGGCGACG  GAATGGTGGG  CTGGGAACT  TGTGGCTCTT  GCGGCTCTT
  L G P L E L A T
1601  TGTAGCTTGA  TTTTCCCTT  TCTGTCTTG  CCATATGTT  AACGCTATCT  CATA CAGATT  AGGCCTCTT  GAGCTTGCTA
  Q S V L L V S A S T T F Q A P F A L G V A T S V R
1681  CTCATCCCGT  ACTCTTGGTT  TCTGCCTCGA  CTACTTTCCA  GGCCCCATTT  GCGCTTGGCG  TAGCGACCTC  CGTTCGGTGT
  I G N L L G E G K A L
1761  GCTAATCACT  CTATTATTAT  ACCTCCTCGT  TTACCTATTC  TGCACCAGCA  TTGAAATCT  ACTGGGAGAG  GGGAAAGCAC
  R A G I S S N T A I V M A L A L S V A S
1841  TGGCTGCTGG  AATTTCTTCA  AACACGGCAA  TTGTGATGGC  ACTTGGCTCTG  TCTGTCGCTT  CAAGGTATGG  TCCTCGGCGT
  S T M F L L F R H S W A Y L
1921  GAGTTGC GCA  ATGTGATTTT  ATTGTAGGTG  ACCCATTAGT  ACCATGTTTC  TTCTATTTCC  ACATTCTTGG  GCATATCTGT
  F N N D P E V V T L
2001  TCAACAACGA  TCCTGGTGAG  CTTCTTGTGC  TGTATTGCCG  TCGTCATGAG  GTTCAACCTC  AATCAGAGTT  CGTCACTTT
  V A S I L P L V A L F Q V F D G N S A I T S G I L R S
2081  GTGGCATCTA  TTCTCCGCT  GGTCCGCTTG  TTTCAGGTTCT  TTGATGGAAA  TTCTGCCATC  ACTTCAGGCA  TCTTGAAGTC
  R G K Q V Y T G A
2161  CAGAGGAAA  CAGGTATATA  TGGTCTTCTC  TTACTTCATT  TATATGTCGT  AATATTCCTG  GTGTTAGGTA  ACTGGAGCCC
  L L N L S A Y Y I I
2241  TCCTGAATCT  CAGTTCAGTT  TTCCAAATAT  ATTTGGTCTC  ACATCGCTTA  TAGGTTCCCA  TTAGCGCATA  TTACATCATC
  G L P F G M W M T F
2321  GGTAGGTAAT  TTTGCGACAT  CGCAGGAATC  CATTACCAC  TGTCCCTCCT  AGTCTTCC  TTCGGAATGT  GGATGACATT
  G W G M R L S G L W I G L T V S L I Y C A L V G T W L
2401  TGGTTGGGG  ATGAGGCTGT  CTGGTCTGTG  GATTGGCTTG  ACGGTTTCTT  TGATATATTG  TGCCTTGGTT  GGAAC TTGGT
  C L R T D W D H E V W K V M R R L K E Q D K I R R A
2481  TGTGCTGCG  TACGGATTGG  GATCACGAAG  TGTGGAAGGT  CATGAGAAGG  CTGAAGGAAC  AAGATAAAAT  TCGAAGGGCA
  E A D E E D R L L P S S *
2561  GAAGCAGATG  AAGAAGATCG  CCTCTCCCA  AGCTCGTGAG  CGCAACCGAG  TCGAGCCACT  GTTGT TTGTT  CCTACAACGC
2641  TTTTAAAGTA  GTTAAACAAG  ACCTGAAC TA  ATATAGTGAA  TTGAATCTCT  CAAATACAAT  TTTACAATGC  TGAAACTGGT
2721  CCAAGGCATC  ATGATCAATA  ATCTCTCCG  GTACCCCTGA  AGAGCCATAA

```

Abb. 4.1 Sequenz von *mte1*

Dargestellt ist die Sequenz von *mte1* sowie die translatierten Aminosäuren des Proteins MTE1. Exonbereiche sind grau unterlegt. Die Sequenz beginnt mit dem mittels RLM-RACE-PCR ermittelten Transkriptionsstartpunkt. Der zweite alternative Proteinanfang ist rot umrahmt und zeigt in der Sequenz anstelle des CTG ein ATG für Methionin (in der Sequenz nicht dargestellt). Das Polyadenylierungssignal (AATAAA) ist grün umrahmt.

Die Introns sind im gesamten Gen verteilt und weisen eine Größe von 47 bp bis 60 bp auf (Abb. 4.2). Am 5`Ende des Gens ist kein Intron vorhanden, das erste und größte Exon geht bis zur Position 416 bp, erst danach folgen in geringeren Abständen die 15 Introns. Das kleinste Exon besteht aus lediglich 19 bp, weiterhin kommen noch 4 Exons mit weniger als 30 bp hinzu. Ein Vergleich mit Intronpositionen in MATE-Genen anderer Basidiomyceten zeigte keine Übereinstimmung.



Abb. 4.2 Intronverteilung in *mte1*

Die Introns, dargestellt als rote Balken, sind anhand ihrer Position und Größe im Gen eingezeichnet.

Das Protein Mte1 enthält konservierte Bereiche, darunter zwei MatE-Domänen und eine NorM-Domäne (NCBI conserved domain search, Marchler-Bauer & Bryant, 2009). Weitere konservierte Regionen konnten ebenfalls zugeordnet werden und können Hinweise auf die Funktion von Mte1 geben (Abb. 4.3).

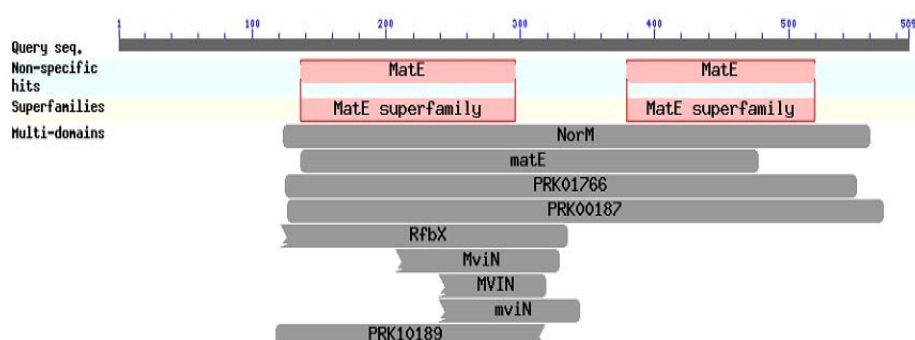


Abb. 4.3 Konservierte Regionen in Mte1

Die Domänensuche erfolgte über ein Proteinblast in NCBI. Dargestellt ist die Lokalisierung der Domänen in Mte1. Neben den zwei MatE-Domänen befinden sich eine NorM- und eine matE-Domäne sowie eine PRK1766-, PRK00187- und PRK10189-Domäne im Protein, welche alle mit Transportern der MATE-Familie im Zusammenhang stehen. Weiterhin konnten geringe Ähnlichkeiten zu RfbX-, MviN- und PRK10189-Domänen gefunden werden.

Die MatE superfamily-Domänen sind in der Mte1-Sequenz von Aminosäure 136 bis 296 und von 379 bis 519 lokalisiert und geben eine Zugehörigkeit zur MATE-Familie an. Weiterhin können Teile des Gens zu anderen Domänen zugeordnet werden, die mit MATE-Proteinen in Verbindung stehen. Das betrifft die NorM-, matE-, PRK1766-, PRK00187- und PRK10189-Domänen. Eine geringe Ähnlichkeit in der Mte1-Sequenz findet sich zu RfbX, beschrieben als Domäne, zu denen Membranproteine gehören, die das bakterielle O-Antigen und Teichonsäure bei grampositiven Bakterien transportieren können. Zudem gibt es drei MviN-Domänen, die in Zusammenhang mit Virulenz und Symbiose stehen.

Die Lokalisierung von Mte1 in der Plasmamembran bedingt, dass es transmembrane Strukturen besitzen muss. Die Hydrophobizitätsanalyse mit HMMTOP 2.0 ergab, dass das MATE-Transporterprotein 12 mögliche Transmembrandomänen aufweist (Abb. 4.4).

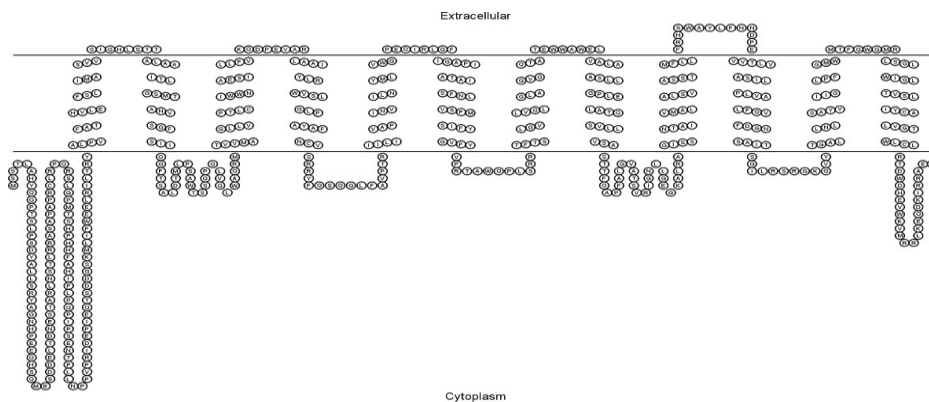


Abb. 4.4 Transmembrandomänenstruktur von Mte1.

Die Analyse der Transmembrandomänen erfolgte mit HMMTOP 2.0, die Darstellung mit TOPO2.

4.1.2 Phylogenetische Analyse

Die Erstellung eines Stammbaums erfolgte mit MATE-Proteinen von Vertretern der Basidiomyceten, Ascomyceten, Chitridiomyceten und Zygomyceten, wobei der Schwerpunkt auf die Basidiomyceten-MATEs gelegt wurde (Abb. 4.5). Die Sequenzen wurden aus den Genomen übernommen und bis auf die Entfernung eines Introns bei *S. commune* Mte1 beibehalten. Bei den Sequenzen von *P. chrysosporium* 131238 und *L. bicolor* 143199 wurde im Genom im Bereich des 5' Endes der korrekte Anfang des Gens gesucht, der aufgrund der automatischen Annotierung nicht an der richtigen Position berechnet worden war. Bei *L. bicolor* 244618 und *P. chrysosporium* 39185 konnte der Genanfang nicht korrigiert werden, weil im 5' Bereich kein in Frage kommendes Startcodon vorhanden war. Die blastp-Analyse im Genom des Braunfäule-Pilzes *P. placenta* ergab Übereinstimmungen mit mehreren Proteinen. Aufgrund von Unstimmigkeiten in den Sequenzen, die im Alignment sichtbar wurden, wurde in der phylogenetischen Analyse lediglich ein Protein (ID 91790) berücksichtigt. Pflanzliche, menschliche und bakterielle Proteinsequenzen gut untersuchter MATE-Transporter wurden in den Stammbaum mit aufgenommen.

Aus dem phylogenetischen Stammbaum wird ersichtlich, dass verschiedene Unterfamilien von MATE-Proteinen bei Pilzen gefunden werden können. Während der Evolution kam es früh durch eine Genduplikation zur Entwicklung eines eher allgemein vorkommenden pilzlichen MATE-Proteins, das in Basidio-, Asco-, Chitridio- und Zygomyceten im Genom existiert und eines zweiten MATE-Transporterproteins, das nur in Ascomyceten bzw. Basidiomyceten vorkommt. Asco- und Basidiomyceten clustern immer deutlich in zwei Ästen im Stammbaum,

so auch in der allgemein pilzlichen MATE-Gruppe. Lediglich *M. lacaris-populina* 73831 wird hier nicht bei den Basidiomyceten-MATEs eingeordnet, sondern clustert zusammen mit den Ascomyceten-MATEs.

Der Transporter Mte1 aus *T. vaccinum* gehört zu den MATEs der Basidiomyceten und zeigt die höchste Sequenzähnlichkeit zu dem Saprophyten *P. ostreatus* 47115 mit 78,1 % und zu dem Braunfäulepilz *S. lacrymans* 456573 mit 72,9%.

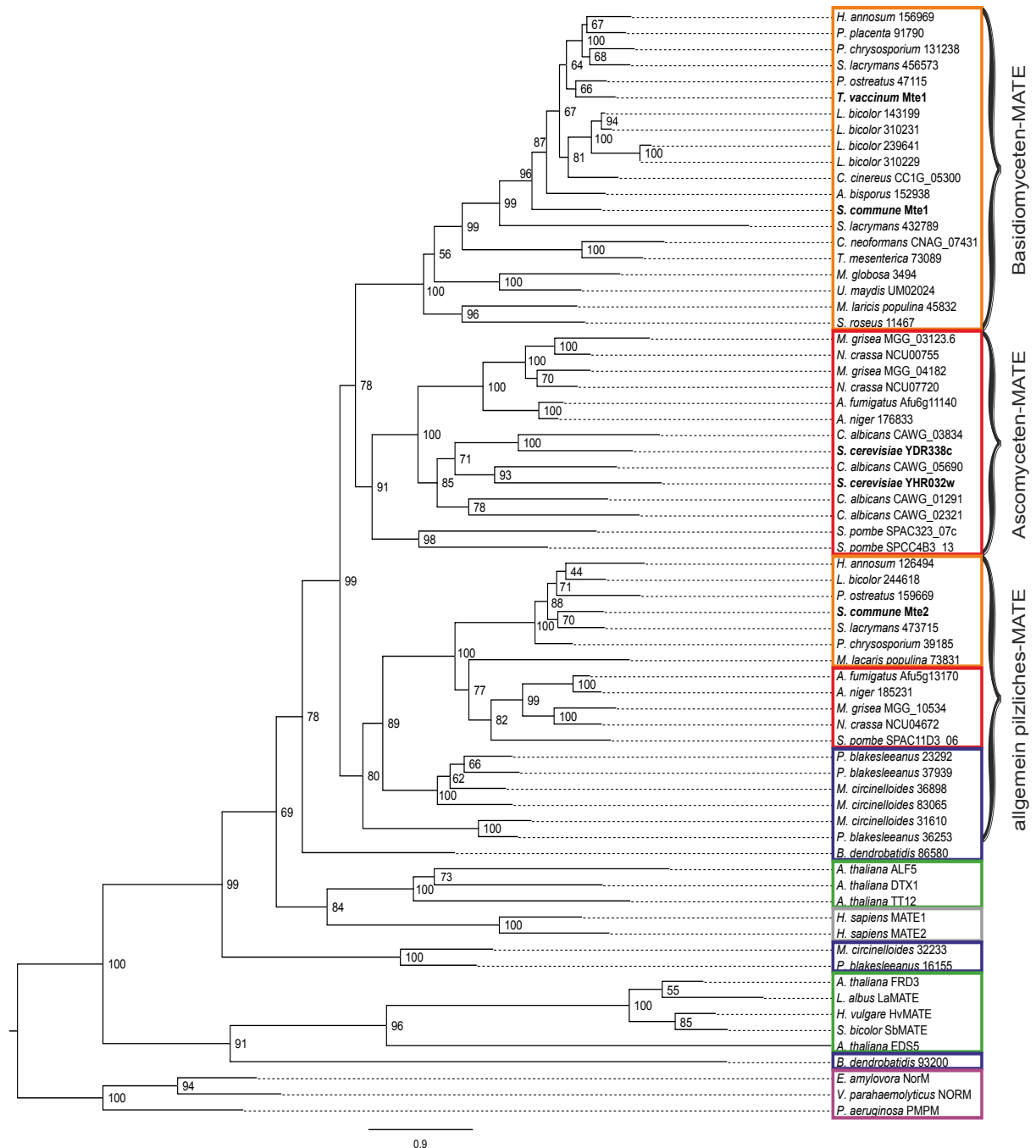


Abb. 4.5 Phylogenetische Analyse der MATE-Transporter aus Pilzen

Die Proteinsequenzen wurden aus den Genomen der Pilzen entnommen und der Sequenzvergleich mit MAFFT v6 bearbeitet. Die Berechnung erfolgte mit Treefinder (Version Oktober 2008). Die Basidiomyceten sind orange, die Ascomyceten rot, die Chitridio- und Zygomyceten blau und Pflanzen grün eingerahmt. Grau sind die menschlichen Proteine gekennzeichnet und als Außengruppe wurden Bakterien mit lila umrahmt.

Es gibt unterschiedlich viele Orthologe in den Genomen. Viele Basidiomyceten enthalten in ihrem Genom 2 MATE-Paraloge, ein Basidiomyceten-spezifisches und ein allgemein pilzliches Transporterprotein, wie beispielsweise *S. commune*, *H. annosum*, *C. cinereus* und *P. chrysosporium*. Andererseits ist z.B. bei *A. bisporus*, *T. mesenterica* und *S. roseus* nur ein MATE-Gen im Genom vorhanden, welches in die Unterfamilie der basidiomyceten-spezifischen Transporter gehört. Möglicherweise ist das allgemein pilzliche MATE-Gen einiger Basidiomyceten während der Evolution verloren gegangen.

L. bicolor weist mit 5 Paralogen die höchste Anzahl an MATE-Genen innerhalb der Basidiomyceten auf, von denen 4 der basidiomyceten-spezifischen und eins der allgemein pilzlichen MATE-Gruppe angehört. Die 4 basidiomyceten-spezifischen MATE-Gene liegen dabei auf Scaffold 44 im Genom hintereinander, jedoch mit einem Abstand von über 500 bp zum vorherigen Gen bzw. mehr als 1 kb zwischen den Transporter-Genen (Abb. 4.6). Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass jedes Gen eine eigene Promotorregion besitzt. Mögliche STREs konnten in allen Promotorregionen gefunden werden. Im 5' Bereich von dem Protein mit der ID 143199 ist ein STRE vorhanden, in den anderen Promotoren jeweils 2 STREs.

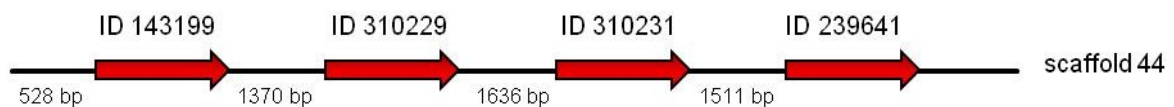


Abb. 4.6 Organisation der MATE-Gene in *L. bicolor*

Die basidiomyceten-spezifischen MATE-Gene (Pfeile) liegen auf dem Scaffold 44 in kurzen Abständen direkt hintereinander.

Aus dem Alignment heraus wurde nach konservierten Aminosäuren gesucht, die sich außerhalb der Transmembranbereiche befinden. Dazu wurde die Konsensussequenz der jeweiligen MATE-Proteine einer Gruppe untersucht (Anhang, Abb. A3-A5) und die Transmembranstruktur mittels HMMTOP 2.0 ermittelt und mit TOPO2 dargestellt. Innerhalb der Basidiomyceten-MATEs existieren 12 konservierte Aminosäuren, die sich sowohl im cytoplasmatischen als auch extrazellulärem Bereich befinden (Abb. 4.7). Bei den Ascomyceten-MATE-Proteinen sind 19 und in der allgemein pilzlichen MATE-Gruppe 18 konservierte Aminosäuren außerhalb der Transmembrandomänen zu finden. Insgesamt ist anhand der Struktur der Konsensussequenz der MATE-Gruppen ersichtlich, dass diese sich in den transmembranen Strukturen ähneln.

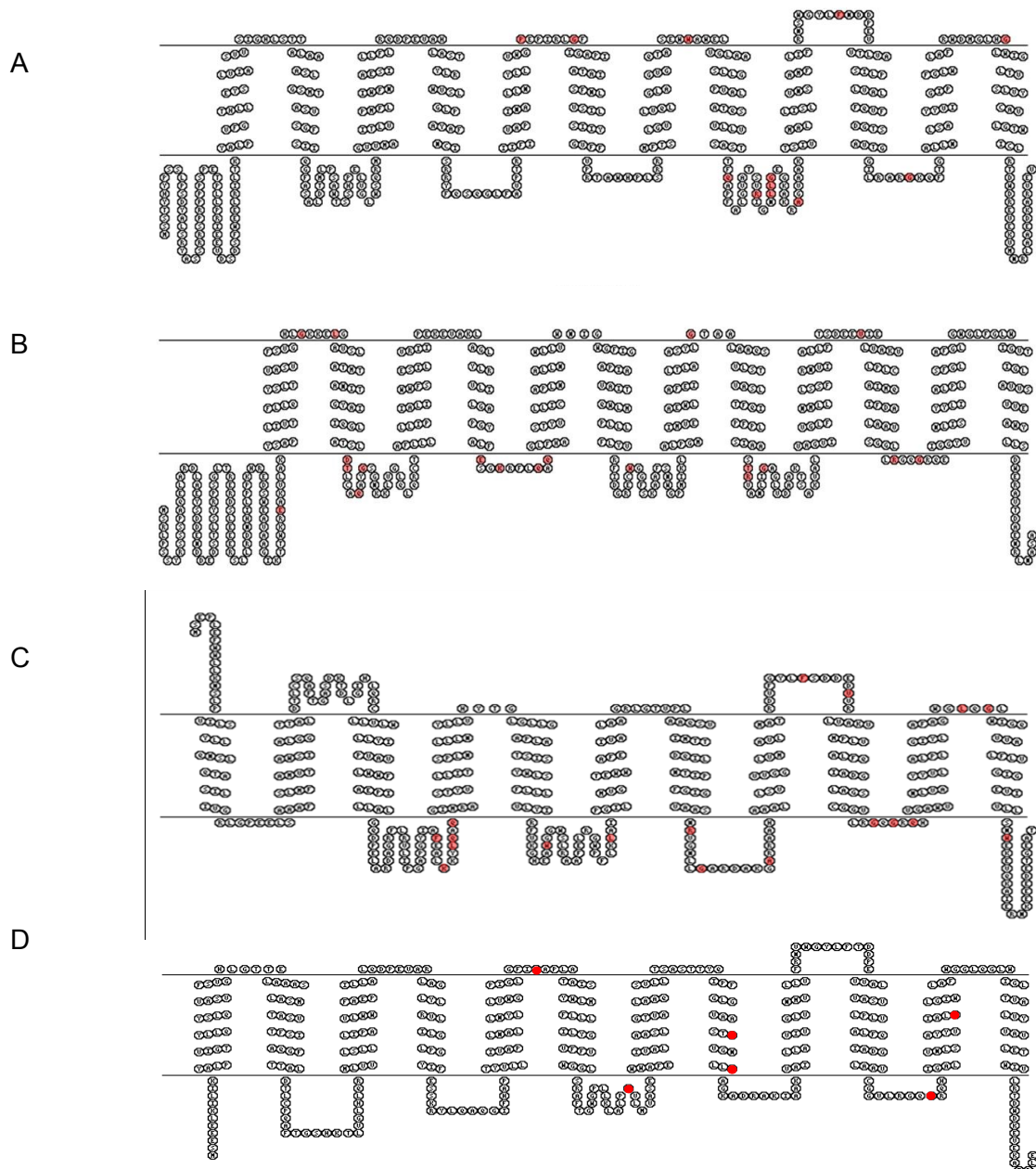


Abb. 4.7 Konservierte Aminosäuren der MATE-Proteine

Die Konsensussequenz wurde zur Erstellung des Transmembrandomänenprofils genutzt (HMMTOP 2.0 und TOPO2). Dargestellt sind die konservierten Aminosäuren außerhalb der Transmembrandomänen durch einen roten Hintergrund in den MATE-Proteinen der Basidiomycetengruppe (A), der Ascomycetengruppe (B) und im allgemein pilzlichen MATE (C). Zudem wurde die Konsensussequenz aller pilzlichen MATEs dargestellt (D).

Der Sequenzvergleich aller in der phylogenetischen Analyse verwendeten pilzlichen MATEs, ausgenommen der Sequenzen *M. circinelloides* 32233, *P. blakesleanus* 16155 und *B. dendrobatidis* 93200, die außerhalb der Pilze clustern, zeigt 6 konservierte Aminosäuren auf. Davon befinden sich 3 Aminosäuren in den transmembranen Bereichen, 2 auf der cytoplasmatischen und eine Aminosäure im extrazellulären Bereich. Zudem zeigt der Vergleich aller Proteinsequenzen Bereiche mit hoher Ähnlichkeit, bei denen die

Proteinsequenz von lediglich einem oder zwei Organismen von der Konsensussequenz abweicht.

Im Vergleich zu den Basidiomyceten-spezifischen MATE-Proteinen und den Ascomyceten-spezifischen mit jeweils typischen 12 Transmembrandomänen zeigt die Struktur der allgemein pilzlichen MATE-Proteine nur 11 transmembrane Bereiche. Im Alignment ist jedoch gut zu erkennen, dass die meisten Proteine dieser Gruppe stromaufwärts der Konsensussequenz, also im C-Terminalen Bereich, beginnen, aber zu viele Unähnlichkeiten aufweisen, weshalb keine übereinstimmende Sequenz ermittelt werden kann. Es ist davon auszugehen, dass auch in dieser Gruppe die Proteine 12 Transmembrandomänen besitzen.

Die Analyse der konservierten Domänen (NCBI conserved domain search) ergibt für die Basidiomyceten-MATEs eine annähernd ähnliche Struktur wie für Mte1 und Scmte1, bei der Ascomycetengruppen und den pilzlichen Transporterproteinen fehlen jeweils die MVIN-Domänen (Anhang Abb. A6). Möglicherweise kann das auf eine unterschiedliche Funktion der MATE-Transporter hinweisen. Eine endgültige Aussage darüber ist auf Grund der fehlenden Untersuchung zur Substratspezifität pilzlicher MATE-Transporter nicht möglich.

Es wurde außerdem der Genombereich um den MATE-Transporter untersucht, um Gene zu identifizieren, die möglicherweise einen Hinweis auf die Funktion des Transporters in Basidiomyceten geben können. Dabei wurde im Bereich des basidiomyceten-spezifischen MATE-Gens bei *L. bicolor* 143199, *P. placenta* 91790, *A. bisporus* 152938 und *S. lacrymans* 456573 innerhalb der umliegenden 5 Gene jeweils ein, und bei *S. commune* 112184 zwei MFS-Transporter gefunden. Bei *S. lacrymans* 432789 und *S. roseus* 11467 konnte ein ABC-Transporter identifiziert werden.

Bei den Genen der allgemein pilzlichen MATE-Gruppe konnten bei *S. commune* 108497, *L. bicolor* 244618, *H. annosum* 126494, *P. ostreatus* 159669, *S. lacrymans* 473715 und *P. chrysosporium* 39185 direkt hinter dem MATE-Gen ein Arginase/Agmatinase-Gen, also ein Schlüsselenzym bei der Biosynthese von Polyaminen, gefunden werden. Zudem befinden sich stromauf- bzw. abwärts weitere Enzym-codierende Gene. Bei *M. laricis-poplina* 73831, welches im Stammbaum nicht mit den anderen Basidiomyceten clustert, konnte das Agmatinase-Gen nicht im angrenzenden Sequenzbereich um das MATE-Gen herum identifiziert werden.

4.1.3 Anzahl der MATE-Gene im Genom von *T. vaccinum*

Es wurde mittels einer DNA-DNA-Hybridisierung untersucht, ob es im Genom von *T. vaccinum* weitere Homologe zu *mte1* gibt. Das Fragment KI5r8-26 aus pCR2.1 wurde mit *EcoRI* ausgeschnitten und mit DIG-dUTP markiert. Die genomische DNA von *T. vaccinum* wurde isoliert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Die Bindung der

Sonde erfolgte unter wenig stringenten Bedingungen bei 55°C, um die Hybridisierung mit auch weniger homologen Sequenzen zu gewährleisten. Auf dem Film ist deutlich zu erkennen, dass die Sonde lediglich an eine Sequenz im Genom bindet (Anhang Abb. A7). Somit konnte gezeigt werden, dass *T. vaccinum* kein weiteres Gen mit hoher Homologie zu *mte1* besitzt.

Die Genomanalyse konnte jedoch aufzeigen, dass in Basidiomyceten häufig ein zweites MATE-Gen mit sehr geringer Homologie vorkommt. Es wurden die Gene der zweiten MATE-Genfamilie der Basidiomyceten *S. commune* Protein ID108497, *L. bicolor* 244618 und *P. chrysosporium* 39185 im Alignment auf konservierte Bereiche hin untersucht und degenerierte Primer abgeleitet, wobei vor allem die Sequenzen von *P.chrysosporium* und *L.bicolor* auf Grund höherer Übereinstimmung auf Nukleotid-Ebene berücksichtigt wurden (Anhang, Abb A8). Die PCR erfolgte mit cDNA und bei verschiedenen Temperaturen und Kombination der vorwärts gerichteten Primer M2-LP1 und M2-LP2 sowie der gegenläufige Primer M2-LPr5, M2-LPr10b und M2-LPr11. Es konnten Banden in der PCR amplifiziert werden, die jedoch nicht der vermuteten Größe entsprachen. Einige Fragmente wurden trotzdem kloniert und sequenziert. Bei der Analyse der Sequenzen konnte aber kein zweites MATE-Gen identifiziert werden.

4.1.4 Expression in *Escherichia coli*

Das Substratspektrum von Multidrug-Transportern kann durch heterologe Expression in verschiedenen Organismen untersucht werden. Bakterien wie *E. coli* eignen sich aufgrund ihrer geringen Expansionszeit und der einfachen Kultivierung besonders für diese Experimente. Zudem stehen Stämme mit erhöhter Sensitivität gegenüber verschiedenen Substanzen zur Verfügung.

RNA von *T. vaccinum* wurde isoliert und in cDNA invertiert. Die cDNA wurde als Matrize in einer PCR mit den Primern TvM1-Eco-ATG, welcher eine *EcoRI*-Schnittstelle direkt vor dem Startcodon enthält, und TvM1c rev zur Amplifikation von *mte1* eingesetzt. Das Fragment wurde in den TA-Klonierungsvektor pGEM-T Easy zwischenkloniert und mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *PstI* ausgeschnitten. Das Plasmid pTrc99A wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten und anschließend das *mte1*-Fragment in das Plasmid kloniert (Abb. 4.8). Die Insertion von *mte1* hinter den *trc*-Promotor erlaubt eine kontrollierte Genexpression, die durch die Zugabe von IPTG initiiert werden kann.

Das Plasmid pTrc-*mte1* sowie das Ausgangsplasmid pTrc99A wurden in *E. coli* DH5 α und die hypersensitive Mutante *E.coli* KAM3 transformiert. Der Stamm KAM3, der aus *E. coli* TG1 hervorgegangen ist, trägt eine Mutation im Multidrug-Efflux-Protein AcrAB (Morita *et al.* 1998).

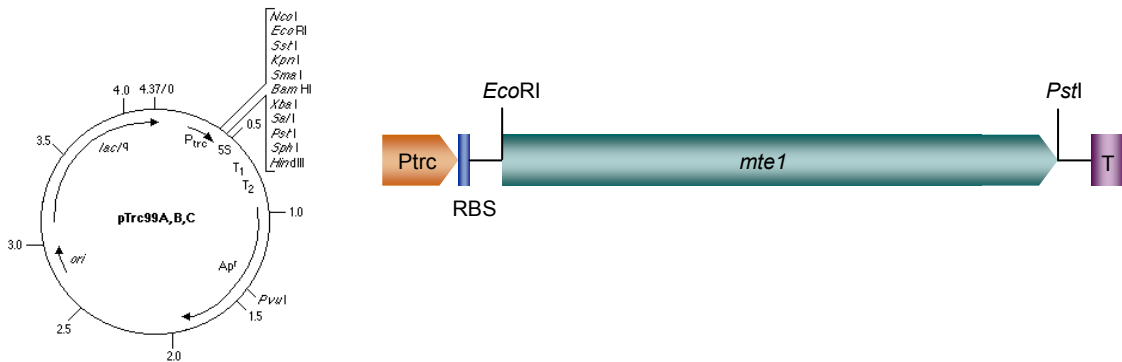


Abb. 4.8 Expressionsplasmid pTrc99A und Promotor-*mte1*-Komplex

In das Plasmid pTrc99A wurde die cDNA von *mte1* hinter den *trc*-Promotor (P_{trc}) und die Ribosomenbindestelle (RBS) kloniert. Der in 3'-Richtung befindliche *rrnB*-Terminator (T) ist für den korrekten Abbruch der Transkription verantwortlich.

Die Sensitivität der Transformanten und der Stämme TG1 und KAM3 gegenüber Ethidiumbromid wurde im Mikrodilutionstest überprüft. Dabei sollte die minimale Hemmkonzentration (MHK) ermittelt werden. Die MHK gibt die geringst mögliche Konzentration eines Stoffes an, die zur Wachstumshemmung führt. Unmittelbar vor der Inkubation mit Ethidiumbromidlösung erfolgte die Zugabe von 1 mM IPTG, um die Genexpression von *mte1* zu initiieren. Der Wildtyp-Stamm TG1 wuchs bis 200 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid, KAM3 wuchs bis zu einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ und KAM3 pTrc, welches nur das Plasmid pTrc99A trägt, wuchs bis 25 $\mu\text{g/ml}$. Es wurden 8 unabhängige *mte1*-Transformanten in KAM3 getestet und lediglich eine Transformante zeigte ein Wachstum bis 100 $\mu\text{g/ml}$, zwei Transformanten konnten bis zu einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ wachsen. Bei den anderen konnte teilweise ein Wachstum bis zu einer sehr geringen Konzentration (<25 $\mu\text{g/ml}$) bzw. kein Wachstum festgestellt werden.

Eine Wiederholung des Experiments zeigte, dass die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren. Auch bei Änderungen der Bedingungen, beispielsweise durch Änderung der IPTG-Konzentration oder der Erhöhung der eingesetzten Zellzahl konnte kein Wachstum der Transformante auf höheren Ethidiumbromid-Konzentrationen beobachtet werden. Für den ebenfalls verwendeten Stamm DH5 α wurden die gleichen Ergebnisse erzielt.

Neben der MHK wurden Drop-Tests zur Sensitivitätsbestimmung durchgeführt. Es erfolgten Tests auf LB-Agar ohne IPTG bzw. mit unterschiedlichen Gehalten an IPTG und verschiedenen Konzentrationen von Ethidiumbromid. Hier zeigte sich ein generell schlechteres Wachstum der KAM3 *mte1*-Transformante, das außerdem durch die Induktion der Genexpression mit IPTG verschlechtert wurde. Sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Konzentrationen von IPTG konnten die Transporter-Transformanten nicht besser wachsen als der Stamm mit dem Plasmid, beispielhaft dargestellt in Abb. 4.9 für eine Konzentration von 0,1 mM IPTG und 25 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid.

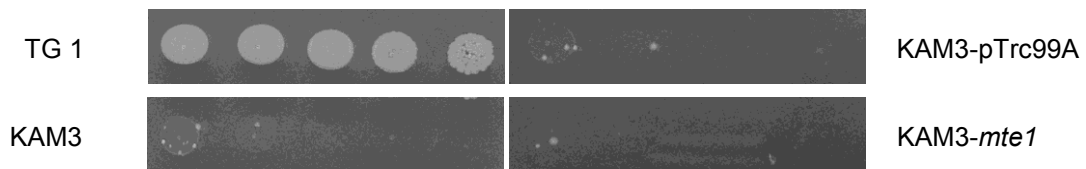


Abb. 4.9 Drop-Test mit Ethidiumbromid

Jeweils 5 μ l *E. coli*-Kultur wurden auf LB-Agar mit 0,1 mM IPTG und 25 μ g/ml Ethidiumbromid getropft und 24 h bei 37°C inkubiert.

Die heterologe Expression des Membrantransporterproteins *mte1* in *E. coli* ergab einen ersten Hinweis auf eine erhöhte Resistenz gegenüber Ethidiumbromid. Aufgrund der nicht eindeutigen und nicht reproduzierbaren Ergebnisse der Tests wurde der MATE1-Transporter von *T. vaccinum* zudem in *S. cerevisiae* getestet.

4.1.5 Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.5.1 Charakterisierung der MATE-Transporter von *S. cerevisiae*

Im Genom von *S. cerevisiae* sind 2 MATE-Gene bekannt, das bereits beschriebene Gen ERC1 (Shiomi *et al.*, 1989) und ein bisher nicht charakterisiertes zweites MATE-Gen YDR338c. Die Sequenzhomologien der Proteine zu Mte1 sind sehr gering, so besteht lediglich eine Ähnlichkeit zwischen ERC1 und MTE1 von 22,5 % und von YDR338c zu Mte1 von 26,7 %. Auch untereinander beträgt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz nur 31,8 %. Die Analyse der Domänen-Struktur zeigt jedoch, dass es sich auch hierbei um Proteine der MATE-Familie handelt. In beiden Proteinen konnten die gleichen Domänen wie in MTE1 gefunden werden, außerdem sind die MatE superfamily-Domänen zweimal im Protein vorhanden, an annähernd der gleichen Position und im gleichem Abstand zueinander. Die Hydrophobizitätsanalyse lässt erkennen, dass das Gen YDR338c die für MATE typischen 12 Transmembrandomänen besitzt, bei ERC1 konnten lediglich 11 Transmembrandomänen erkannt werden, wodurch der C-Terminus im Extrazellularraum liegen würde (Abb.4.10). Möglicherweise fehlt der vollständige C-Terminus durch die automatische Annotierung des Genoms und damit verbundener möglicher Fehler.

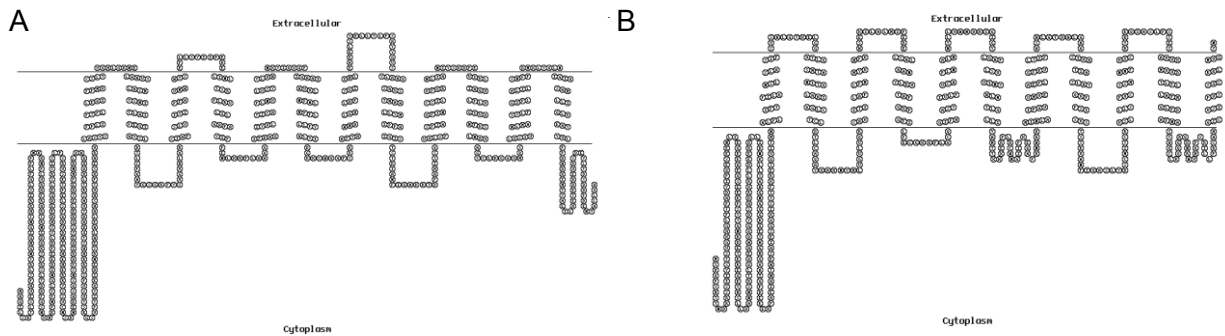


Abb. 4.10 Transmembrandomänenstruktur der *S. cerevisiae* MATE-Gene

Transmembrandomänen von YDR338c (A) und von ERC1 (B). Die Analyse erfolgte mit HMMTOP 2.0, die Darstellung mit TOPO2.

Das MATE-Protein ERC1 von *S. cerevisiae* wurde im Zusammenhang mit einer Ethioninresistenz bei der Überexpression entdeckt. Die Bestimmung der MIK für Ethionin der Δ ERC1-Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp-Stamm BY4741 jedoch keine höhere Sensitivität gegenüber Ethionin, ebenso nicht die MATE2-Mutante YDR338c (Abb 4.11, Anhang Tab. AT1).

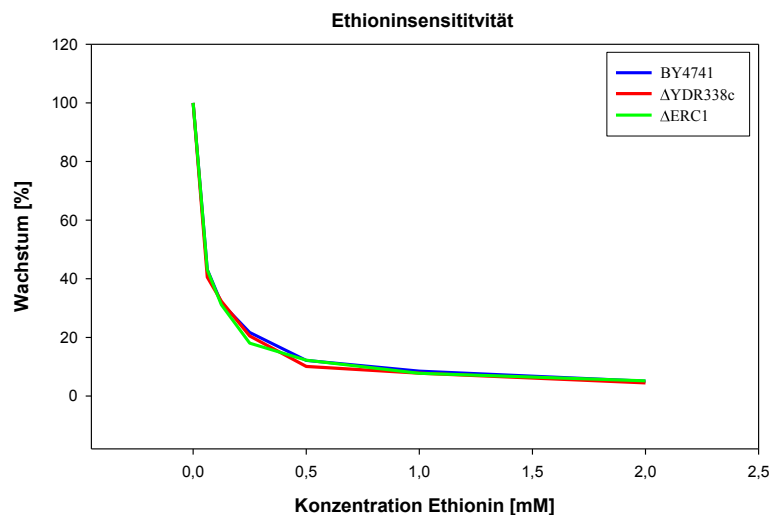


Abb. 4.11 Ethioninsensitivität

Die Bestimmung der MIK erfolgte mit den Stämmen BY4741 (Wildtyp), YDR338c und Δ ERC1 unter Verwendung von SD-Medium. Dargestellt ist das Wachstum unter Ethioninexposition im Verhältnis zum Wachstum im Medium in %.

Das Substratspektrum von Mte1 wurde im Wildtypstamm BY4741 und den beiden „knock out“-Stämmen Δ ERC1 und YDR338c getestet. Zudem wurde *mte1* von *T. vaccinum* in 3 ABC-Transporter „knock out“-Mutanten exprimiert und auf Resistenzen gegenüber verschiedenen Substanzen geprüft.

4.1.5.2 Expression von *mte1*

Die *mte1*-cDNA wurde mit den Primern TvM1-Bam-ATG, der eine *Bam*HI-Schnittstelle direkt vor dem ATG besitzt, und TvM1 rev amplifiziert und in den TA-Klonierungsvektor pGEM-T Easy zwischenkloniert. Das cDNA-Fragment sowie das Plasmid pYES260 wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten und das Gen *mte1* in das Plasmid ligiert. Das entstandene Plasmid pYES-*mte1* enthält die *mte1*-cDNA, welche hinter dem *gal1*-Promotor (*Pgal1*) kloniert wurde (Abb. 4.12).

Die Plasmide pYES-*mte1* und der Vektor pYES260 ohne Insert wurden in die verschiedenen Hefestämme BY4741, YDR338c, ΔERC1, YHR011w, YOR153w und YGR281c transformiert. Die Transformanten erhielten die Bezeichnungen nach Stamm und Plasmid, pYES entspricht der Transformation des Plasmids und mit *mte1* wurden Transformanten bezeichnet, die das *mte1*-Gen von *T. vaccinum* enthielten.

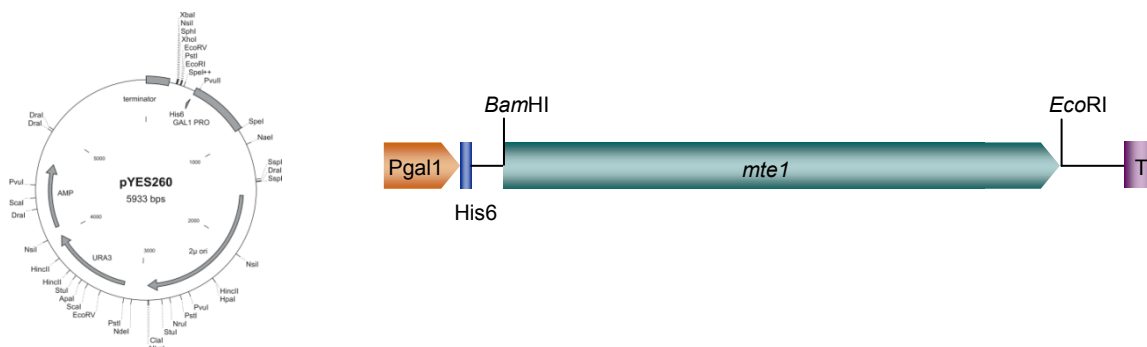


Abb. 4.12 Expressionsplasmid pYES und Promotor-*mte1*-Komplex

In das Plasmid pYES260 wurde die *mte1* cDNA über die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI hinter den *gal1*-Promotor (*Pgal1*) kloniert. Zwischen Promotor und Gen befindet sich ein His-Tag (His6). Die Termination der Transkription wird über den Terminator (T) reguliert.

Im Wildtypstamm BY4741 und der Transformante BY-*mte1* wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie die Expression und korrekte Proteinlokalisierung von MTE1 überprüft. In den mikroskopischen Aufnahmen sind bei der Transformante deutliche Spots an der Zellmembran sichtbar, die die Lokalisierung von MTE1 aufzeigen. Zudem sind mögliche endosomale Strukturen zu erkennen. Beim Wildtyp konnte keine Fluoreszenz festgestellt werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (Abb. 4.13).

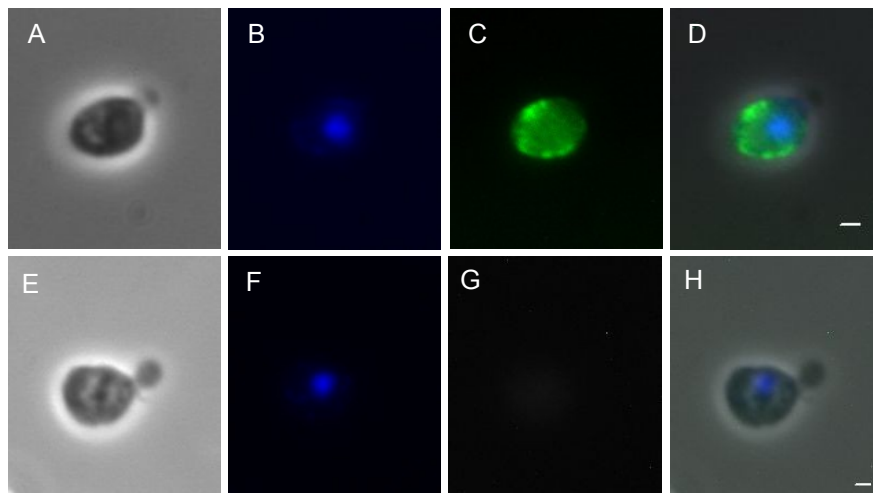


Abb. 4.13 Lokalisierung von Mte1 in *S. cerevisiae*

Der Wildtyp BY4741 (E-H) und die Transformante BY-*mte1* (A-D) wurden mit Anti-His-Antikörpern und im Anschluss mit einem Zweitantikörper mit FITC hybridisiert. Gegenübergestellt sind die Hellfeldaufnahmen (A, E) den Kernfärbungen mit DAPI (B, F) und den antikörpergefärbten Zellmembranen (C, G). Die Bilder D und H zeigen eine Überlagerung der Färbungen mit der Hellfeldaufnahme. Der Größenbalken entspricht 1 μm .

4.1.5.3 Untersuchung des Substratspektrums des heterolog in *S. cerevisiae* exprimierten Gens *mte1*

Als mögliche Substrate von „Multi-Drug“-Transportern können Stoffe mit unterschiedlichem chemischen Charakter dienen, weshalb bei der Untersuchung des Substratspektrums von Mte1 aus *T. vaccinum* Substanzen unterschiedlichster Herkunft und Struktur untersucht wurden.

Die Untersuchung, ob Mte1 in der Lage ist eine Metallresistenz zu vermitteln, erfolgte in Drop-Test-Experimenten. Es wurden ca. 1×10^6 Hefezellen (gemessen als $\text{OD}_{600}=1$) in 10er Schritten verdünnt und die Zellverdünnungen bis 10^{-4} auf Minimalmedium mit verschiedenen Metallkonzentrationen pipettiert.

Zunächst wurden die Hefedeletionsmutanten ΔERC1 und YDR338c auf Metallsensitivität untersucht. Als Kontrolle wurde jeweils eine Agarplatte ohne das entsprechende Metall mitgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Mutante YDR338c im Vergleich zum Wildtyp und zu ΔERC1 ein etwas geringeres Wachstum auf 40 mM Lithiumchlorid und 1,5 mM Zinkchlorid aufweist (Abb. 4.14). Eine Änderung des Wachstumsverhaltens konnte jedoch nicht bei Cadmiumnitrat, Nickelchlorid, Aluminiumchlorid, Chromchlorid, Cobaltchlorid Eisen(III)chlorid, Manganchlorid und Kupfersulfat festgestellt werden.

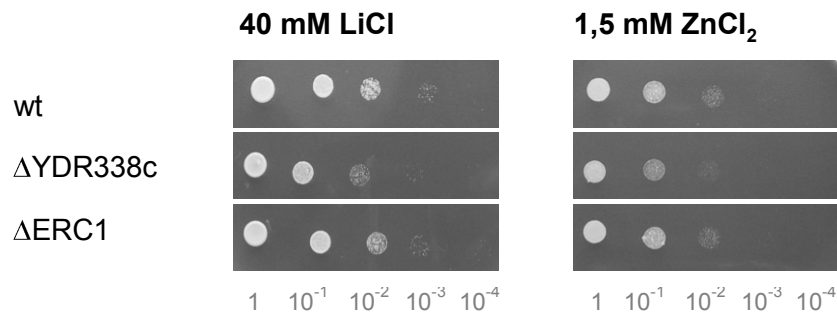


Abb. 4.14 Wachstum des Wildtyp-Stamms BY4741 und der Hefedeletionsmutanten Δ ERC1 und YDR338c auf metallhaltigen Minimalmedium.

Die Hefekulturen wurde auf eine $OD_{600}=1$ eingestellt und 10fache Verdünnungen hergestellt. Es wurden jeweils 10 μ l Zellsuspension auf die Agarplatte pipettiert und anschließend bei 28°C für 4 d inkubiert.

Die Tests zur Induzierung der Metallresistenz durch *mte1* erfolgten sowohl mit dem Wildtypstamm als auch mit den transformierten Hefedeletionsmutanten Δ ERC1 und YDR338c in Drop-Test-Experimenten. Als Kontrolle diente jeweils eine Agarplatte ohne Metall.

Die *mte1* überexprimierenden BY4741-Zellen zeigen auf kupfersulfat- und lithiumchloridhaltigen Minimalmedium ein besseres Wachstum als der Wildtyp, auf aluminiumchlorid- und nickelchloridhaltigen Agarplatten konnte ein besseres Wachstum im Vergleich zu der Transformante mit dem Plasmid festgestellt werden (Abb. 4.15). Kein Unterschied im Wachstum wurde auf Medium mit Eisen(III)chlorid, Chromchlorid, Manganchlorid, Cadmiumnitrat, Cobaltchlorid und Zinkchlorid festgestellt.

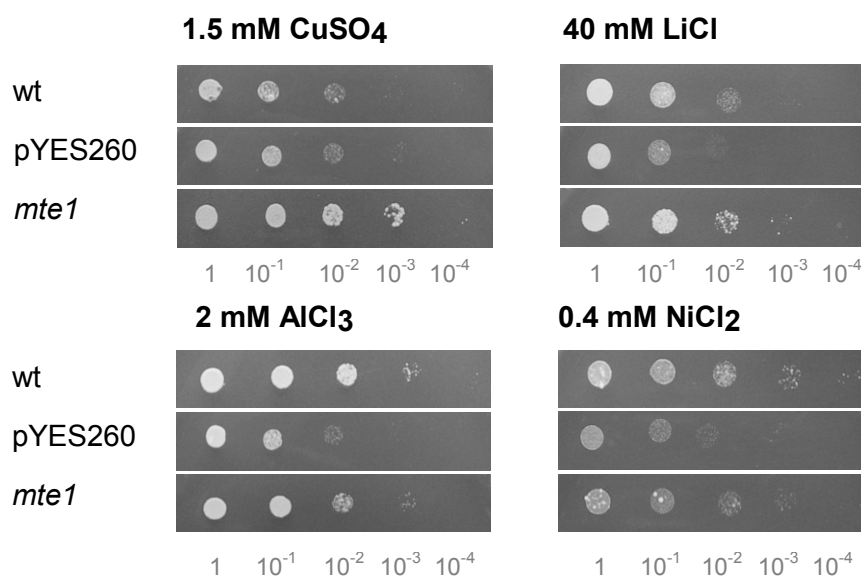


Abb. 4.15 Wachstum von *S. cerevisiae* BY4741 (wt) und der Transformanten mit pYES260 und *mte1* auf metallhaltigen Agarplatten.

Die Hefekulturen wurde auf eine $OD_{600}=1$ eingestellt und 10fache Verdünnungen hergestellt. Es wurden jeweils 10 μ l Zellsuspension auf die Agarplatte getropft und anschließend bei 28°C für 4 d inkubiert.

Es wurden ebenfalls die Deletionsstämme Δ ERC1 und YDR338c und deren Transformanten getestet. Es konnte hier ebenfalls ein besseres Wachstum der *mte1*-Transformanten auf kupfersulfat-, lithiumchlorid-, aluminiumchlorid- und nickelchloridhaltigem Medium festgestellt werden, dass sich jedoch nicht von dem der Wildtyptransformanten unterschied.

Fast alle MATE-Transporter vermittelten eine Resistenz gegenüber verschiedenen Xenobiotika. Für die Tests auf Xenobiotika-Resistenz wurden Hefestämme verwendet, bei denen je ein bestimmter ABC-Transporter deletiert wurde. Der Stamm Δ YDR011w trägt eine Deletion des SNQ2-Gens und zeigt einen MDR-Phänotyp. Die PDR5 Deletionsmutante Δ YOR153w weist eine erhöhte Sensitivität gegenüber Xenobiotika und verschiedenen Kationen auf und Δ YGR281c mit der Deletion in YOR1 ist besonders sensitiv gegenüber organischen Anionen (Rogers *et al.*, 2001). Die Tests fanden als Agardiffusionstests statt, bei denen die Substanzen entweder auf Plättchen aufgebracht oder in ausgestanzte Löcher pipettiert wurden. Es wurden die nukleinsäure-interkalierenden Farbstoffe Ethidiumbromid und 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) getestet, das Herbizid Propanil, die Fungizide Opus (BASF), Benomyl und Hygromycin, das Antibiotikum Cycloheximid sowie Trichlortetrazoliumchlorid (TTC) und Natriumdodecylsulfat (SDS) (Abb. 4.16, Anhang Tab. AT2a und Tab. AT2b).

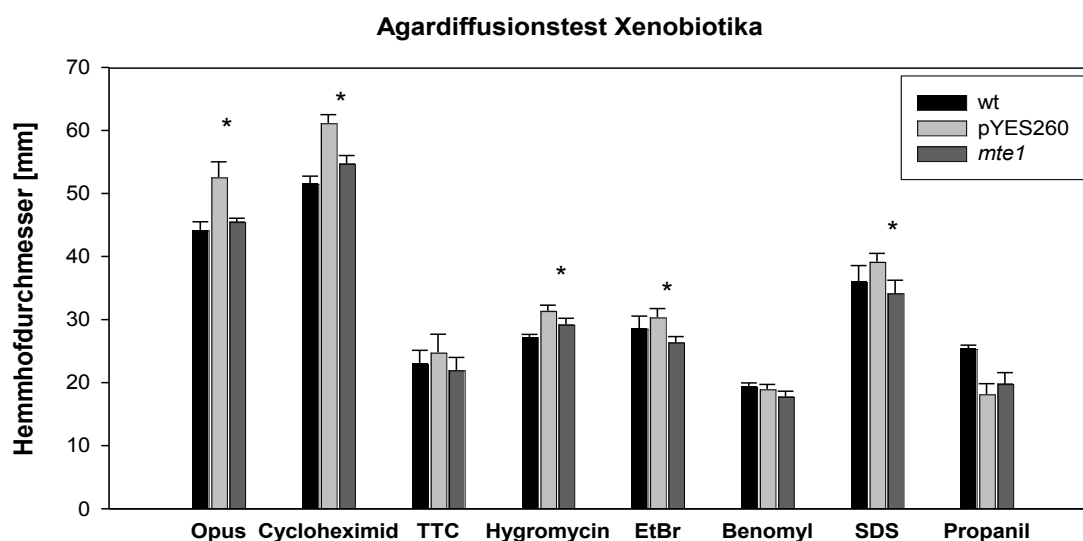


Abb. 4.16 Agardiffusionstests mit verschiedenen Xenobiotika

Die Agardiffusionstests mit Opus (1,25 g/l), Cycloheximid (10 mg/ml), 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, 10 mg/ml) und Hygromycin (100 mg/ml) fanden mit dem Hefestamm YOR153w statt. Ethidiumbromid (EtBr, 10 mg/ml), Benomyl (10 mg/ml DMSO) und SDS (10%) wurden mit YDR011w und der Test mit Propanil (10 mg/ml Ethanol) mit YGR281c durchgeführt. Dargestellt sind die Hemmhoftdurchmesser in [mm], signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Die Überexpression von *mte1* in Δ YDR011w bewirkte ein Wachstum der Hefezellen auf höheren Konzentrationen von Ethidiumbromid und SDS, jedoch keinen

Wachstumsunterschied in Gegenwart von Benomyl. Desweiteren konnten *mte1* überexprimierende Δ YOR153w Zellen besser auf Cycloheximid, Opus und Hygromycin wachsen, aber nicht auf TTC. Kein besseres Wachstum zeigten Δ YGR281c Zellen mit *mte1* in der Gegenwart von Propanil. Weitere Tests erfolgten mit den Herbiziden Monuron und Chlorbromuron, mit dem Strobilurin-Fungizid Amistar, mit dem antibiotischen Wirkstoff Erythromycin und mit Tetramethylammoniumchlorid, welches als ein Substrat des menschlichen MATE1-Proteins bekannt ist. Trotz der Verwendung von verschiedenen Stämmen und Konzentrationen konnte keine Aktivität gegenüber den Hefezellen festgestellt werden. Außerdem wurde die toxische Wirkung von DMSO kontrolliert, da diese Substanz häufig als Lösungsmittel verwendet wurde. Hier konnte ebenfalls keine wachstumshemmende Wirkung festgestellt werden.

Die Bestimmung der Sensitivität gegenüber DAPI erfolgte mit dem Stamm YGR281. Es konnten nach der 3tägigen Inkubation bei 28°C keine klaren Hemmhöfe ausgemessen werden. Jedoch war deutlich zu sehen, dass bei dem Stamm mit *mte1* zwar ein schwacher Hemmhof sichtbar war. Auf diesem wuchsen jedoch resistente Zellen, so dass auch hier von einer durch Mte1 vermittelten Resistenz ausgegangen werden kann (Abb. 4.17).

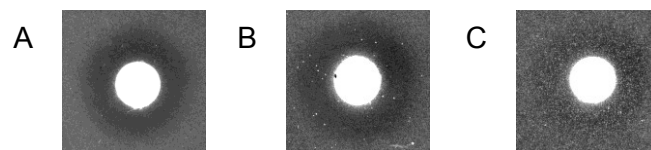


Abb. 4.17 Agardiffusionstest mit DAPI

Die Agardiffusionstest mit je 10 mg/ml DAPI erfolgte bei dem Stämmen YGR281c (A), dem mit Plasmid pYES260 transformierten Stamm (B) und mit der *mte1*-Transformante (C).

Das Pilzmyzel ist aber nicht nur verschiedenen Metall-Ionen und Xenobiotika ausgesetzt, auch sekundäre Pflanzenstoffe können eine antifungale Wirkung haben. Es wurde getestet, inwiefern der Mte1-Transporter in der Lage ist, pflanzliche Sekundärmetabolite zu transportieren. Dazu wurden Agardiffusionstests durchgeführt, bei denen der Stamm Δ YDR011w und die Δ YDR011w-Transformanten mit pYES260 bzw. *mte1* verwendet wurden. Es wurden die Monoterpen-Kohlenwasserstoffe α - und β -Pinen verwendet, sowie Fichtennadelöl, welche direkt vom Symbiosepartner Fichte stammen, aber auch Substanzen von anderen Pflanzen, wie Berberin und Limonen. Die Ausmessung der Hemmhöfe ergab, dass *mte1* exprimierende Hefezellen auf höheren Konzentrationen von α - und β -Pinen sowie Berberin wuchsen, jedoch die gleiche Sensitivität gegenüber Limonen und Fichtennadelöl aufweisen (Abb. 4.18, Anhang Tab. AT3a und Tab. AT3b). Es wurden zudem Kiefernadelöl, Quercetin, Fisetin, Myricitin und Baicalein verwendet, bei denen jedoch keine

wachstumshemmende Wirkung vorhanden war und damit kein Nachweis der Transporteraktivität erfolgen konnte.

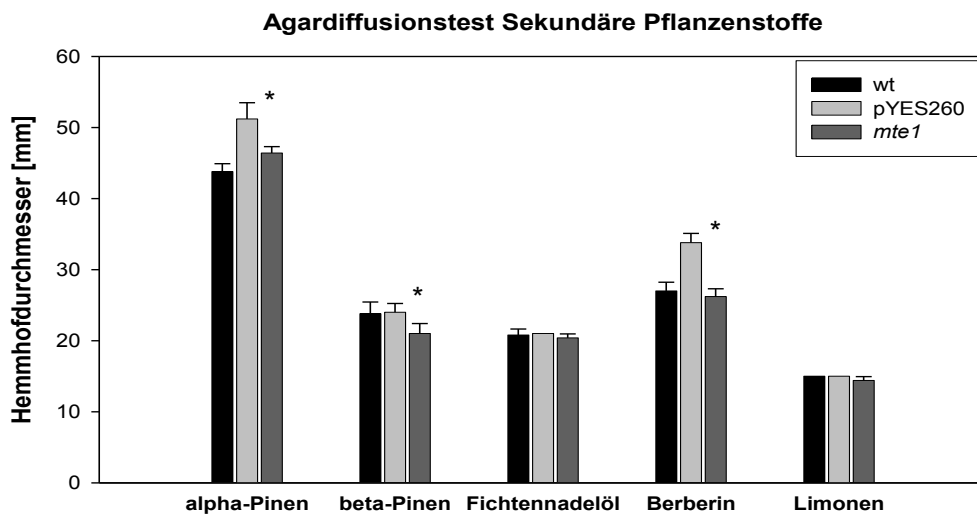


Abb. 4.18 Agardiffusionstest mit sekundären Pflanzenstoffen

Die Agardiffusionstests mit α -Pinen (98%), β -Pinen (99%), Fichtennadelöl (pajoma Ingo Steyer KG, Hemmoor, unverdünnt), Berberin (20 mg/ml Methanol:H₂O 2:1) und Limonen (96%) erfolgten mit dem Stamm YDR011w. Dargestellt sind die Hemmhofdurchmesser in [mm], signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

In der natürlichen Umgebung der Pilze befinden sich auch antibiotische Wirkstoffe, die von anderen Mikroorganismen zur Abwehr potentieller Konkurrenten eingesetzt werden. Es wurden je 50 μ l der verschiedenen Substanzen mit einer Konzentration von 1 mg/ml im Agardiffusionstest mit dem Stamm BY4741 und den BY4741-Transformanten pYES260 und *mte1* verwendet (Abb. 4.19, Anhang Tab. AT4).

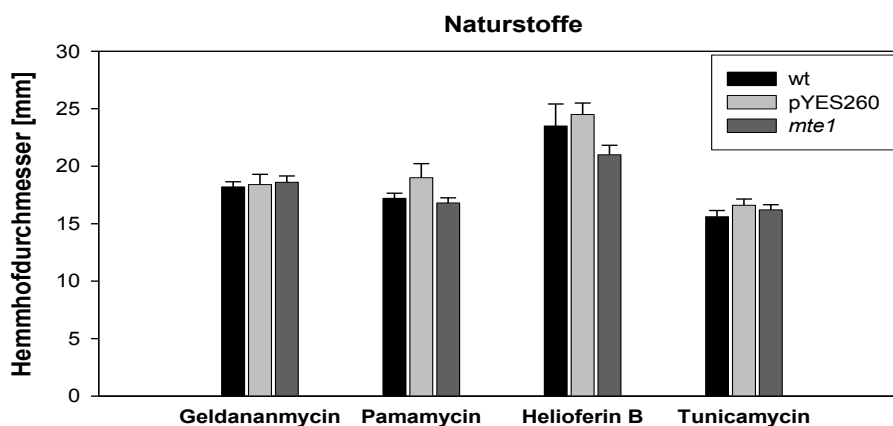


Abb. 4.19 Agardiffusionstest mit verschiedenen Naturstoffen

Die Agardiffusionstests erfolgten mit dem Stamm BY4741 und den entsprechenden Transformanten. Alle Substanzen wurden mit je 1 mg/ml, gelöst in DMSO, eingesetzt. Dargestellt sind die Hemmhofdurchmesser in [mm].

Leider konnte bei den getesteten Antibiotika β -Rubromycin, Herbimycin A, Fungichromin, Enniatin D und Nodekenin keine toxische Aktivität gegenüber Hefe und somit kein Hemmhof detektiert werden. Lediglich Geldanamycin und Tunicamycin zeigten eine hohe Aktivität und führten zu einer Hemmhofbildung. Bei Pamamycin und Helioferin B waren keine klaren Hemmhöfe sichtbar, hier wurde die Zone mit verringertem Wachstum ausgemessen, wobei sich zeigte, dass die Transporter-enthaltenden Zellen dort dichter wuchsen. Die statistische Auswertung auf Signifikanz erfolgte jedoch nicht, da die Resultate nur einen ersten Hinweis auf eine bessere Exkretion *via mte1* darstellen. Aufgrund der unklaren Hemmhofgrenze können Messungenauigkeiten nicht ausgeschlossen werden.

Durch die Drop-Test-Experimente und den Agardiffusionstest konnte gezeigt werden, dass es sich bei Mte1 um einen Multidrug-Transporter handelt, der ein großes Substratspektrum aufweist und sowohl einige Schwermetalle und Xenobiotika, aber auch sekundäre Pflanzenstoffe und möglicherweise auch Naturstoffe anderer Mikroorganismen transportieren kann.

4.1.6 Transportmechanismus von Mte1

Toxische Substanzen, die in die Zelle gelangen, können entweder direkt über Exporter aus der Zelle transportiert werden oder werden durch die Biotransformation zum Transport aus der Zelle vorbereitet. Ein wichtiges Molekül im Entgiftungsprozess ist Glutathion, an das die Substanzen gebunden werden, um anschließend aus der Zelle oder in Vakuolen transportiert werden zu können. Es wurde untersucht, ob das Transporterprotein Mte1 Glutathionkonjugate transportieren kann. Der Wildtypstamm BY4741 sowie die Transformanten pYES260 und *mte1* wurden in einer exponentiellen Wachstumsphase auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und 6 h mit einer Kupfersulfatkonzentration von 0,25 mM bzw. 1 mM bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abgetrennt und die Glutathionkonzentration im Kulturüberstand bestimmt (Abb. 4.20, Anhang Tab. AT5-AT8). Die Inkubation mit 0,25 mM Kupfersulfat führt zu einem Anstieg der Glutathionkonzentration im Medium, jedoch sind nur geringfügige Unterschiede zwischen den Stämmen BY4741, BY pYES und BY *mte1* sichtbar. Der Plasmid-enthaltende Stamm weist eine leicht erhöhte Konzentration auf, der Wildtyp und die Zellen mit *mte1* haben ungefähr die gleiche Menge an GSH und GSSG im Kulturüberstand. Durch die Inkubation mit 1 mM Kupfersulfat ist bei BY4741 ein Glutathionanstieg von 2,4, bei Zellen mit pYES260 von 3,5 und bei *mte1* exprimierenden Zellen ein Anstieg von 5,2 zu beobachten. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei einer höheren Konzentration an Kupferionen in der Zelle Glutathionkonjugate über den Mte1-Transporter exkretiert werden.

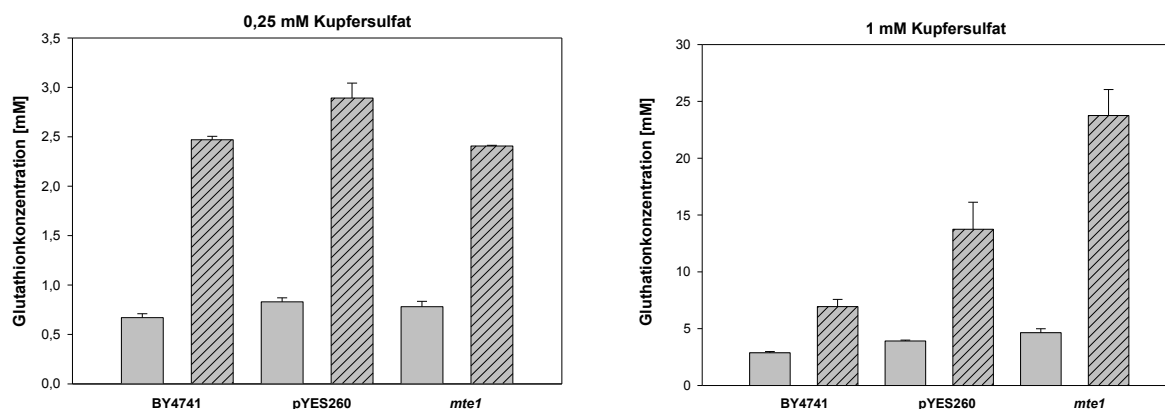


Abb. 4.20 Bestimmung der Glutathionkonzentration

Nach dem Einstellen der Zellzahl auf $OD_{600} = 1$ wurden die Hefezellen 6 h ohne bzw. mit 0,25 mM oder 1 mM $CuSO_4$ inkubiert und im Anschluss die Glutathionkonzentration im Medium bestimmt, leere Balken zeigen den GSH-Gehalt ohne $CuSO_4$, gestreift mit 1 mM $CuSO_4$.

4.2 Induktion der Transporteraktivität bei *T. vaccinum* und *Schizophyllum commune*

Die von Mte1 aus *T. vaccinum* transportierten Substrate legen eine Funktion in der Stressantwort des Pilzes nahe. Da für *S. commune* 2 MATE-Paraloge im Genom identifiziert werden konnten, sollte die Induktion der Transporteraktivität sowohl in *T. vaccinum* als auch für weiterführende Untersuchungen in *S. commune* erfolgen. Dazu wurde zunächst durch eine Adaption an Fungizide eine erhöhte Expression stressrelevanter Gene induziert.

Zunächst wurde *T. vaccinum* auf MMNb-Agar mit unterschiedlichen Triazolgehalten inkubiert. Dabei zeigte der Wildtyp ein eingeschränktes Wachstum bis zu einer Konzentration von 0,025 mg/l. Durch die schrittweise Erhöhung der Triazolkonzentration konnte eine Adaption bis auf 0,1 mg/l Triazol erreicht werden. Die adaptierten Kulturen zeigten nach einer 5 wöchigen Inkubation auf 0,1 mg/l triazolhaltigem Medium Wachstum auf dem Inokulationsblock und ein beginnendes Wachstum auf dem Medium. Eine höhere Adaption als 0,1 mg/l Triazol konnte nicht erreicht werden.

Auch gegenüber dem Strobilurinfungizid Amistar ist *T. vaccinum* sensitiv. Der Wildtyp wuchs nach 4 Wochen Inkubation bis zu einer Konzentration von 0,05 mg/l, konnte jedoch auch geringfügig auf 0,075 mg/l Strobilurin wachsen. Das Myzel von *T. vaccinum* wurde ebenso schrittweise an das Strobilurin adaptiert und zeigte ein Wachstum bis maximal 0,25 mg/l.

S. commune W22 wurde, ebenso wie *T. vaccinum*, an das Triazolfungizid Opus adaptiert. Der Wildtyp konnte auf einer Konzentration von 0,1 mg/l noch wachsen, zeigte aber bei 0,25 mg/l Triazol kein Wachstum mehr. Es erfolgte eine schrittweise Adaption bis zu einer Konzentration von 1,25 mg/l Triazol.

Auf strobilurinhaltigem Medium zeigte sich, dass *S. commune* bis zu einer Konzentrationen von 18 mg/l Strobilurin resistent ist, sodass keine weiteren Adaptionsversuche unternommen wurden.

Adaptierte und nicht adaptierte Stämme wurden mit den beiden interkalierenden Farbstoffen Ethidiumbromid und Hoechst33342 gefärbt und anschließend mikroskopiert, um einen erhöhten Efflux aufgrund der gesteigerten Transporteraktivität sichtbar zu machen (Abb. 4.21 bis 4.23).

Bei den nicht adaptierten Stämmen wurden mit beiden Farbstoffen lediglich die Kerne und DNA-enhaltene Zellbestandteile gefärbt. Bei den adaptierten Stämmen wird die erhöhte Transporteraktivität durch eine Färbung entlang der Cytoplasmamembran und Zellwand sichtbar, teilweise fluoreszierte aber auch des Cytoplasma. Dies kann durch erhöhten, ständigen Efflux und damit lokale Konzentrationserhöhung erklärt werden. Für beide Pilze war es dadurch möglich, die Protonen -Abhängigkeit der induzierten Transporter zu untersuchen. Durch die Zugabe des Ionophores CCCP wird der Protonengradient entkoppelt, was zu einer Inhibierung von protonenabhängigen Transportern führt. Mikroskopisch zeigten adaptierte Hyphen durch den Ausfall des Efflux-Transports wieder eine Kernfärbung.

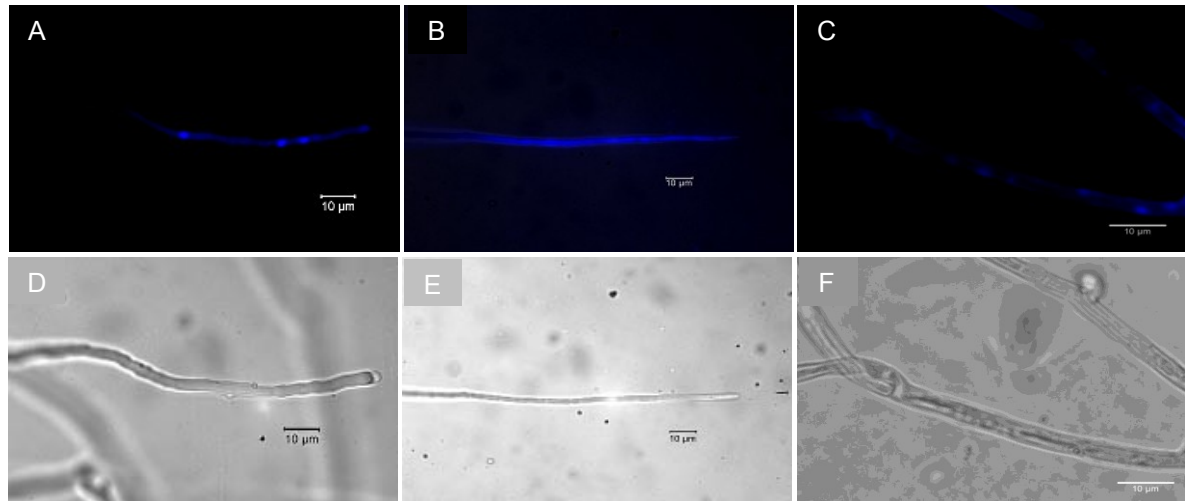


Abb. 4.21 Effluxfärbung mit Hoechst 33342 bei *S. commune* -Hyphen

Die Hyphen von *S. commune* W22 (A, D) und von dem an das Triazol adaptierten Stamm (B, E) wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Der adaptierte Stamm wurde zudem vor der Färbung mit dem Ionophor CCCP behandelt (C, F), wodurch eine erhöhte Transporteraktivität aufgehoben wird (Fotos: A, B, D, E: Bugge; C, F: Herzlieb).

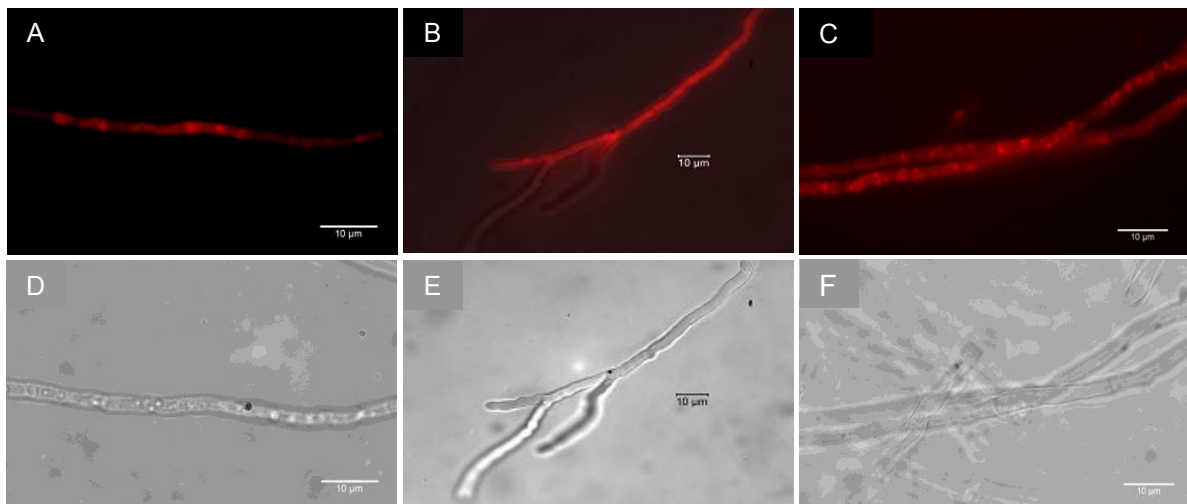


Abb. 4.22 Effluxfärbung mit Ethidiumbromid bei *S. commune* Hyphen

Die Hyphen von *S. commune* W22 (A, D) und von dem an das Triazol adaptierten Stamm (B, E) wurden mit Ethidiumbromid gefärbt. Der adaptierte Stamm wurde zudem vor der Färbung mit dem Ionophor CCCP behandelt (C, F), wodurch eine erhöhte Transporteraktivität aufgehoben wird. (Fotos: A, C, D, F: Herzlieb; B, E: Bugge).

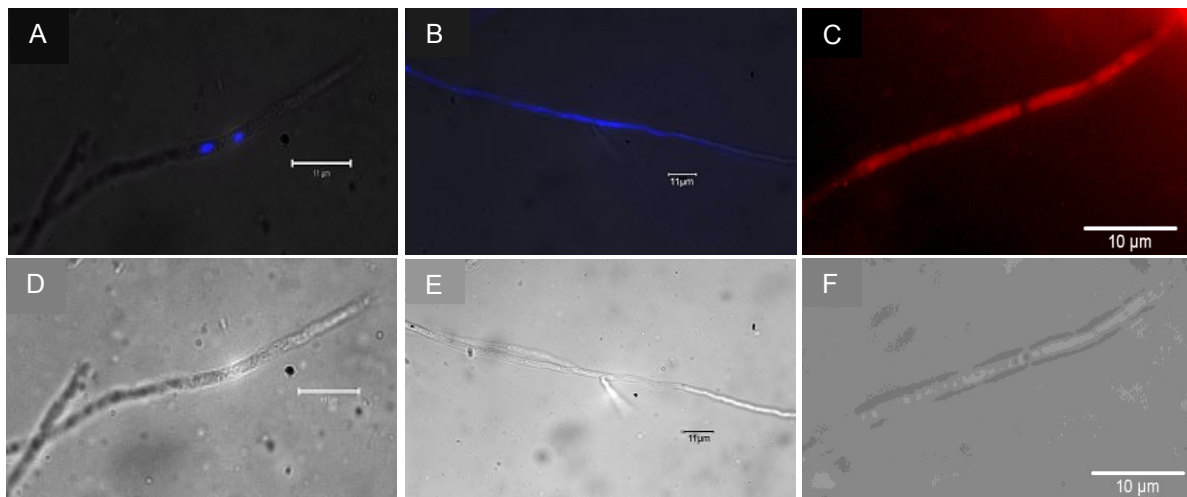


Abb. 4.23 Effluxfärbung mit Hoechst 33342 und Ethidiumbromid bei *T. vaccinum*

Die Hyphen von *T. vaccinum* Wildtyp (A, D) und den Triazol-adaptierten Stamm (B, E) wurden mit Hoechst 33342 gefärbt und der an 0,1 mg/l Strobilurin-adaptierten Stamm (C, F) mit Ethidiumbromid. (Fotos: A, B, D, E: Bugge, C, F: Herzlieb).

4.3 Gene der MATE-Familie von *S. commune*

Durch BLAST-Analysen im Genom von *S. commune* H4-8 mit der Proteinsequenz von *T. vaccinum* Mte1 konnten zwei MATE-Gene identifiziert werden. Das Gen mit der Protein ID 112184 (Mte1) hat eine hohe Homologie zu Mte1 aus *T. vaccinum* auf AS-Ebene von 57,6%, das zweite Protein mit der ID 108497 (Mte2) lediglich eine Homologie von 27,5%. Zudem haben beide Gene zueinander eine Homologie von 26,1% auf AS- und 22,8% auf bp-Ebene. Die Analyse der Domänstruktur ergab auch hier für beide Proteine Ähnlichkeiten zu den bisher beschriebenen Proteinen Mte1, YDR338c und ERC1 (Abb. 4.24).

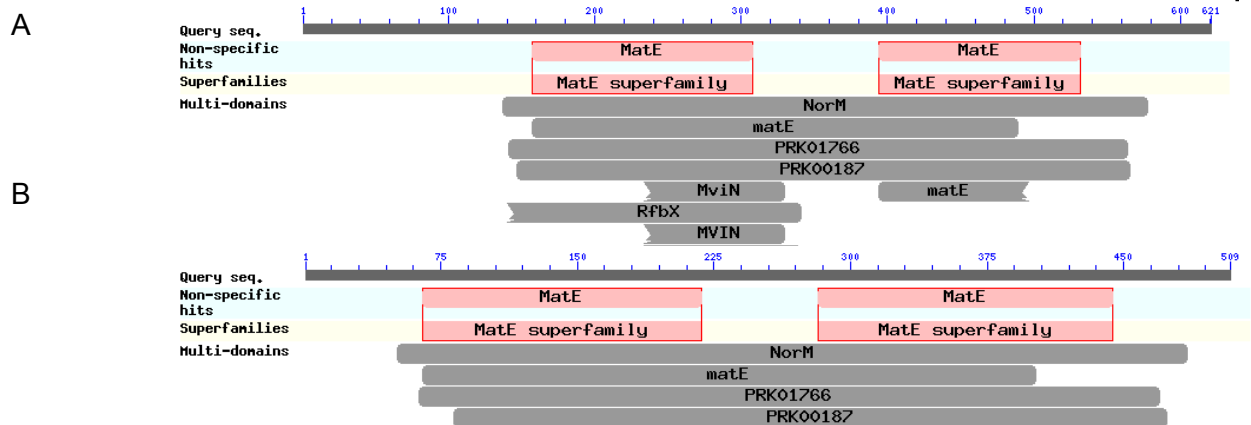


Abb. 4.24 Konservierte Domänen der MATE-Gene von *S. commune*

Dargestellt sind die Domänen in den Proteinen MTE1 (A) und MTE2 (B) (NCBI conserved domain search). Neben den zwei MatE-Domänen befinden sich eine NorM- und eine matE-Domäne sowie eine PRK1766- und PRK00187-Domäne in beiden Proteinen, welche alle mit Transportern der MATE-Familie im Zusammenhang stehen. Weiterhin konnten geringe Ähnlichkeiten zu RfbX-, MviN- und PRK10189-Domänen im Protein Mte1 gefunden werden.

In der Sequenz stromaufwärts des Genanfangs von *mte1*, die die Promotorregion einschließt und ca. 1,3 kb zum Stoppcodon des davor liegenden Gens reicht, liegen 4 Stress-Response Elemente (STRE). Das erste befindet sich 796 bp entfernt vom Startcodon, danach folgen die weiteren STREs mit einem Abstand von 831 bp, 1032 bp und 1210 bp zum *mte1*-Genanfang. Für *mte2*, dessen möglicher Promotorbereich aufgrund des davor liegenden Gens nur 432 bp umfassen kann, konnte ein STRE 97 bp vor dem Startcodon identifiziert werden (Anhang, Abb. A9 und Abb. A10).

Beide Proteine enthalten zwei MatE superfamily-Domänen und eine NorM-Domäne, die in ähnlicher Position auch bei *T. vaccinum* Mte1 und den beiden MATE-Genen von *S. cerevisiae* zu finden sind. Auffällig ist jedoch das Fehlen der MviN-Domänen in Mte2 aus *S. commune*.

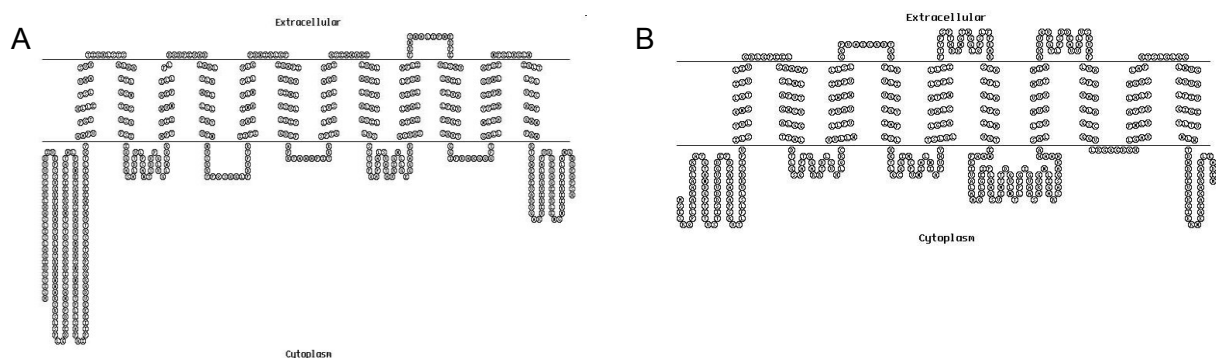


Abb. 4.25 Transmembrandomänenstruktur der MATE-Transporterproteine von *S. commune*

Die Analyse der Struktur von Mte1 (A) und Mte2 (B) erfolgte anhand der Proteinsequenz mit HMMTOP 2.0 und die Darstellung mit Topo2.

Die Analyse der Transmembranstrukturen erfolgte mit HMMTOP 2.0 (Abb. 4.25). Während das Protein Mte1 die charakteristische 12 Transmembrandomänstruktur aufweist, fehlen ScoMte2 mit nur 10 Transmembranhelices zwei Bereiche. Zudem unterscheiden sich die intra- und extrazellulären Sequenzbereiche im Hinblick auf die Anzahl der Aminosäuren im jeweiligen Kompartiment voneinander.

Das Gen *mte1* wurde aufgrund seiner hohen Ähnlichkeit zu *mte1* aus *T. vaccinum* näher untersucht. Um Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen *S. commune* Stämmen zu untersuchen, wurde ein 1423 bp großes, internes Fragment mit den Primern ScM1-1F und ScM1-1R aus 9 verschiedenen *S. commune* Stämmen amplifiziert. Die klonierten Fragmente wurden sequenziert und mit dem Fragment der Genomsequenz des Stammes H4-8 verglichen (Anhang Abb. A11).

Die Sequenzanalyse zeigt, dass die Stämme sich unterschiedlich stark voneinander unterscheiden. Insgesamt können an 197 Positionen im amplifizierten Fragment von 1423 bp Größe stammspezifischen Unterschiede in der Nukleotidsequenz gefunden werden. Besonders die Stämme E6, T1 und der sequenzierte Stamm H4-8 weichen häufig von der Konsensussequenz der anderen 7 Stämmen ab, 62 mal an der gleichen Position und in 95% der Fälle stimmen an diesen Positionen die Nukleotide aller 3 Stämme überein.

Häufig sind jedoch die Intronbereiche von den Veränderungen betroffen, so dass in den meisten Fällen die Proteinsequenz unverändert ist (Anhang Abb. A12). Lediglich die Aminosäuren an Position 119 im Stamm H4-8 (A statt V), Position 243 im Stamm T1 (P statt T) und im Stamm 12-44 an Position 256 (F statt L) sind verändert. Diese betreffen jedoch nur einzelne Stämme. Auffällig ist hingegen die Aminosäure 247 im Protein der Stämmen 2-2, 12-44, 2-7, T40 und W21. In diesen Stämmen wird der Leserahmen durch die Basenfolge TGA unterbrochen, welche normalerweise ein Stoppcodon kodiert, wohingegen in den anderen Stämmen ein Tryptophan codiert wird.

Durch die Genomsequenzierung von *S. commune* H4-8 können neben der Sequenzanalyse auch Expressionstudien durchgeführt werden. Dazu wurden alle Gene in Form von kurzen Oligonukleotiden auf einen Biochip der Firma Febit gespottet und durch die Hybridisierung mit RNA die Expression in Mono- und Dikaryen, verschiedenen Mutanten und unter Stressbedingungen untersucht. Es wurden Monokaryen der Stämme 12-43 und 4-39, verschiedene Dikaryen (W22 x 12-43, W22 x 4-39, W21 x 4-39) sowie der Stamm 12-43 auf Medium mit Haldensickerwasser, der Stamm W22 unter Cadmiumexposition und W22 adaptiert an das Triazolfungizid Opus, ein Dikaryon (12-43 x 4-39) auf Stein gewachsen, sowie Dikaryen mit verschiedenen Pheromonrezeptortransformanten (A6 x 4-39, G11 x 4-39, T x 4-39), die Ras-Mutante T2G12V, die Zellzyklusregulatoremutante *cdc42* und der Deletionsstamm Δ gap verwendet. Für die Gene *mte1* und *mte2* wurden zwei verschiedene Oligonukleotide im 3'-Genbereich verwendet. Die Expressionsanalyse von *mte1* und *mte2*

zeigt, dass beide Gene unter den beschriebenen Bedingungen nicht reguliert sind. Auch in dem an das Fungizid Opus adaptierten Stamm kann keine veränderte Expression festgestellt werden. Es wird lediglich deutlich, dass *mte2* etwas höher exprimiert ist als *mte1*. Erkennbar ist außerdem, dass die Expression in den unbehandelten Monokaryen von 12-43 und 4-39 bereits stark voneinander abweicht. Sollte der Transporter nur geringfügig reguliert sein kann die große Abweichung zwischen den verschiedenen Monokaryen dies überdecken (Abb. 4.26, Anhang Tab. AT9).

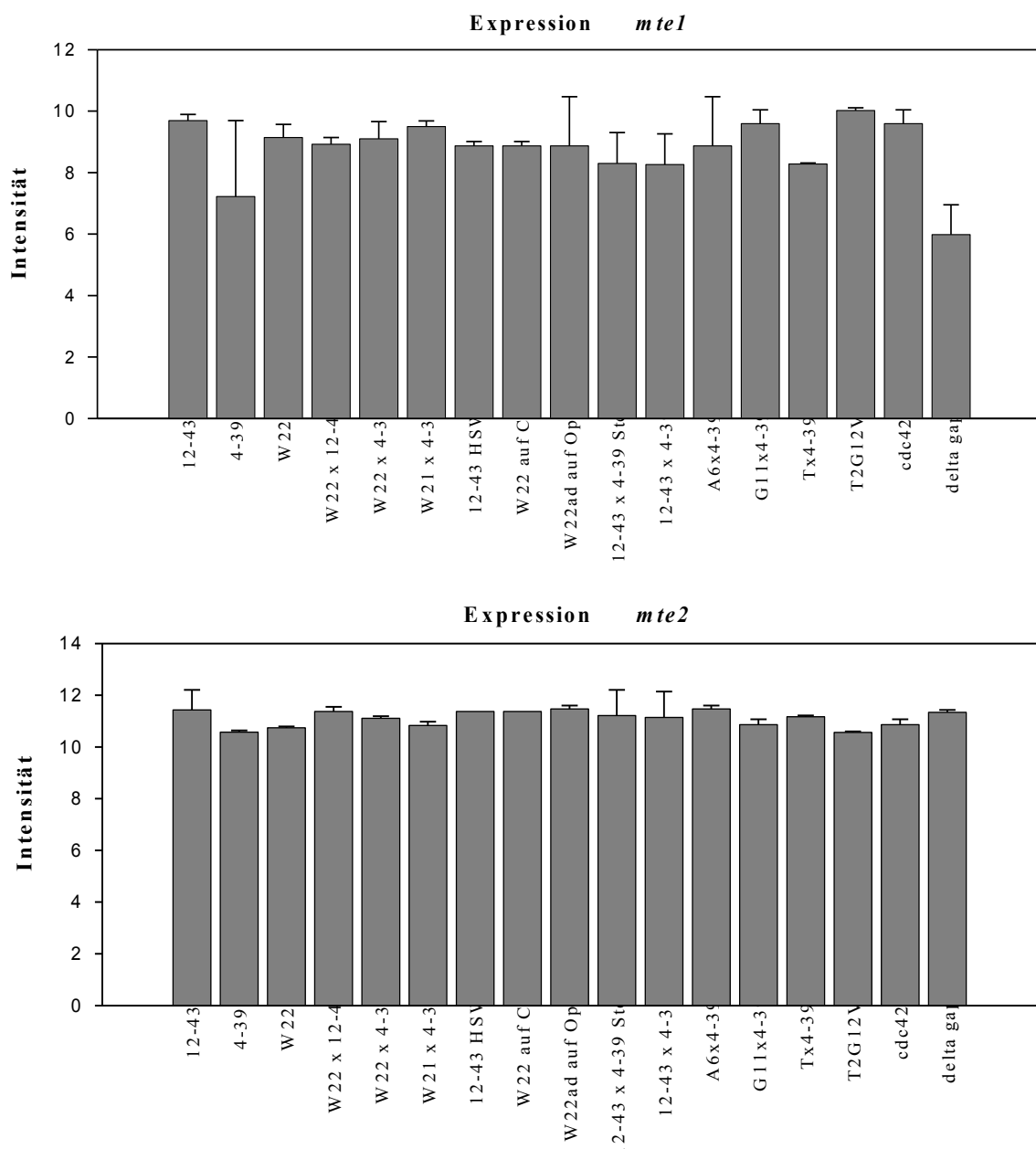


Abb. 4.26 Expression *scome1* und *scome2*

Die Biochip-Analyse erfolgte durch die Hybridisierung von RNA aus Transformanten oder behandelten Stämmen, darunter die Monokaryen 12-43, 4-39 und W22 (*thin*-Mutante), die Dikaryen W22 x 12-43, W22 x 4-38, W21 x 4-29, der Stamm 12-43 auf Haldensickerwasser, W22 unter Cadmiumexposition, der adaptierte Stamm W22 auf Opus, das Dikaryon 12-43 x 4-39 auf Stein gewachsen, die Rezeptortransformanten A6, G11 und T, der Stamm T2G12V, der ein konstitutiv aktives *ras1* enthält, die konstitutiv aktive *cdc42*-Mutante und ein *gap*-Deletionsmutante. Dargestellt sind die Intensitäten der Spots für *mte1* und *mte2*.

4.4 Genexpression in *S. commune* unter Stressbedingungen

Die Expression der beiden MATE-Gene von *S. commune* war in dem an das Fungizid Opus adaptierten Stamm W22 im Vergleich zu den nicht adaptierten Monokaryen nicht erhöht. Es wurden deshalb alle Gene untersucht, die im adaptierten Stamm induziert bzw. reprimiert sind. Dabei wurden nur die Gene einbezogen, die eine statistisch signifikant unterschiedliche Expression zeigen und deren Expression sich im Vergleich zu den Monokaryen der Stämme 12-43 bzw. 4-39 um mindestens das 5fache verändert hat. Außerdem wurden alle Gene analysiert, die im adaptierten Stamm, unter Cadmiumexposition und beim Wachstum auf Haldensickerwasser signifikant und über 5fach reguliert sind, um Aussagen über die allgemeine Stressantwort treffen zu können.

Insgesamt sind 851 Gene im adaptierten Stamm hochreguliert. Im Vergleich zu den beiden Monokaryen ist für 136 Gene eine mindestens 5fach positive Regulation signifikant. Das entspricht ca. 1% aller Gene von *S. commune* (Abb. 4.27, Anhang Abb. AT10).

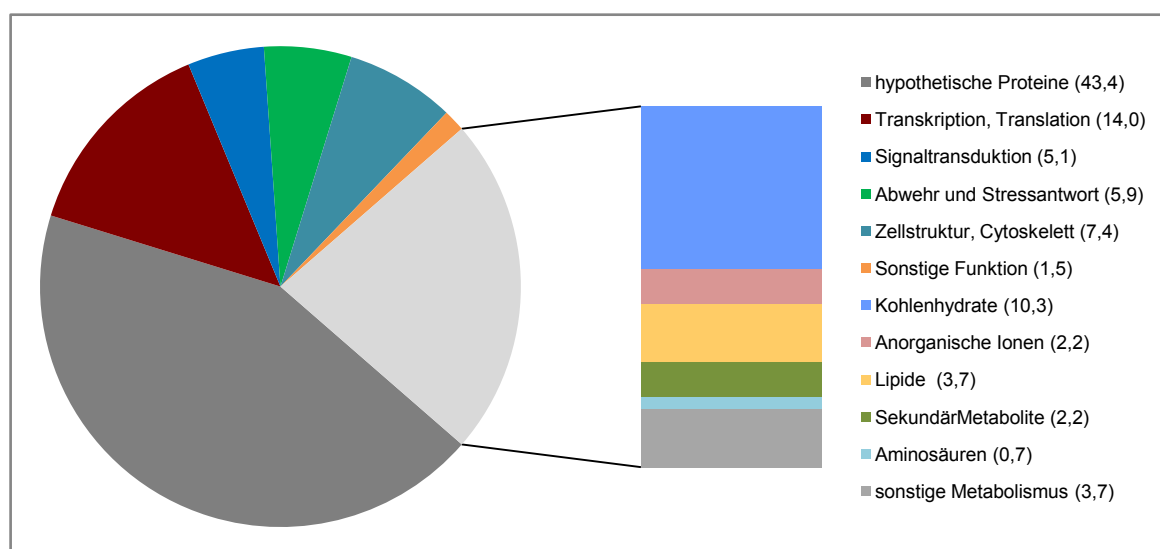


Abb. 4.27 Hochregulierte Gene im Fungizid-adaptierten *S. commune*-Stamm

Die 5fach hochregulierten Gene wurden ihrer Funktion nach zugeordnet und sind prozentual dargestellt. Der rechte, vom Kreis abgehende Balken symbolisiert Gene der Biosynthese, des Metabolismus und Transports. In Klammern hinter den Funktionsangaben stehen die prozentualen Werte.

Die induzierten Gene gehören insbesondere zu Kontrolle der Transkription und Translation, aber auch des Metabolismus, v.a. des Kohlenhydratstoffwechsels. Ebenso sind Gene der Stressantwort höher exprimiert, die, wie z.B. die Glutathion S-Transferase (Protein ID 83196) und einige Hitzeschockproteine, zur Entgiftung des Fungizids dienen könnten.

Im Vergleich zum Monokaryon über 20fach höher exprimiert sind insgesamt 19 Gene, was ca. 0,14% aller Gene von *S. commune* entspricht. Die drei höchst exprimierten Gene sind eine FtsJ ähnliche RNA-Methyltransferase (ID 113881, über 200fach), ein Glutathion-

abhängiges Formaldehyd-aktivierendes Protein (ID 48590, über 80fach) und eine Monooxygenase (ID 56510, über 60fach).

Es wurde weiterhin untersucht, ob sich unter den hochregulierten Genen Transporter befinden, die für die Ausprägung des erhöhten Effluxes von Ethidiumbromid bzw. Hoechst33342 verantwortlich sind (Abb. 5.29 und Abb. 5.30). Ein MFS-Transporter (ID 59779) und ein möglicher K^+/H^+ Antiporter (ID 80181) sind im adaptierten Stamm höher exprimiert. Beide Transporter sind jedoch noch nicht untersucht, so dass eine Aussage über deren Funktion in der Adaption an das Fungizid momentan nicht möglich ist.

Zu den reprimierten Genen im adaptierten *S. commune*-Stamm, insgesamt 1030, gehören 174 Gene mit signifikant, mindestens 5fach verringert Expression. Das entspricht ca. 1,3% aller Gene von *S. commune*. Darunter sind besonders Gene der Transkription und Translation, des Metabolismus sowie der Signaltransduktion, aber auch der Energieproduktion und -umwandlung. Im Bereich des Metabolismus sind Gene, die für den Nukleotidtransport und -metabolismus sowie für die Bereitstellung von Aminosäuren nötig sind, reprimiert. Ein Zusammenhang zur verringerten Transkription und Translation ist hierbei ersichtlich. Der B α 1 Pheromonrezeptor (ID 258344), der in der sexuellen Interaktion eine Rolle spielt, ist ebenfalls reprimiert, was auf eine verringerte Kreuzungsbereitschaft und Repression der sexuellen Vermehrung hindeutet (Abb. 4.28, Anhang Abb. AT11).

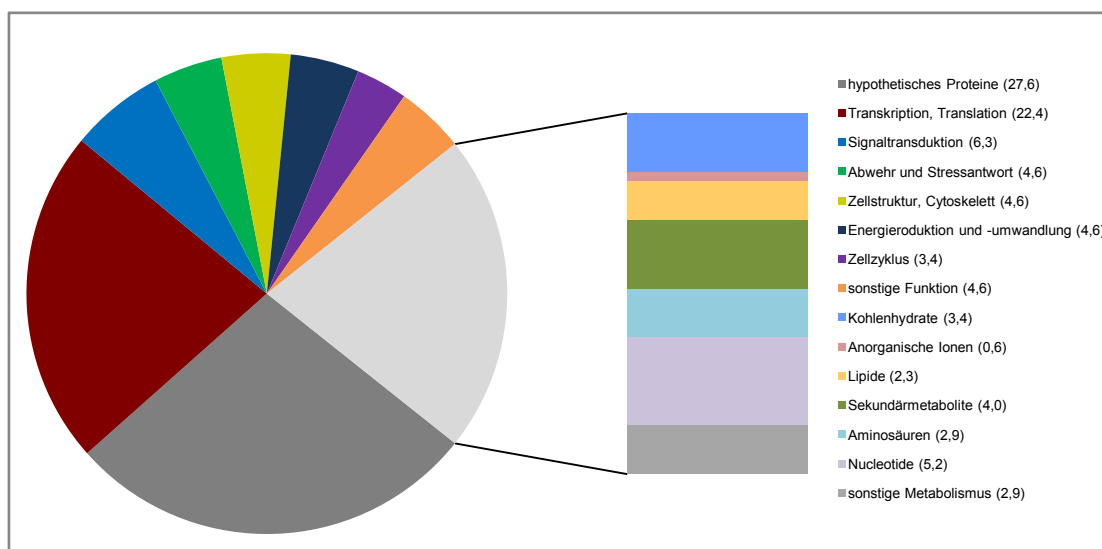


Abb. 4.28 Reprimierte Gene im Fungizid-adaptierten *S. commune*-Stamm

Die 5fach reprimierten Gene wurden ihrer Funktion nach zugeordnet und diese prozentual dargestellt. Der rechte, vom Kreis abgehende Balken symbolisiert Gene der Biosynthese, des Metabolismus und Transports. In Klammern hinter den Funktionsangaben stehen die prozentualen Werte.

Besonders stark reprimiert, d.h. eine um das 20fache verringerte Expression, sind 35 Gene (ca. 0,27%), darunter die beta-1-Untereinheit eines Kaliumkanals (ID 230597, über 300fach), der am Energiestoffwechsel beteiligt ist, die Flavonol-Reduktase/Cinnamoyl-CoA-Reduktase

(ID 53882, über 250fach), ein Enzym der Abwehrreaktion und ein proteolytisches Enzym (ID 36451, über 140fach).

Neben in der Adaption regulierten Genen wurde nach Genen der Stressantwort gesucht. Dafür wurde die Daten aus den Biochipanalysen des Fungizid-adaptierten Stamm, von dem unter Cd-Exposition inkubierten und dem auf Haldensickerwasser gewachsenen Stammes verglichen. Insgesamt sind 11 Gene über 5fach hochregulierten und 6 Gene reprimiert (Anhang Tab. AT12 und Tab. AT13). Besonders hoch exprimiert, teilweise über 120fach, ist unter allen 3 Bedingungen das Protein mit der ID 58836. Eine genaue Funktion kann diesem Protein nicht zugeordnet werden, blastp-Analysen ergaben sehr geringe Ähnlichkeiten zu einer möglichen 26S Proteasom-Regulatoreinheit von *Phytophthora infestans* (NCBI Zugriffsnummer EEY54279), einem XRS2/NBS1-Protein von *Sordaria macrospora* (NCBI Zugriffsnummer CBI54659) und zu einem Phosphatase- und Aktin-Regulator von *Bos taurus* (NCBI Zugriffsnummer DAA32105). Der mögliche Promotorbereich dieses Gens 58836 besitzt 2 mögliche STREs (Anhang, Abb A13).

4.5 *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation (ATMT) von *Tricholoma* sp.

4.5.1 Etablierung des Transformationsystems

Ein geeignetes und effizientes System zur Transformation ist eine grundlegende Voraussetzung, um die Funktion von Genen und Proteinen in einem Organismus zu untersuchen. Durch das Einbringen von Reportergenen können beispielsweise die Expression eines Gens zu bestimmten Zeiten oder in unterschiedlichen Geweben untersucht werden. Die Methode der ATMT erwies sich bereits bei einer Vielzahl von Pilzen als eine besonders einfache und effiziente Methode. Um zukünftig genetische Studien an *Tricholoma* sp. durchführen zu können, wurde ein Protokoll zur Transformation mit *A. tumefaciens* erarbeitet.

Die Transformation der Ektomykorrhiza-Pilze *T. vaccinum* und *T. terreum* erfolgte durch den Stamm *A. tumefaciens* AGL1, der neben dem Helfer-Ti-Plasmid den binären Vektor pBGgHg trägt (Abb. 4.29, Chen *et al.*, 2000). Auf dem Plasmid pBGgHG mit dem pCAMBIA1300-Rückrat sind zwischen der rechten und linken T-DNA-Grenze als Selektionsmarker das Hygromycin-B-Phosphotransferase Gen (*hph*) von *E. coli* für die Resistenz gegenüber Hygromycin B und als Reportergen das „enhanced green fluorescence protein“ (*egfp*) lokalisiert. Beide Gene stehen unter der Kontrolle des konstitutiven Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (*gpd*)-Promotors von *Agaricus bisporus*. Zur Termination der Transkription enthält das Plasmid den CaMV35S-Terminator.

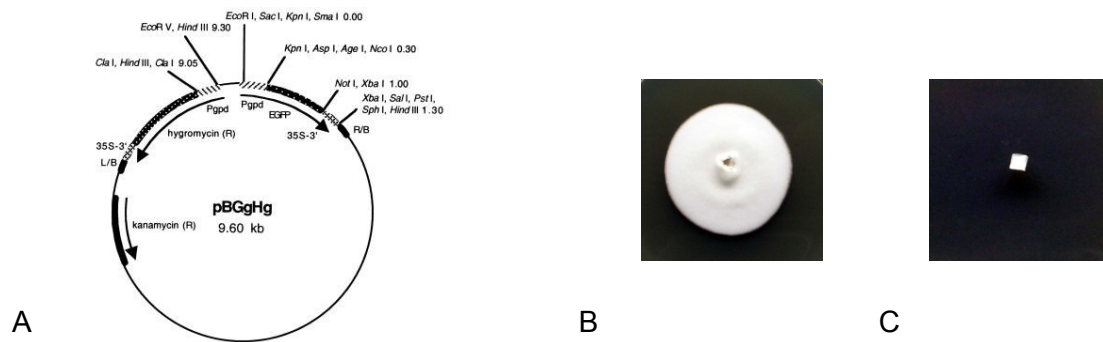


Abb. 4.29 Transformationsplasmid und Sensitivität von *Tricholoma vaccinum* gegenüber Hygromycin B

Transformationsplasmid pBGgHg (A) und 4wöchiges Wachstum von *T. vaccinum* Wildtyp auf MMNb-Agar (B) bzw. auf MMNb mit 10 µg/ml Hygromycin B.

Um die optimale Konzentration von Hygromycin B zu bestimmen, die zur Selektion der Transformanten genutzt werden kann, wurde Myzel von *T. vaccinum* und *T. terreum* auf MMNb-Agar mit unterschiedlichen Gehalten an Hygromycin B inkubiert. Nicht transformierte Stämme wurden in ihrem Wachstum bei bereits 10 µg/ml Hygromycin B gehemmt (Abb. 4.29). Zur Selektion möglicher Transformanten erfolgte die Zugabe von 25 µg/ml Hygromycin B zu MMNb-Agar.

Für die Transformation wurden aus ca. 4 Wochen alten *T. vaccinum*- oder *T. terreum*-Kulturen 1 mm² große Myzelstücke auf 1 cm² große Nylonmembranstücke, welche auf MMNb-Agar aufgelegt wurden, überimpft. Die Kulturdauer umfasste ca. 2 Wochen bis sich ausreichend Luftmyzel gebildet hatte. *A. tumefaciens* wurde 2 d bei 28°C in Minimalmedium inkubiert, anschließend abzentrifugiert und in neuem Minimalmedium mit 200 µM Acetosyringon zur Aktivierung der *vir*-Gene für weitere 6 h bei 28 °C inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm gemessen und auf 0,1 bzw. 0,2 eingestellt. Jeweils 50 µl Bakteriensuspension wurden pro Myzel zugegeben. Nach einer Co-Kultivierung von 1 bzw. 2 Tagen wurde die Nylonmembran auf Selektivplatten mit 25 µg/ml Hygromycin B und zur Abtötung von *A. tumefaciens* mit 200 µg/ml Cefotaxime und 100 µg/ml Ampicillin überführt. Erste Transformanten konnten nach 1-2 Wochen detektiert werden (Abb. 4.30).

Die Effizienz der Transformation wurde durch die zugegebene Menge an Bakterien sowie durch die Dauer der Co-Kultivierung wesentlich beeinflusst. Es konnte beobachtet werden, dass die Pilze unterschiedliche Bedingungen für die Transformation benötigen. So kann unter optimalen Bedingungen, d.h. für *T. vaccinum* eine Inokulationsdichte von *A. tumefaciens* von 0,1 und 1 d Co-Kultur sowie für *T. terreum* eine Bakteriendichte von 0,2 und eine Dauer der Co-Kultivierung von 2 d, eine Transformationseffizienz von ca. 30% erreicht werden.

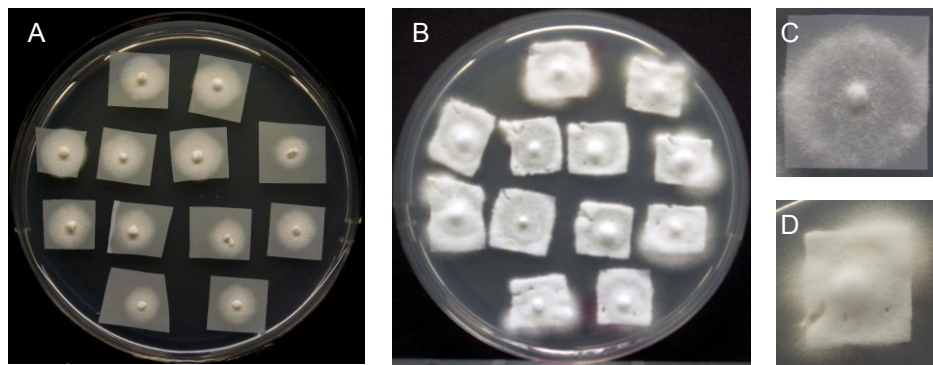


Abb. 4.30 Transformation von *T. vaccinum*

Myzel von *T. vaccinum* wurde bis zu einer Größe von ca. 1 cm² auf einer Nylonmembran angezogen (A). 2 Wochen nach der Co-Kultivierung mit *A. tumefaciens* konnten erste Transformanten auf Selektionsmedium detektiert werden (B, D). Nicht transformiertes Myzel zeigte kein Wachstum auf dem Selektionsmedium (C).

4.5.2 Untersuchung der *T. vaccinum*-Transformanten

Aus 3 unabhängigen Transformationsexperimenten mit *T. vaccinum* wurden 10 Transformanten, T1 bis T10, ausgewählt und näher charakterisiert.

Durch die Transformation der T-DNA-Region in das Genom von *T. vaccinum* konnten die Transformanten auf Hygromycin B-haltigen MMNb-Agar wachsen. Die Integration des *egfp*- und *hph*-Gens wurde durch Amplifizierung mittels PCR unter Verwendung der Primer Egfp-1 und Egfp-2 bzw. Hph-F und Hph-R untersucht. In Abb. 4.31 ist die PCR für 8 Transformanten beispielhaft dargestellt, untersucht wurden alle 10 Transformanten. Bei allen Transformanten wurden die Gene der T-DNA-Region nachgewiesen.

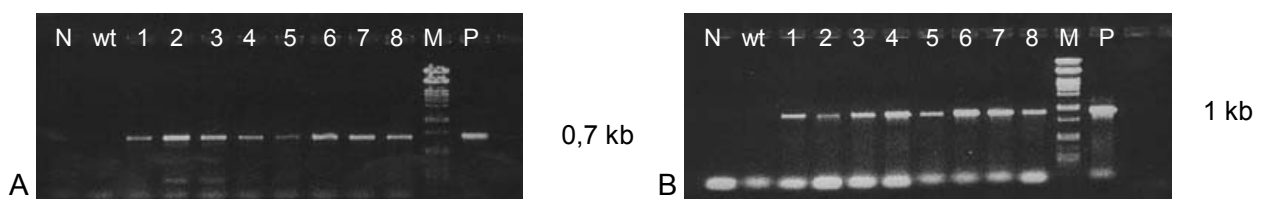


Abb. 4.31 Integration der T-DNA-Region in das Genom von *T. vaccinum*

Die Überprüfung der Integration erfolgte mit PCR mit den Primern Egfp-1 und Egfp-2 (A) sowie Hph-F und Hph-R (B). N ist die Negativkontrolle, wt der Wildtyp, 1-8 sind 8 verschiedene Transformanten, M mit *Pst*I geschnittene λ -DNA als Marker und P ist die Positivkontrolle mit dem Plasmid pBGgHg.

Es wurde zudem die Kopienzahl von *egfp* in den Transformanten T1 bis T4 in Southern-Blot-Analysen ermittelt. Dazu wurde die genomische DNA isoliert und mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI geschnitten. Die Hybridisierung erfolgte mit dem *hph*-PCR-Fragment unter stringenten Bedingungen. Für die Transformanten T1, T3, T4 und T5 konnte

eine Einfachintegration und für T2 eine Mehrfachintegration ermittelt werden (Anhang, Abb. A14). Ob es sich im Genom von T2 um 2 oder 3 Kopien von *hph* handelt, ist nicht zweifelsfrei zu erkennen.

Die ektopische Integration der T-DNA-Region in das Genom von *T. vaccinum* könnte durch die Zerstörung wichtiger Gene Wachstumsveränderungen hervorrufen. Zur Untersuchung wurden die Transformanten und der Wildtyp auf MMNb-Agar ohne Hygromycin B für 3 Wochen bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend der Durchmesser gemessen (Abb. 4.32, Anhang Tab. AT14).

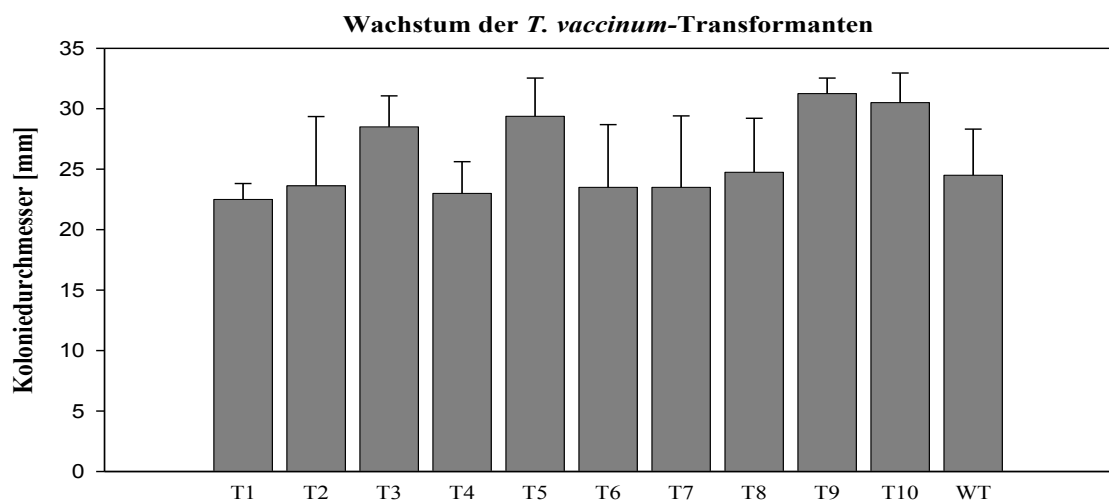


Abb. 4.32 Wachstum der Transformanten und des Wildtyps auf MMNb.

Myzel der Transformanten und des Wildtyps wurde von 4 Wochen alten Kulturen entnommen und auf MMNb-Agar 3 Wochen inkubiert. Der Durchmesser der Myzelien wurde pro Stamm bei 8 Kolonien gemessen.

Die Transformanten zeigten keine signifikanten Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Wachstumsunterschiede können innerhalb einer Agarplatte auftreten und sind häufig dadurch bedingt, dass überimpftes Myzel aus Bereichen unterschiedlichen Wachstums stammt und tritt ebenso beim Wildtyp auf. Die Integration von *egfp* und *hph* in das Genom hat somit keinen Einfluss auf das Wachstum.

Ebenso wie Wachstumsunterschiede können ins Genom eingebrachte Fremdgene einen Einfluss auf die Morphologie haben. Deshalb wurden die Transformanten makroskopisch untersucht (Abb. 4.33). Es konnten keine Unterschiede in der Morphologie festgestellt werden, alle Transformanten zeigten das gleiche Myzelwachstum wie der *T. vaccinum*-Wildtyp. Auch mikroskopisch glichen die Transformanten dem Wildtyp (Anhang, Abb. A15).

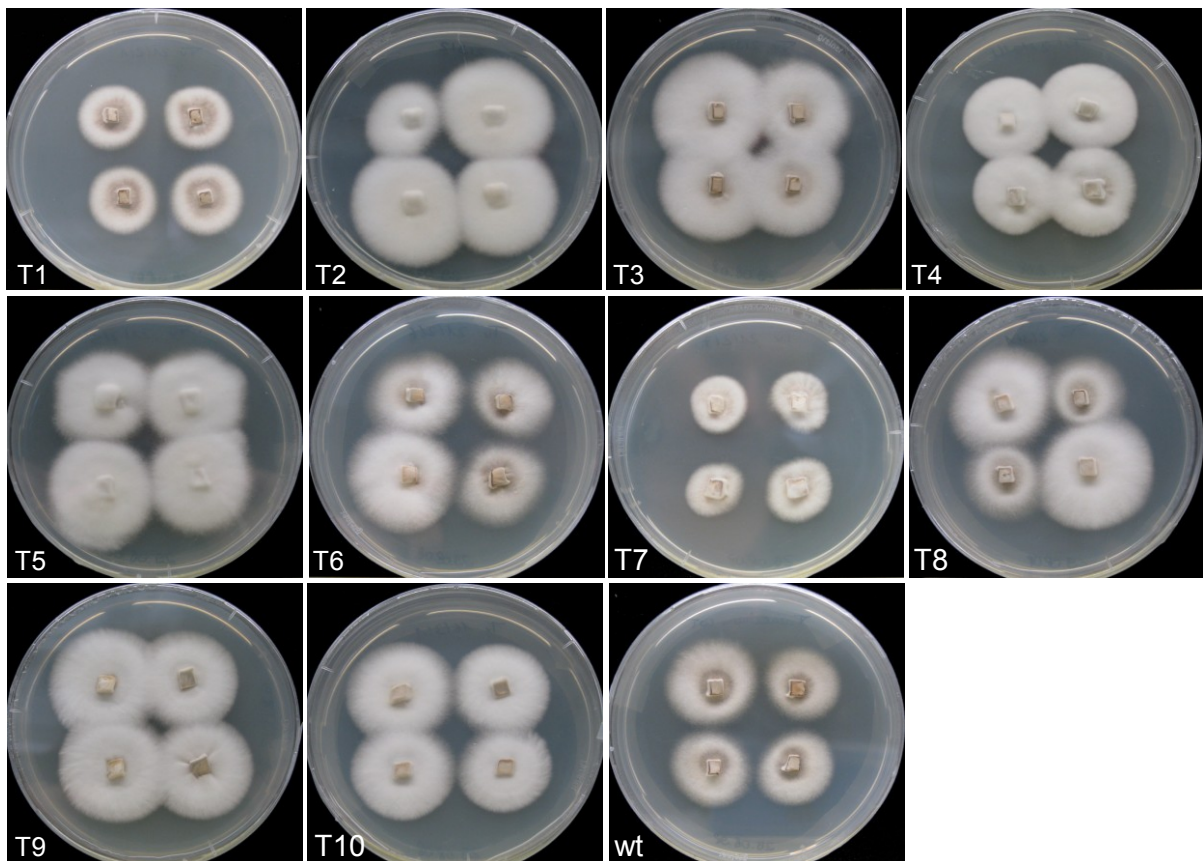


Abb. 4.33 Makroskopische Untersuchung der Transformanten auf MMNb

Die Transformanten und der Wildtyp wurden 4 Wochen bei Raumtemperatur inkubiert. Vermerkt auf den Bildern ist in der unteren linken Ecke der Name der Transformante, wt kennzeichnet den Wildtyp.

4.5.3 Mitotische Stabilität

Transformierte Gene unterliegen ebenso wie andere Gene dem Selektionsdruck und können u.U. wieder aus dem Genom entfernt werden. Die mitotische Stabilität ist jedoch essentiell für Langzeituntersuchungen von Transformanten. Deshalb wurde bei den *T. vaccinum* Transformanten die stabile Integration ins Genom untersucht. In einem Kurzzeitexperiment wurden die Transformanten nach einer ca. 6 monatigen Inkubation auf Selektivmedium auf MMNb ohne Hygromycin B überimpft. Es konnte gezeigt werden, dass nach 3 Monaten alle Transformanten das *hph*-Gen enthielten und weiterhin auf Hygromycin B-haltigem Medium wachsen konnten.

In einem Langzeitexperiment über 5 Jahre wurden die Transformanten jeweils nach 3 monatiger Inkubation erneut auf frisches Selektivmedium mit 25 µg/ml Hygromycin B überimpft. Der dadurch ausgeübte Selektionsdruck führte dazu, dass die Transformanten das *hph*-Gen behielten. Sie wuchsen weiterhin auf Hygromycin B-haltigen MMNb und auch mit PCR mit den Primern Hph-F und Hph-R konnte die Integration bestätigt werden (Abb. 4.34). Ebenso wurde kontrolliert, ob *egfp* weiterhin im Genom integriert ist, da hier für die Organismen kein Selektionsdruck besteht. Dazu wurde die Amplifikation mit den Primern

EGFP-1 und EGFP-2 durchgeführt. Nach 3 Jahren in Kultur konnte bei den Transformanten T3, T4 und T5 trotz mehrfacher Wiederholung kein *egfp* mehr im Genom nachgewiesen werden. Nach 5 Jahren konnte kein weiterer Verlust von *egfp* mittels PCR festgestellt werden.

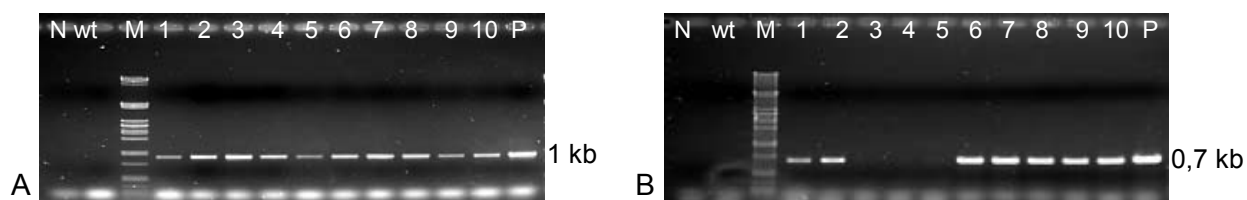


Abb. 4.34 Nachweis von *hph* und *egfp* 5 Jahre nach der Transformanten

Der Nachweis erfolgte mit PCR unter Verwendung der Primer Hph-F und Hph-R (A) bzw. Efgp-1 und Efgp-2 (B). N ist die Negativkontrolle, wt ist der Wildtyp, M ist mit *Pst*I geschnitten λ -DNA als Marker, 1 bis 10 kennzeichnen die 10 *T. vaccinum*-Transformanten und P ist die Positivkontrolle mit dem Plasmid pBGgHg.

Die Integration der beiden Gene in den Langzeitkulturen wurde zudem über Southern Blot-Analysen untersucht, bei denen die PCR-Amplifikate mit den Primerpaaren Hph-R/ Hph-F und EGFP-1/ EGFP-2 als Sonde eingesetzt und die isolierte genomische DNA mit *Eco*RV geschnitten wurden. Es konnte die Hygromycin-B-Phosphotransferase in 7 von 10 Transformanten in einer Kopie nachgewiesen werden. Drei Transformanten wiesen eine Mehrfachintegration auf. *Egfp* wurde mit unterschiedlicher Kopienzahl in allen Transformanten außer in T3, T4 und T5 nachgewiesen (Tab. 4.1, Anhang Abb. A16 und Abb. A17).

Tab. 4.1 Integrationsorte von *hph* und *egfp* im Genom von *T. vaccinum*

Transformante	<i>hph</i>	<i>egfp</i>
T1	1,9 kb	5 kb
T2	1,9 kb, 2,5 kb	1,9 kb, 5 kb
T3	1,6 kb	-
T4	1,7 kb	-
T5	1,7 kb	-
T6	3 kb, 11 kb	2,8 kb, 5 kb, 10 kb
T7	1,9 kb	4 kb, 5 kb
T8	2,5 kb	5 kb
T9	1,9 kb	1,7 kb, 2,8 kb, 5 kb
T10	1,6 kb, 1,9 kb, 2,5 kb, 2,8 kb	2,3 kb, 2,8 kb, 5 kb, 7 kb

4.5.4 Expression von *egfp*

Der konstitutive *gpd*-Promotor von *A. bisporus* ist in *T. vaccinum* voll funktionsfähig und führt zu einer Überexpression des integrierten Gens *hph*, was durch die Resistenz der Transformanten gegenüber Hygromycin B verdeutlicht wird. Die Expression von *egfp* wurde nach der Isolierung von RNA aus 4 Wochen altem Myzel der Transformanten T1 und T2 und anschließender reversen Transkription in cDNA mittels einer PCR mit den Primern EGFP-fwd und EGFP-rev überprüft (Abb. 4.35). Die vorherige Überprüfung der cDNA mit den Primern rf13a und rf13b ergab, dass keine genomische DNA in den Proben vorhanden war.

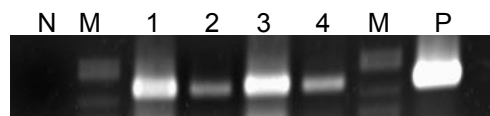


Abb. 4.35 Expression von *egfp* in den *T. vaccinum*-Transformanten T1 und T2

Die PCR erfolgte mit cDNA der Transformanten T1 (1, 2 Verdünnung der cDNA 1:10) und T2 (3, 4 Verdünnung der cDNA 1:10) unter Verwendung der Primer EGFP-fwd und EGFP-rev. N ist die Negativkontrolle, M mit *Pst*I geschnitten λ -DNA als Marker und P die Positivkontrolle mit pBGgHG.

Die Größe des amplifizierten Fragments von ca. 380bp entspricht dem *egfp*-Fragment. Neben *hph* konnte somit ebenfalls die *egfp*-Expression unter dem heterologen Promotor von *A. bisporus* in *T. vaccinum* gezeigt werden.

Zudem wurde untersucht, ob das Protein mikroskopisch detektierbar ist, um eine Aussage über die Anwendbarkeit von EGFP in Lokalisierungsstudien in *T. vaccinum* zu treffen. Dafür wurde Myzel der Transformanten T1 und T2 und des *T. vaccinum*-Wildtyps 2 Wochen in MMNb-Flüssigmedium inkubiert. Die Analyse des EGFP erfolgte im konfokalen Laser Scanning Mikroskop, wobei die Laserleistung sehr hoch eingestellt werden musste, um eine Fluoreszenz sichtbar machen zu können (Abb. 4.36).

Die Transformante T1 zeigt eine sehr schwache Fluoreszenz im Bereich des Cytoplasmas, was auf die Anregung des EGFP zurückzuführen ist. Das gleiche ist bei der Transformante T2 zu erkennen, auch hier fluoresziert das Cytoplasma grün. Jedoch ist auch bei dem Wildtyp eine im Vergleich zu den Transformanten extrem schwache Fluoreszenz erkennbar, die den Hyphenbereich ausfüllt.

Zwar sind Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen den Transformanten und dem Wildtyp vorhanden, diese sind aber nicht ausreichend, um eine eindeutige Differenzierung zur Autofluoreszenz der Hyphen treffen zu können. Zudem wurde das Myzel des *T. vaccinum* -Wildtyps im gesamten Lichtspektrum auf Eigenfluoreszenz hin untersucht, um festzustellen, ob für zukünftige Arbeiten möglicherweise andere Fluoreszenzproteine für die

Genanalyse besser geeignet sind als EGFP. Leider konnte kein Wellenlängenbereich gefunden werden, in dem das Myzel keine Eigenfluoreszenz aufwies.

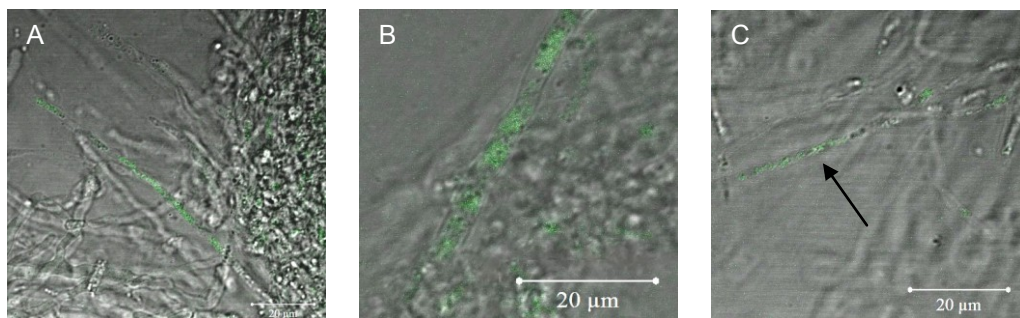


Abb. 4.36 Lokalisierung von EGFP

Das Myzel der Transformanten T1 (A) und T2 (B) sowie vom *T. vaccinum* Wildtyp (C) wurde 14 d in MMNb-Flüssigmedium inkubiert und die Fluoreszenz von EGFP mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 5 (Carl Zeiss GmbH) der Software ZEN 2009 (Argon Laser, Anregung 488 nm, Emission 505 nm) aufgenommen. Der Pfeil kennzeichnet die grüne Eigenfluoreszenz im *T. vaccinum* Wildtyp.

4.5.5 Mykorrhizierungsverhalten der Transformanten

Die Zusammensetzung des Mediums, auf dem Baum und Pilz gemeinsam wachsen und die Mykorrhizierung stattfindet, ist von entscheidender Bedeutung für die Symbiose. Es wurden zwei Medien, MMNa und L-MMN + 5 g/l Glucose, mit ähnlicher Zusammensetzung verglichen, auf denen 4 Wochen alte Fichtekeimlinge mit dem *T. vaccinum*-Wildtyp 3 Monate inkubiert wurden (Abb. 4.37).

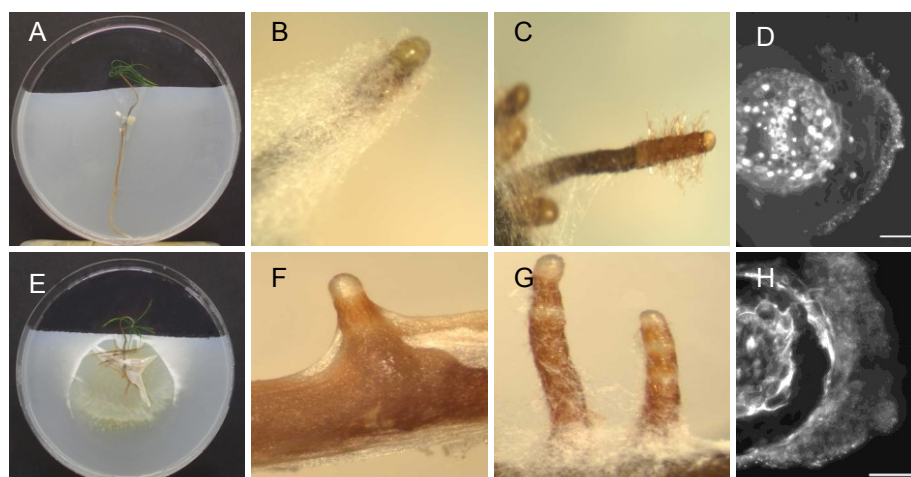
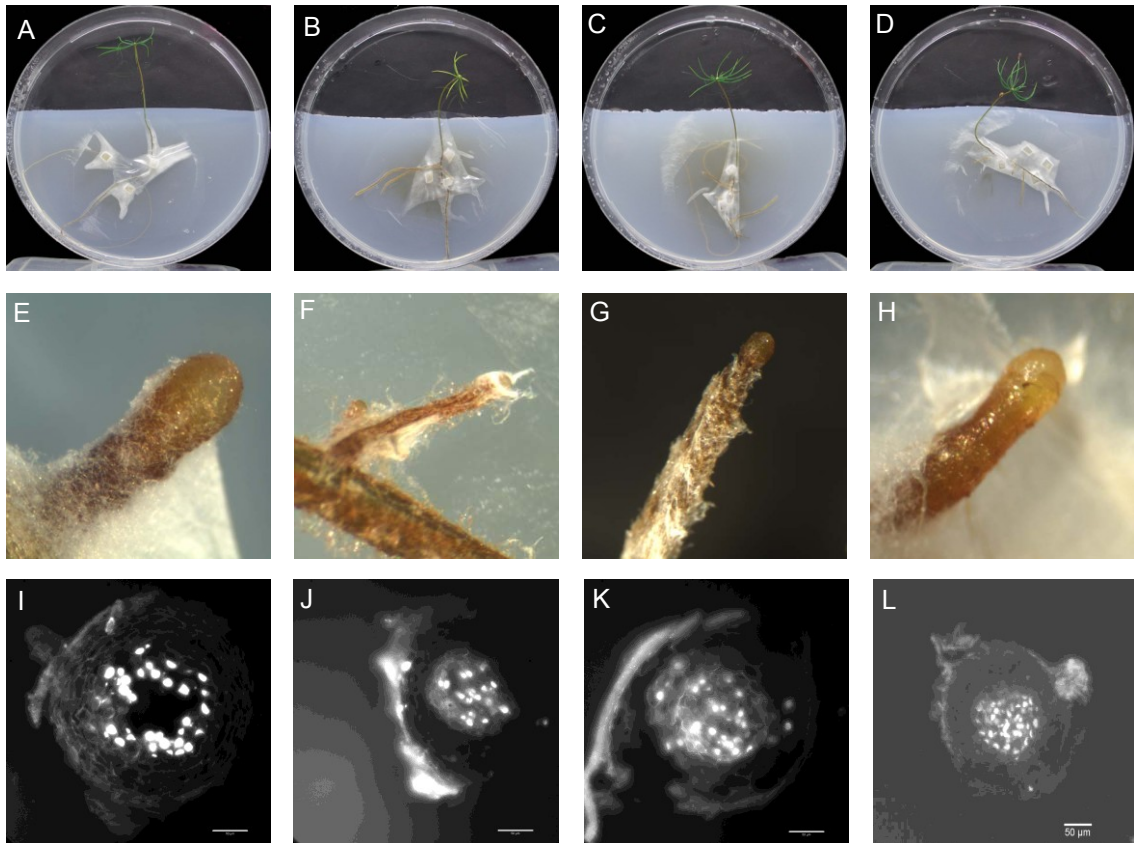


Abb. 4.37 *In vitro* Mykorrhiza-Synthese auf verschiedenen Medien

T. vaccinum-Wildtyp wurde 3 Monate an Fichtekeimlingen auf MMNa (A-D) bzw. L-MMN (E-H) inkubiert. Die makroskopische Darstellung (A, E) ist den Kurzwurzelbildern (B-C, F-G) und den Querschnitten der mykorrhizierten Wurzeln (D, H) gegenübergestellt. In den Querschnitten sind die Zellkerne mit DAPI angefärbt, der Größenbalken entspricht 50 µm.

Es ist deutlich zu erkennen, dass auf L-MMN-Medium das Myzel von *T. vaccinum* besser gewachsen ist als auf MMNa, wo aufgrund des Kohlehydratmangels lediglich auf den Agarblöckchen der Ausgangskultur sowie im Bereich der Kurzwurzeln wenig Myzel vorhanden ist. Das Myzel um die Kurzwurzeln umschließt diese bei der Inkubation auf MMNa-Platten locker und luftig, jedoch sind auch noch nicht mykorrhizirte Kurzwurzeln mit Wurzelhaaren vorhanden. Auf L-MMN-Platten hingegen ist ein fester Mantel zu sehen, teilweise kann aber auch lockeres Myzel um die Kurzwurzel beobachtet werden. Die Querschnitte belegen zudem einen schmalen, luftigen Mantel bei Kulturen auf MMNa und einen dichten, festen Mantel bei L-MMN. Die Bildung eines Hartig'schen Netzes ist aufgrund der kurzen Syntheszeit bei keiner der Kulturen festzustellen. Für alle weiteren Mykorrhizierungsversuche wurde L-MMN verwendet, weil ein positiver Effekt auf das Myzelwachstum und die Mykorrhizierung festgestellt werden konnte. Der Glucosegehalt wurde auf 1 g/l reduziert, um ausschließlich saprophytisches Wachstum zu verhindern.

Die Transformanten T1, T2 und T3 wurden auf ihr Mykorrhizierungsverhalten mit ihrem kompatiblen Interaktionspartner Fichte untersucht. Eine Auswertung erfolgte nach 7 Monaten Co-Kultur (Abb 4.38). Es ist zu erkennen, dass in den Co-Kulturen mit *Picea abies* sowohl beim *T. vaccinum*-Wildtyp als auch bei den drei Transformanten die Fichtenkeimlinge grüne Blätter haben und vital sind, was als ein Hinweis auf eine ausgebildete Mykorrhiza verstanden werden kann. Bei der genaueren Betrachtung im Stereomikroskop sind zudem mykorrhizierte Kurzwurzeln erkennbar, die keine Wurzelhaare mehr besitzen und um die sich der Mantel ausgebildet hat. Dabei sind keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Transformanten feststellbar. Auch in Wurzelquerschnitten, die von mykorrhizierten Kurzwurzeln angefertigt wurden, ist kein Unterschied zu erkennen. Alle Interaktionen sind sich durch die Anwesenheit eines Mantels gekennzeichnet. Ebenso ist in allen Wurzeln die Ausbildung eines Hartig'schen Netzes, was durch die Anwesenheit von Nuklei pilzlichen Ursprungs erfassbar ist, sichtbar. Es sind individuelle Unterschiede hinsichtlich der Mantelstärke bzw. der Anzahl der pilzlichen Kerne im Interzellularraum der Pflanzenwurzel zu erkennen. Diese Abweichungen sind jedoch selbst innerhalb von Schnitten einer Kurzwurzel oder bei verschiedenen Kurzwurzeln einer Pflanze möglich und können nicht als Unterscheidungsmerkmal für die Ausprägung der Mykorrhiza dienen.

**Abb. 4.38 Mykorrhizierung der Transformanten**

Der *T. vaccinum*-Wildtyp und die Transformanten wurden 7 Monate unter sterilen Bedingungen in Co-Kultur mit Fichtekeimlingen inkubiert. Dargestellt sind die Plattenkulturen vom Wildtyp (A), der Transformante T1 (B), T2 (C) und T3 (D), sowie eine charakteristische Kurzwurzel und ein, mit DAPI gefärbter Wurzelquerschnitt vom Wildtyp (E, I), T1 (F, J), T2 (G, K) und T3 (H, L), der Größenbalken entspricht 50 μm .

5. Diskussion

5.1 Charakterisierung von MATE-Transporterproteinen aus Pilzen

Die Untersuchungen an ABC- und MFS-Transportern verschiedener Pilze spiegeln die Bedeutung von „Multi-Drug“-Transportern wieder und zeigen deren Rolle in der Detoxifikation endogener und exogener Substanzen auf (Del Sorbo *et al.*, 2000; de Waard *et al.*, 2006). Wenig bekannt und untersucht bei Pilzen sind hingegen Gene der MATE-Familie, deren Bedeutung bei der Entgiftung in den letzten Jahren durch die Erforschung bakterieller, pflanzlicher und menschlicher Vertreter erkannt wurde (Moriyama *et al.*, 2008; Magalhaes 2010). Um die Rolle der Transporter bei Pilzen aufzudecken, wurde ein MATE-Gen von *T. vaccinum* näher charakterisiert. Ergänzende Analysen erfolgten durch die Untersuchung der MATE-Gene von *S. commune* und durch einen phylogenetischen Vergleich.

5.1.1 Das Gen *mte1* aus *Tricholoma vaccinum*

Ausgehend von der Isolierung der gesamten Sequenz des MATE-Gens von *T. vaccinum* konnten weitere Untersuchungen erfolgen. Das Gen *mte1*, welches insgesamt ca. 2,6 kb groß ist, wird von 15 Introns unterbrochen, die in ihrer Größe zwischen 47 bp bis 60 bp variieren. Das daraus resultierende Transkript hat eine Größe von ca. 1,8 kb und codiert für ein Protein mit 590 aa. Ein Promotor von *mte1* konnte leider nicht amplifiziert werden, wodurch die Charakterisierung möglicher Transkriptionsfaktorbindestellen oder verschiedener „Response Elements“ nicht möglich war.

Durch die Identifikation des Transkriptionsstartpunkts mit Hilfe der RLM-RACE-PCR konnten zwei alternative Genanfänge ermittelt werden. Die daraus resultierenden Proteine unterscheiden sich in ihrer Größe um 23 AS ausgehend vom Methionin, wobei beide Transkripte im ersten Exon beginnen und der N-Terminus des Proteins im cytoplasmatischen Bereich liegt. Inwiefern sich dadurch Unterschiede in der Substratbindung ergeben oder ob es sich bei dem kürzeren Fragment um ein Artefakt handelt, kann nur durch eine nähere Untersuchung des verkürzten Proteins geklärt werden. Durch eine Wiederholung der RLM-RACE-PCR mit genspezifischen Primern, die weiter entfernt vom ermittelten Startpunkt liegen, könnten möglicherweise weitere alternative Genanfänge identifiziert werden.

Das Protein zeigt in Hydrophobizitätsanalysen 12 Transmembrandomänen, wobei der N- und C-Terminus im cytoplasmatischen Bereich liegen. Die Anzahl der Transmembrandomänen, die zwischen 9 bis 12 variieren kann, meist jedoch 12 beträgt, und deren Verteilung ist ein typisches Merkmal der MATE-Proteine (Hvorup *et al.*, 2003; Yazaki *et al.*, 2007). Im Protein

Mte1 konnten zudem einige Domänen identifiziert werden, darunter die MatE superfamily-Domänen und die NorM-, matE-, PRK1766 und PRK00187-Domänen. Alle weisen auf eine Zugehörigkeit zu MATE-Transportern hin. Weiterhin können RfbX- und MviN-Domänen mit geringer Sequenzähnlichkeit in Mte1 gefunden werden, wobei für Proteine mit RfbX-Domäne die Funktion nicht näher untersucht ist. Gene der MviN-Familie sind bisher nur bei Bakterien beschrieben und sind Virulenzfaktoren von Pathogenen wie *Francisella tularensis* und *Burkholderia pseudomallei* (Ling *et al.*, 2006; Ulland *et al.*, 2010). Bei dem stickstofffixierenden Bodenbakterium *Rhizobium tropici* bewirkte eine Mutation von *mviN* eine Verringerung der Beweglichkeit, hatte aber keinen Einfluss auf die Ausbildung von Chlorosen bei Kontakt mit den Samen von Wirtspflanzen und Nicht-Wirtspflanzen (O'Connell *et al.*, 1998). In der Proteinfamilien(pfam)-Datenbank wird MviN der MATE-ähnlichen Superfamilie zugeschrieben (CL0222). Weitere Analysen zur Verwandtschaft beider Genfamilien wurden bisher nicht durchgeführt.

Die Untersuchung des Substratspektrums, welches bei „Multi-Drug“-Transportern sehr vielschichtig sein kann, erfolgte durch die heterologe Expression in zwei verschiedenen Organismen. Zum einen wurde ein Stamm von *Escherichia coli* verwendet, der bereits bei Untersuchungen zur Transporteraktivität von MATE-Proteinen verschiedener Organismen eingesetzt wurde, und andererseits *Saccharomyces cerevisiae*, welche sich ebenfalls bereits als Organismus zur Überexpression heterologer Proteine bewährt hat.

Die Anforderungen an den verwendeten Organismus sind dabei hoch angelegt. Zum einen soll das Protein erfolgreich und in ausreichendem Maße exprimiert werden, andererseits muss es voll funktionsfähig sein. Dafür ist es in Eukaryoten notwendig, dass das kodierende Gen korrekt abgelesen und im Anschluss die Topologie des resultierenden Proteins am Translokon des Endoplasmatischen Retikulums (ER) bestimmt wird. In der Membran des ER wird das Protein anschließend gefaltet und, bei korrekter Faltung, in den Golgi Apparat entlassen (Grisshammer, 2006). Falsch gefaltete Proteine werden degradiert.

Bakterielle Expressionssysteme sind besonders günstig und einfach in der Kultivierung. Die Expression von eukaryotischen Membranproteinen kann hierbei jedoch Schwierigkeiten bereiten, weil zum Teil die Biogenese nicht cytoplasmatischer Proteine abweichend verläuft, darunter die Transkriptions- und Translationsmaschinerie, die Faltung der Proteine, posttranslationale Modifikationen und die Zusammensetzung der Membran (Kunji *et al.*, 2005).

Es wurde versucht, *mte1* in dem gegenüber verschiedenen Chemikalien sensitiven *E. coli*-Stamm KAM3 zu exprimieren. Zudem wurde der *E. coli*-Laborstamm DH5 α transformiert. Das Expressionsplasmid pTrc99A wurde gewählt, weil bereits das MATE-Gen *AtDtx1* aus *Arabidopsis thaliana* in das Plasmid kloniert und erfolgreich in *E. coli* KAM3 zur Untersuchung des Substratspektrums exprimiert wurde (Li *et al.*, 2002). Durch die IPTG-

gesteuerte Induktion des *trc*-Promotors, unter dessen Kontrolle das MATE-Gen in pTc99A steht, kann die Transkriptmenge gesteuert werden und so eine für die funktionelle Charakterisierung ausreichende, jedoch für die Zelle nicht toxische Proteinkonzentration erhalten werden. In den Experimenten wurden verschiedene Konzentrationen des Induktors verwendet, jedoch konnte keine optimale Konzentration ermittelt werden. Lediglich ein einziges Mal zeigte eine Transformante ein besseres Wachstum in Gegenwart von Ethidiumbromid, alle anderen Transformanten wuchsen gleich gut oder schlechter als der Vergleichsstamm, der nur das Plasmid enthielt. Im Drop Test konnte keine der *mte1*-Transformanten besser wachsen als der Kontrollstamm. Auch verschiedenen Modifikationen in den Testbedingungen, wie die Kulturdauer und die IPTG-Konzentration, konnten keine Reproduzierbarkeit erzielen, weswegen die Versuche mit *E. coli* nicht fortgesetzt werden konnten. Die Verschiedenartigkeit der Organismen, *E. coli* als Wirt des pilzlichen Membrantransporters, könnte zum Misserfolg beigetragen haben.

Aus diesem Grund wurden weitere Versuche mit dem Ascomycet *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, der als eukaryotischer Organismus größere Ähnlichkeiten mit *T. vaccinum* in der Membranprotein-Biogenese hat, zudem aber schnell und einfach kultiviert werden kann. Außerdem stehen sehr viele Stämme sowie Deleionsmutanten zur Verfügung, die bei der Expression Verwendung finden können.

S. cerevisiae selbst hat zwei MATE-Paraloge im Genom, YDR338c und ERC1, beide Proteine zeigen nur eine geringe Ähnlichkeit zu MTE1. Das Transmembrandomänen-Profil von ERC1 weicht mit 11 Domänen von der üblichen Struktur ab. Bisher wurde ERC1 nur funktionell in einer Überexpression eines längeren genomischen Bereichs untersucht, so dass keine endgültigen Aussagen über die Lage und vollständige Sequenz des C-Terminus vorliegen (Shiomi *et al.*, 1991). Da die Überexpression zu einer Resistenz gegenüber Ethionin führte, wurde untersucht, ob eine Deletion in einem der beiden MATE-Gene zu einer höheren Sensitivität gegenüber dem Methionin-Analogon führt. Im Gegensatz zur Überexpression zeigt die Deletionsmutante von ERC1 ebenso wie YDR338c keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp und somit keine höhere Sensitivität. Möglicherweise können auch andere Transporter zum erfolgreichen Efflux von Ethionin beitragen, so dass keine Unterschiede zwischen den Stämmen messbar sind.

Zur Untersuchung von *mte1* aus *T. vaccinum* konnte auf verschiedene *S. cerevisiae*-Stämme zurückgegriffen werden, in die sowohl das Plasmid pYES260 als auch *mte1* in pYES260 zur Überexpression transformiert wurden. Zum einen wurde der Wildtyp-Stamm BY4741 verwendet und dessen MATE-„knock-out“-Mutanten sowie drei ABC-Transporter-Deletionsstämme. Zum Nachweis der erfolgreichen Transkription und Translation wurde das Protein Mte1 mit Hilfe von Antikörper-Färbungen nachgewiesen. Genutzt wurde hierbei die Kopplung des His-Tags an das MATE-Protein, welches als Antigen fungierte. In den *mte1*

exprimierenden Zellen konnte das Transporterprotein in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz zeigte sich jedoch nicht nur in der Membran, sondern es sind ebenfalls endosomale Strukturen zu erkennen. Aufgrund der hohen Expression des MATE-Gens ist es möglich, dass ein Teil der gebildeten Proteine zum Schutz der Zelle degradiert wird. Trotzdem konnte aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass das Protein von der Hefezelle als membranständig erkannt und korrekt gefaltet und eingebaut wurde.

Anschließend erfolgten die Untersuchungen zum Substratspektrum von Mte1 mit den transformierten Zellen. Ausgehend von den natürlichen Umweltbedingungen, mit denen *T. vaccinum* im Ökosystem konfrontiert ist, wurden chemische Substanzen ausgewählt, die unterschiedliche Charakteristika aufweisen und die mögliche Substrate des MATE-Transporters darstellen können. Dabei spielen Metalle und Schwermetalle eine bedeutende Rolle, weil zum einen Pilze einen hohen Schwermetallgehalt im Boden tolerieren und speziell Ektomykorrhiza-Pilze zu einer erhöhten Schwermetalltoleranz beim Symbiosepartner beitragen (Schützendübel & Polle, 2002). Zudem konnten Studien an pflanzlichen MATE-Transportern aufzeigen, dass diese in der Lage sind, zur Resistenz gegenüber einigen Metallen beizutragen (Yazaki *et al.*, 2007).

Untersucht wurde die Resistenz des *S. cerevisiae*-Wildtyps, der verschiedenen Transformanten und der MATE-Deletionsstämme gegenüber einer Vielzahl von Metallen und Schwermetallen. Dabei konnte festgestellt werden, dass Mte1 eine Resistenz gegenüber Kupfersulfat und Lithiumchlorid vermittelt, die über die des Wildtyps hinausgeht. Ebenso können *mte1* exprimierende *S. cerevisiae*-Stämme besser auf Medium mit Aluminiumchlorid und Nickelchlorid wachsen, jedoch nur im Vergleich zum Kontrollstamm mit dem Plasmid pYES260.

Kupfer, als ein essentielles Spurenelement für die Zelle, stellt die prosthetische Gruppe einiger wichtiger Enzyme dar und ist dadurch in Hauptstoffwechselwegen wie der Atmungskette involviert (De Freitas *et al.*, 2003). Zudem hat Kupfer als Co-Faktor der Cu/Zn-Superoxiddismutase eine wichtige Bedeutung bei der Entgiftung zellschädigender Sauerstoffradikale. Seine Eigenschaft, Elektronen abgeben bzw. akzeptieren zu können, führt jedoch auch zum toxischen Potential (Jo *et al.*, 2008; Leitch *et al.*, 2009). Durch diese Ambivalenz als essentielles Metall und zugleich toxisches Element ist eine sehr genaue Regulation der intrazellulären Konzentration notwendig. Einige spezialisierte Transporter regulieren dabei die Aufnahme als auch die intrazelluläre Verteilung der Ionen und den Efflux aus der Zelle, ebenso sind Metallothioneine und andere Proteine an der Kupfer-Homöostase beteiligt (Jo *et al.*, 2008; Macreadie, 2008). Auch „Multi-Drug“-Transporter können eine Rolle bei der Kupfer-Detoxifikation spielen, wie bspw. der ABC-Transporter GintABC1 des

arbuskulären Mykorrhiza-Pilzes *Glomus intraradices*, dessen Expression in der Gegenwart von Kupfersulfat und Cadmiumsulfat erhöht ist (González-Guerrero *et al.*, 2010).

Kupferionen und andere Schwermetalle, die nicht gebunden in der Zelle vorliegen, können bspw. redoxaktive Metalle aus den Bindungsstellen von Molekülen verdrängen bzw. durch Reaktion mit anderen Molekülen zur Ausbildung von reaktiven Sauerstoffspezies führen. Freie Eisen- oder Kupferionen können bspw. durch das Mitwirken in der Fenton-Reaktion die Bildung von Hydroxylradikalen begünstigen, die Nukleinsäuren, Proteine und Fette schädigen (Gaetke & Chow 2003). Deshalb stehen der Zelle verschiedene Entgiftungsmechanismen zur Inaktivierung freier Metallionen zur Verfügung, darunter die Bindung an Glutathion, die spontan erfolgen kann oder über die Glutathion-S-Transferase, und der anschließende Transport des Konjugats in die pilzliche Vakuole oder aus der Zelle heraus (Pocsi *et al.*, 2004). Glutathion liegt intrazellulär in der oxidierten (GSSG) oder reduzierten (GSH) Form vor und kann bei *S. cerevisiae* bis zu 1% der Trockenmasse betragen. Es ist zudem das am häufigsten vorkommende nicht proteinogene Thiol in der Hefezelle, weswegen es einen hohen Stellenwert in der zellulären Detoxifikation einnimmt (Penninckx, 2000). Kupferionen werden als Cu(I) über geeignete Transporter in die Zelle aufgenommen und an GSH gebunden, erst anschließend erfolgte die Bindung der Kupferionen an andere Moleküle wie Thioneine oder Superoxiddismutasen (Miras *et al.*, 2008). Für eine erfolgreiche Detoxifikation bei erhöhten Kupfergehalten ist Glutathion jedoch nicht zwingend erforderlich, die Hefezellen können bei einem Fehlen von GSH auch auf andere Resistenzmechanismen zurückgreifen (Bi *et al.*, 2007).

Glutathionkonjugate können auch über „Multi-Drug“-Transporter transportiert werden, wobei nicht ausschließlich Schwermetalle als Konjugate dienen, auch andere Xenobiotika werden hierdurch entgiftet. Bei *S. cerevisiae* sind Transporter der ABC-Familie bekannt, über die der Efflux verschiedener, an GSH gebundener, cytotoxischer Substanzen in die Vakuole stattfindet (Paumi *et al.*, 2009).

Der MATE-Transporter von *T. vaccinum* ist in der Lage, Glutathionkonjugate unter Kupferstress zu transportieren. Bei einer niedrigen Kupferkonzentration steigt der Anteil von Gesamtglutathion im Medium an, jedoch sind keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *mte1*-exprimierenden Zellen messbar. Denkbar wäre der Transport von Kupferverbindungen in die Vakuole über spezifische Kupfertransporter bzw. über ABC-Proteine und die Exkretion über eigene, an der Plasmamembran befindliche Transporter von *S. cerevisiae*. Die leicht erhöhten Glutathionwerte im Kulturüberstand des Stammes mit pYES260 könnten durch einen höheren Stress in Gegenwart der Kupferionen bedingt sein, da bereits in den Drop-Test-Experimenten festgestellt werden konnte, dass der Plasmid-enthaltende Stamm in Gegenwart der Metalle immer schlechter wuchs als der Wildtyp-Stamm. Bei der Exposition mit einer höheren Kupferkonzentration steigt der Anteil an Glutathion im Medium bei allen

Stämmen an, am deutlichsten jedoch bei der *mte1*-Überexpressionsmutante. Somit werden die Kupferionen selbst oder Metabolite, die bei Schwermetallstress durch Kupferionen entstehen, an Glutathion gebunden und über Mte1 transportiert. Mte1 von *T. vaccinum* ist somit in die Detoxifikation von Kupferionen involviert und schützt die Zelle vor Schäden bei einer Exposition mit dem Metall.

Zugleich ist Mte1 an der Entgiftung des Alkalimetalls Lithium beteiligt. Lithium ist ein sehr reaktives Leichtmetall und kann bei *S. cerevisiae* in höheren Konzentrationen die RNA- und Proteinsynthese hemmen, ebenso ist die Sporulation beeinträchtigt (Asensio *et al.*, 1976). Die Intoxikation erfolgt u.a. durch die Hemmung von Inositol-Monophosphatasen, was zu einer Reduktion des zellulären Myo-Inositols führt, zudem werden Enzyme des RNA-Prozessing inhibiert (Dichtl *et al.*, 1997). Bisher konnten zwei MATE-Transporter identifiziert werden, NIC1 und NIC2 von *A. thaliana*, die an der Detoxifikation von Lithium-Ionen beteiligt sind. Das Wachstum von *S. cerevisiae*-Kulturen, die jeweils eines der beiden Gene in hohem Maße exprimierten, war in Anwesenheit von Lithiumchlorid besser im Vergleich zum Kontrollstamm, der nur das Plasmid trug (Pellengahr, 2004; Dolniak, 2005). Weitere MATE-Proteine wurden nicht auf die Transportfähigkeit von Lithium hin untersucht bzw. sind keine Ergebnisse darüber bekannt.

Untersuchungen zur MATE-vermittelten Toleranz gegenüber Nickelverbindungen liegen ebenfalls noch nicht vor, jedoch konnte bei einem Screening von *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten bei der Abwesenheit des YDR338c-Gens eine höhere Sensitivität gegenüber Nickelsulfat beobachtet werden (Arita *et al.*, 2009). *Mte1* exprimierende *S. cerevisiae*-Zellen waren in der Lage, besser auf nickelhaltigem Medium zu wachsen. Wichtig ist bei dieser Untersuchung der Vergleich zum Kontrollstamm mit dem Plasmid pYES260, weil dieser ein 6xHIS-Tag enthält, dessen Histidine eine hohe Affinität zu Nickel-Ionen aufweisen und diese daran binden können. Da beide *S. cerevisiae*-Stämme die sechs, direkt hinter dem Promotor liegenden, Histidine exprimieren, kann davon ausgegangen werden, dass theoretisch die gleiche Menge an Nickel-Ionen in der Zelle gebunden wird und Mte1 die Nickeltoleranz bewirkt.

Die Hefezellen mit Mte1 konnten außerdem besser auf aluminiumhaltigem Medium wachsen. Die Toxizität von Aluminium wird durch seinen chemischen Zustand bestimmt. In der Umwelt kommt das Leichtmetall aufgrund seiner hohen Reaktivität meist gebunden und in unlöslicher Form vor. Durch die Senkung des pH-Wertes kann es jedoch mobilisiert werden und wirkt toxisch, v.a. auf Pflanzen und Bodenmikroorganismen. Dabei reagiert es mit verschiedenen organischen Molekülen, darunter einige Proteine, Polynukleotide, Lipide und Glycoside und kann durch eine Interaktion mit Membranproteinen Läsionen in der Zellmembran verursachen (MacDiarmid & Cardner, 1996; Ritchie & Raghupathi, 2008). Die Vermittlung einer Aluminiumtoleranz durch MATE-Proteine konnte bisher bei Pflanzen nachgewiesen

werden, wobei die Transporter Citrat aus der Zelle transportieren, welches als Chelator fungiert und die Aluminiumionen bindet (Magalhaes, 2010). Der Mechanismus der Aluminiumtoleranz durch Mte1 aus *T. vaccinum* ist bisher noch nicht bekannt. Inwiefern Mte1 Citrat oder andere organische Säuren transportieren kann und dadurch zur Aluminiumtoleranz führt, wurde nicht untersucht.

Weitere, ebenfalls toxische Metalle wurden in verschiedenen Konzentrationen getestet. Dabei konnten jedoch keine Unterschiede im Wachstumsverhalten, sowohl zum Wildtyp als auch zum Kontrollstamm, festgestellt werden. Auch bei der Exposition mit Cadmiumnitrat wuchsen die Kolonien gleich stark, obwohl vermutet wurde, dass eine Cadmium-Toleranz durch Mte1 aufgrund der Untersuchungen von AtDTX1 aus *A. thaliana* möglich sein könnte. Dieser MATE-Transporter wurde in *E. coli*-Stamm KAM3 überexprimiert und vermittelte ein besseres Wachstum auf cadmiumhaltigen, jedoch nicht auf aluminium-, cobalt-, mangan-, kupfer- und zinkhaltigem Medium (Li *et al.*, 2002). Die Metall- und Schwermetalltoleranz, die von MATE-Transportern vermittelt wird, scheint somit sehr selektiv vorhanden zu sein. Welche Bedingungen gegeben und welche Strukturen vorhanden sein müssen, um bestimmte Schwermetalle zu transportieren, ist bisher ungeklärt. Die Aufklärung solcher Zusammenhänge würde jedoch entscheidend zum Verständnis der MATE-Transporteraktivität beitragen.

Gleichzeitig zu den Untersuchungen des Substratspektrums von *mte1* wurden auch die MATE-Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen Metallen und Schwermetallen getestet. Es konnte unter einer Zink- bzw. Lithiumchlorid-Exposition ein leicht verringertes Wachstum bei dem Stamm YDR338c festgestellt werden, bei den anderen getesteten Metallen zeigte sich kein Unterschied. Die ERC1-Mutante zeigte keine Veränderung im Wachstum auf allen metallhaltigen Medien. Die Lithiumchlorid-Sensitivität von YDR338c zeigt, ebenso wie die von Mte1 aus *T. vaccinum* und NIC1 und NIC2 aus *A. thaliana* vermittelte Toleranz gegenüber diesem Metall, dass Lithium-Ionen bei MATE-Transportern aus verschiedenen Organismen ein Substrat darstellen.

Bisher sind keine MATE-Proteine bekannt, die Zink transportieren können. Auch Mte1 ist nicht in der Lage, eine Toleranz gegenüber Zink-Ionen aufzubauen, ebenso AtDtx1 aus *A. thaliana* (Li *et al.*, 2002). Zink ist in hohen Konzentrationen toxisch für die Zelle, wird aber als essentielles Element als katalytischer oder struktureller Co-Faktor in vielen verschiedenen Proteinen benötigt. Zur Regulation der Zink-Homöostase stehen der Hefezelle eine Vielzahl von speziellen Transportern zur Verfügung, die den Influx und Efflux regulieren und eine toxische Akkumulation verhindern (Eide, 2006). Der MATE-Transporter YDR338c scheint ebenfalls einen Beitrag zur Regulation der intrazellulären Zink-Konzentration zu leisten.

Das Wachstum der Hefe-Deletionsmutanten auf nickelchloridhaltigem Medium unterschied sich nicht zu dem des Wildtyps. Das steht im Widerspruch zu den Ergebnissen einer

anderen veröffentlichten Analyse, bei denen dem Stamm YDR338c eine Nickelsensitivität zugesprochen wurde (Arita *et al.*, 2009). Die Versuchsbedingungen unterscheiden sich jedoch voneinander. Es wurde bei dem Screening der Deletionsmutanten Vollmedium verwendet und Nickelsulfat, im Vergleich dazu wurde in den hier vorliegenden Untersuchungen mit Minimalmedium und Nickelchlorid gearbeitet. Bei den Untersuchungen zur Schwermetalltoleranz von Mte1 hat sich gezeigt, dass die detektierten Ergebnisse stark von den verwendeten Konzentrationen und vom Zeitpunkt der Dokumentation abhängen. Eine Wiederholung der Experimente unter den in der Publikation von Arita *et al.* (2009) beschriebenen Versuchsbedingungen, auch mit anderen Schwermetallen, könnte weitere Aufschlüsse über die Schwermetalltoleranz der MATE-Deletionsstämme geben. Insgesamt scheint jedoch ein metallsensitiver Phänotyp bei dem Stamm YDR338c ausgeprägt zu sein, wohingegen Δ ERC1 keine Reaktion auf die Metalle zeigt.

Als weitere mögliche Substrate für Mte1 kommen verschiedene Xenobiotika in Frage, deren Transportfähigkeit schon bei anderen MATE-Proteinen untersucht wurde. Dazu zählen neben Umweltgiften, die von Menschen in das natürliche Ökosystem von *T. vaccinum* eingebracht werden können, wie bspw. Pestizide, auch Substanzen, die zwar MATE-Transportern als Substrat dienen, deren Auftreten im Boden jedoch als unwahrscheinlich angesehen werden kann, z.B. nukleinsäure-interkalierende Farbstoffe. Die Untersuchungen erfolgten mit verschiedenen *S. cerevisiae* ABC-Transporter-Mutantenstämmen. Ausgewählt wurden Δ PDR5, Δ SNQ2 und Δ YOR1, weil sie sensitiv gegenüber verschiedenen Substanzen sind und damit ein großes Spektrum an möglichen Transportersubstraten abgedeckt werden kann (Rogers *et al.*, 2001). Das Transporterprotein Mte1 aus *T. vaccinum* führte in den Agardiffusionstests zum Wachstum der Hefestämme auf höheren Konzentrationen von Ethidiumbromid, DAPI, Opus, Hygromycin, Cycloheximid und SDS. Sowohl Ethidiumbromid als auch DAPI interkalieren in die DNA und fluoreszieren bei Anregung im entsprechenden Wellenlängenbereich. Dabei scheint Ethidiumbromid ein ubiquitäres Substrat zu sein, dessen Efflux über MATE-Proteine in vielen Organismen beobachtet werden konnte, wohingegen die Transportmöglichkeit von DAPI nur bei einigen bakteriellen MATEs untersucht wurde (Huda *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Huda *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Kaatz *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2007; Kuroda & Tsuchiya, 2009).

Der Transport von Fungiziden über „Multi-Drug“-Transporter kann *T. vaccinum* als Bodenorganismus große Vorteile bringen, da die in der Landwirtschaft eingesetzten Mittel auch in die Böden und das Ökosystem Wald gelangen können. In den Versuchen wurde die Resistenz gegenüber dem, zur Bekämpfung einer Vielzahl von Getreide-Pathogenen, eingesetzten Epoxiconazol Opus getestet. Hierbei zeigte sich, dass Mte1 eine Resistenz gegenüber Opus vermitteln kann. Da bisher keine MATE-Transporter von Pilzen untersucht

worden sind, gibt es keine Studien zum Efflux von Fungiziden. Bekannt sind jedoch pilzliche ABC- und MFS-Transporter, die Fungizide mit unterschiedlichem Wirkungscharakter transportieren können (Del Sorbo *et al.*, 2000; de Waard *et al.*, 2006).

Bei bakteriellen Transportern gab es Untersuchungen zur Resistenzvermittlung gegenüber verschiedenen Antibiotika, bei denen gezeigt werden konnte, dass die Organismen Resistenzen gegenüber einer Vielzahl an antibiotischen Substanzen durch MATEs erhielten (Kurode & Tsuchiya, 2009). Als mögliche Substrate für Mte1 wurden auch die antibiotischen Wirkstoffe Cycloheximid und Hygromycin B identifiziert. Beide Substanzen stammen aus *Streptomyces*-Arten, die natürlicherweise im Boden vorkommen und für die Produktion antibiotischer Wirkstoffe bekannt sind. Dabei wird der Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid von *Streptomyces griseus* gebildet, wohingegen das Aminoglycosid Hygromycin B aus *Streptomyces hygroscopicus* stammt (Whiffen, 1948; Pardo *et al.*, 1985). Die Überwindung der Abwehrstrategien konkurrierender Bodenbewohner ist lebensnotwendig für alle Organismen, um im Habitat Boden zu bestehen. Inwiefern *T. vaccinum* durch den Efflux über Mte1 Standortvorteile gegenüber möglichen Konkurrenten gewinnen kann, ist nicht bekannt und könnte durch Wachstumstests und Hemmtests überprüft werden.

SDS kann als anionisches Detergenz Proteine denaturieren und dadurch toxisch wirken. In den ersten Jahren der Analyse von MATE-Proteinen wurden hauptsächlich kationische Substanzen als Transportersubstrate beschrieben und deshalb MATE-Transporter als Kationen-spezifisch dargestellt (Omote *et al.*, 2006). Mit der Erforschung weiterer MATE-Transporter, v.a. aus verschiedenen Pflanzen, wurde das Wissen über das Substratspektrum erweitert und deutlich, dass auch Anionen wie Citrat transportiert werden können (Durett *et al.*, 2007; Furukawa *et al.*, 2007; Magalhaes *et al.*, 2007). Ebenso konnte bei dem Erreger des Feuerbrands, *Erwinia amylovora*, nachgewiesen werden, dass das MATE-Paralog NorM zum Efflux von SDS beiträgt (Burse, 2003). Der Transport anionischer Substanzen durch MATEs ist demzufolge nicht auf einzelne Organismen beschränkt und die Definition von MATE-Proteinen als Transporter von Kationen kann, wie noch 2006 von Omote und Kollegen postuliert, nicht mehr als gerechtfertigt angesehen werden.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Xenobiotika ist Mte1 nicht in der Lage, den Hefezellen ein Wachstum auf höheren Konzentrationen von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), Benomyl und Propanil zu vermitteln. Ebenso zeigte sich keine Änderung des Wachstums durch DMSO, welches als Lösungsmittel für viele untersuchte Substanzen diente. Andere Substanzen konnten aufgrund ungenügender antibiotischer Wirkung nicht untersucht werden, darunter die Herbizide Monuron und Chlorbromuron, das Strobilurin-Fungizid Amistar, Erythromycin und Tetramethylammoniumchlorid. Insofern können sie nicht als Substrat ausgeschlossen werden und weitere Tests mit anderen Konzentrationen oder einem homologen Testsystem sollten folgen.

Neben der Exposition mit umweltrelevanten Giften sind Ektomykorrhiza-Pilze wie *T. vaccinum* auch mit den Abwehrstrategien des Wirtes konfrontiert, gegen welche sie geeignete Resistenzmechanismen besitzen müssen. Bei dem Kontakt mit Wurzelpathogenen setzt die Pflanze verschiedene Abwehrmechanismen ein, um den Schädling ein Eindringen zu verwehren. Einerseits werden PR (pathogenesis-related)-Proteine sekretiert, darunter zellwandlytische Enzyme wie Glucanasen und Chitinasen, aber auch biochemische Veränderungen des Harzes führen zur Abwehr (Schuck, 1982; Van Loon & Van Strien, 1999). Vor allem die fungitoxische Wirkung der Monoterpen-Kohlenwasserstoffe spielt dabei eine Rolle. In Studien konnte gezeigt werden, dass der Kontakt des Erregers der Kernfäule, *Heterobasidion annosum*, bei Fichtenwurzeln eine Veränderung des Monoterpenspektrums bewirkt. Die Hauptterpene im Harz der Fichtenwurzel sind α - und β -Pinen, deren Anteile sich bei einer Infektion verschieben; ebenso kann in geringen Mengen auch Limonen nachgewiesen werden (Rieger, 1995). Durch den Transport von α - und β -Pinen mittels Mte1 kann *T. vaccinum* sich vor einem Teil der pflanzlichen Abwehr schützen. Ebenso können sich auch chemische Komponenten aus den Nadeln im Boden anreichern, wenn diese abfallen. So konnten die wässrigen Extrakte von Rotkiefernadeln das Wachstum von *Suillus intermedius* fördern und das von *Amanita rubescens* hemmen, das Wachstum von *Pisolithus tinctorius* und *Tylopilus felleus* wurde durch die Exposition mit α - und β -Pinen verbessert (Koide *et al.*, 1998). Die Agardiffusionstests mit Fichtennadelöl ergaben jedoch keinen Hinweis auf einen Transport durch Mte1, wobei möglicherweise aber auch der ölige Charakter einen Transport hemmen könnte. Inwieweit die Resistenz gegenüber spezifischen Terpenen die Wirtsspezifität beeinflusst müsste durch weitere Untersuchungen mit einem breiten Substanzspektrum erfolgen, darunter auch spezifische Terpene anderer Bäume wie Kiefer und Lärche, mit denen *T. vaccinum* im natürlichen Habitat keine Symbiose ausbildet. Bei ersten Untersuchungen mit Kiefernadelöl konnten keine Ergebnisse erzielt werden, weil das Öl keine hemmende Wirkung auf die Kulturen von *S. cerevisiae* zeigte.

Die Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass *mte1* in der Ektomykorrhiza erhöht exprimiert ist (Krause & Kothe, 2006). Es ist denkbar, dass durch den vermehrten Einbau des „Multi-Drug“-Transporters in die Pilzmembran die Monoterpen-Kohlenwasserstoffe des Harzes entgiftet werden und dadurch ihre antibiotische Wirkung nicht entfalten können. Der Pilz kann somit in die Interzellularräume seines Symbiosepartners wachsen und der Stoffaustausch stattfinden. Ergänzend dazu konnte in einer EST-Datenbank-Analyse ein Fragment eines MATE-Transporter-Gens aus *Amanita muscaria* (AJ407361) aus der Ektomykorrhiza mit *Populus tremula* x *P. tremuloides* gefunden werden. Somit scheinen MATE-Transporter von Ektomykorrhiza-Pilzen eine Bedeutung für die Symbiose zu haben.

Für Limonen, welches zu einem geringen Teil in Fichtenwurzeln gefunden werden kann, konnte kein Efflux durch Mte1 festgestellt werden. Bei der Pflanzenabwehr verändert sich zwar die Konzentration von Limonen im Harz geringfügig, bleibt im Vergleich zu α - und β -Pinen aber sehr gering, weswegen das Terpen möglicherweise bei der Abwehr eine untergeordnete Rolle spielt.

Der Transport des Alkaloides Berberin ist wiederum von vielen bakteriellen MATE-Transportern bekannt, darunter NorM von *E. amylovora*, NorMI von *Brucella melitensis* und DinF von *Ralstonia solanacearum* (Braiband *et al.*, 2002; Burse *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007). Der Efflux von Berberin scheint charakteristisch für eine Vielzahl von MATE-Transportern und könnte mit einer generellen Abwehr gegen verschiedene Pflanzenstoffe einhergehen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Transport von Berberin kein spezifisches Charakteristikum für Mte1 als Transporter in der Ektomykorrhiza ist, sondern zur allgemeinen zellulären Detoxifikation beiträgt.

Mit den Versuchen konnte gezeigt werden, dass Mte1 auch in der Natur vorkommende sekundäre Pflanzenstoffe transportieren kann. Zudem zeigte der Efflux von Cycloheximid und Hygromycin B, dass durch Mte1 ebenso ein Transport von Sekundärmetaboliten anderer Bodenorganismen stattfindet. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch andere, durch Mikroorganismen sekretierte Naturstoffe als Substrat dienen. Die dabei verwendeten Substanzen wurden alle aus den entsprechenden Mikroorganismen isoliert, auf ihre antifungale Wirkung hin untersucht und bei -80°C aufbewahrt (Michael Ramm, persönliche Mitteilung). Möglicherweise wurde durch die Lagerung die Wirksamkeit beeinflusst, weil lediglich das aus *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* var. *nova* stammende Geldanamycin und das aus *Streptomyces lysosuperificus* nov. sp. stammende Tunicamycin noch ihre toxische Wirkung gegenüber *S. cerevisiae* entfalten konnten (DeBoer *et al.*, 1970; Takatsuki *et al.*, 1971). Unter der Verwendung beider Antibiotika konnte jedoch kein besseres Wachstum durch Mte1 erreicht werden. Die beiden Antibiotika Pamamycin aus *Streptomyces alboniger* und Helioferin B aus *Mycogone rosea* zeigten lediglich eine schwache Wirkung auf die Hefezellen, weswegen kein klarer Hemmhof gebildet wurde (McCann & Pogell, 1979; Gräfe *et al.*, 1995). Die Zone des verringerten Wachstums wurde ausgemessen und zeigte, dass Zellen mit Mte1 möglicherweise besser in Gegenwart der beiden Substanzen wachsen können. Auf die statistische Auswertung wurde jedoch verzichtet, weil Ungenauigkeiten beim Messen nicht auszuschließen sind. Die Wiederholung der Agardiffusionstest mit einer höheren Konzentration von Pamamycin und Helioferin B ist notwendig, um einen Effekt von Mte1 zu zeigen und statistisch zu fundieren. Besonders interessant ist dabei Helioferin B, weil es von einem Mycoparasiten gebildet wird, welcher u.a. *Agaricus* sp. befällt und in die Hyphen seines Wirtes eindringen kann (Rudakov, 1978; Gray & Morgan-Jones, 1981). Inwiefern jedoch Helioferin B eine Rolle bei dieser Interaktion

spielt und ob ein erhöhter Efflux zur Abwehr des Pathogens beitragen kann, ist bisher nicht bekannt. Zudem produziert *M. rosea* noch weitere antifungale Substanzen, die ebenfalls am Parasitismus beteiligt sein können und deren Rolle in der Pathogenese noch nicht genau untersucht ist (Degenkolb *et al.*, 2000).

Die Antibiotika β -Rubromycin aus *Streptomyces collinus*, Herbimycin A aus *Streptomyces hygroscopicus*, Fungichromin, welches von verschiedenen *Streptomyces* gebildet werden kann, Enniatin D aus *Fusarium* sp. und Nodakenin, ein Coumarin aus *Angelica gigas* wurden direkt nach ihrer Isolation als antifungale Substanzen identifiziert, zeigten aber nach der Lagerung keine Wirkung gegen *S. cerevisiae* mehr (Brockmann & Renneberg, 1952; Robison *et al.*, 1971; Omura *et al.*, 1978; Tomoda *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2003).

Viele dieser, durch Streptomyces gebildete Sekundärmetabolite dienen der Abwehr potentieller Konkurrenten, darunter andere Bakterien, Pilze oder Nematoden (Davelos *et al.*, 2004). Einige Substanzen können aber auch einen positiven Effekt auf andere Bodenorganismen oder Pflanzen ausüben und spielen bei der Ausbildung der Ektomykorrhiza als sogenannte Mykorrhiza-Helferbakterien eine große Rolle (Schrey & Tarkka, 2008). So konnte beispielsweise Auxofuran, ein Metabolit des *Streptomyces*-Stammes AcH 505 das Wachstum von *Amanita muscaria* fördern, wodurch positive Effekte auf die Bildung der Symbiose möglich sind (Riedlinger *et al.*, 2006). Inwiefern Transporter durch einen spezifischen Efflux eine Rolle bei der Selektion zwischen antibiotischen und fördernden Substanzen spielen, ist bisher nicht bekannt, wäre aber als ein potentieller Mechanismus denkbar.

Da „Multi-Drug“-Transporter eine Vielzahl von Substanzen mit unterschiedlichem chemischem Charakter transportieren können, ist es nicht möglich, alle Substrate zu identifizieren. Für Mte1 wurde versucht, ein breites Substratspektrum zu untersuchen, um einen Überblick über die Funktion des MATE-Transporters in der Ektomykorrhiza und im Bodenmyzel zu erhalten. Dabei hat sich gezeigt, dass Mte1 im Bodenmyzel von *T. vaccinum* zur allgemeinen zellulären Entgiftung beitragen kann, indem es im Boden vorkommende Metalle, Xenobiotika und auch sekundäre Pflanzenstoffe transportiert (Abb. 5.1). In der Ektomykorrhiza ist ein spezifischer Transport der Abwehrstoffe des Wirtes zu deren Detoxifikation denkbar. Ebenfalls ist anzunehmen, dass Mte1 zur vermehrten Toleranz mykorrhizierter Bäumen gegenüber Schwermetallen beitragen kann. In diesem Zusammenhang sind Überexpressionstudien in *T. vaccinum* notwendig, um die Transportmöglichkeit im Myzel selbst zu überprüfen, weil die Ergebnisse aus der heterologen Untersuchung nicht zwangsläufig auf einen filamentösen Pilz übertragen werden können. Zudem können nur Mykorrhizierungsversuche mit *T. vaccinum* und verschiedenen Interaktionspartnern Anhaltspunkte zu einer möglicherweise veränderten Wirtsspezifität aufzeigen.

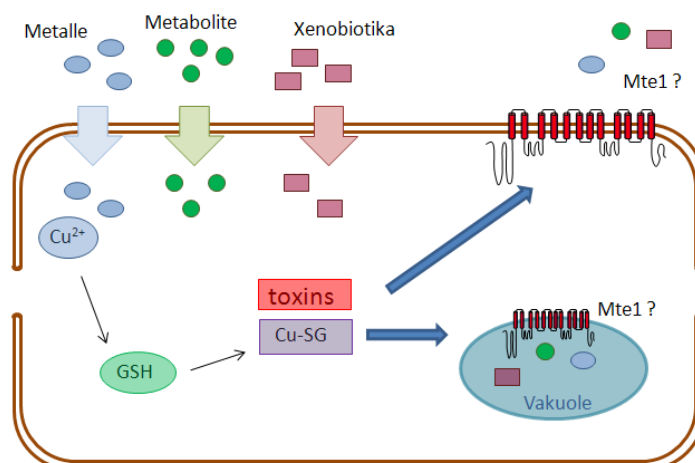


Abb. 5.1 Modell der Transporteraktivität und mögliche Lokalisierung von Mte1 in *T. vaccinum*
 Metalle, Metabolite und Xenobiotika können in die Zelle gelangen und müssen zum Schutz entgiftet werden. Dabei können freie Metallionen wie Kupfer an Glutathion gebunden werden. Die Exkretion über Mte1 erfolgt dabei vermutlich aus der Zelle heraus, möglich wäre aber auch die Lokalisierung von Mte1 an der pilzlichen Vakuole.

5.1.2 Phylogenetische Analyse der pilzlichen MATE-Transporter

Aus dem Stammbaum wird ersichtlich, dass pilzliche MATE-Gene verwandt sind und sich, bis auf wenige Ausnahmen bei Zygo- und Chytridiomyceten, von anderen untersuchten bakteriellen, pflanzlichen und menschlichen MATE-Transportern abgrenzen. Dieses Erkenntnis stimmt mit der phylogenetischen Analyse von Omote *et al.* (2006) überein, bei der zwar wenige pilzliche Gene mit einbezogen wurden, diese jedoch in der Gruppe 2A zusammengefasst sind. In vielen der untersuchten Pilze konnten zwei Paraloge identifiziert werden, die in verschiedenen Ästen des Stammbaums clustern.

Es ergeben sich verschiedene Unterfamilien pilzlicher MATE-Proteine, darunter eine, in der MATE-Gene verschiedener Pilzphyla gehören und ein zweiter Ast, der sich nochmals spezifisch in einen Basidio- und Ascomyceten-Ast aufgliedert. Dabei entsprechen die in einem Cluster befindlichen Pilze den einzelnen Unterabteilungen. Bei den Basidiomyceten zeigen die MATE-Proteine von *Ustilago maydis* und *Malassezia globosa* als Ustilagomycotina und *Melampsore laricis-populina* und *Sporobolomyces roseau* als Pucciniomycotina größere Ähnlichkeiten untereinander als zu den übrigen Basidiomyceten. Ähnliches trifft auch bei den Agaricomycotina zu.

Einige Pilze besitzen nur ein MATE-Gen im Genom, darunter u.a. *Serpula lacrymans*, *U. maydis*, *Coprinopsis cinereus* und *Cryptococcus neoformans*. Dieses gehört jeweils der Basidiomyceten-spezifischen Unterfamilie an, weswegen vermutet werden könnte, dass das zweite Paralog im Zuge der Evolution von den Pilzen nicht mehr benötigt und aus dem Genom entfernt wurde. Interessant wäre hierbei, inwiefern das der allgemeinen pilzlichen MATE-Gruppe angehörende Gen eine Funktion bei der Detoxifizierung spielt. Die

Auswertung der Chip-Daten von *S. commune*, die als einzige Funktionsanalyse aufgrund fehlender Untersuchungen anderer Proteine dienen können, ergab für *mte2*, dem MATE-Gen der allgemein pilzlichen MATE-Unterfamilie, eine geringe Transkriptmenge ohne spezielle Regulation, wodurch ein Funktionsverlust nahezu ausgeschlossen werden kann. Inwiefern sich jedoch eine Deletion des Gens auswirken würde, kann nicht vorhergesagt werden. Häufig weisen Deletionsmutanten von „Multi-Drug“-Transporter keinen oder nur einen gering ausgeprägten Phänotyp auf, erst eine erhöhte Sensitivität gegenüber bestimmten Toxinen zeigt Unterschiede zum Wildtyp auf.

Laccaria bicolor besitzt fünf Paraloge im Genom, wovon vier dem Basidiomyceten-Cluster zugehören und im Genom direkt hintereinander liegen, was durch eine Genduplikation erklärbar wäre. Inwiefern die Transporterproteine spezielle Funktionen ausüben, ist nicht bekannt. Bei allen Genen konnten ein bzw. zwei STREs im Promotorbereich identifiziert werden, was für eine erhöhte Transkription unter Stressbedingungen spricht.

Es gibt kein erkennbares Muster im Stammbaum, nach dem sich vorhersagen ließe, ob ein oder mehrere Paraloge im Genom eines Basidiomyceten vorhanden sind. Das in *T. vaccinum* kein zweites MATE-Paralog aus der allgemein pilzlichen MATE-Unterfamilie gefunden werden konnte, kann auf der Tatsache beruhen, dass möglicherweise nur ein MATE-Gen vorhanden ist, wie es auch bei anderen Basidiomyceten gefunden wurde. Andererseits kann das Vorhandensein eines zweiten Paralogs nicht ausgeschlossen werden und konnte mit den verwendeten Methoden lediglich nicht detektiert werden. Gerade aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit zwischen den Paralogen der Unterfamilien, besonders auf Nukleotidebene, ist die Detektion über einen Southern Blot unter Verwendung von *mte1* als Sonde eher unwahrscheinlich. Die Sequenzheterogenität könnte eine Hybridisierung verhindern. Das gleiche ist auch bei der Verwendung der degenerierten Primer denkbar.

Die Zuordnung möglicher Proteinfunktionen aus dem Stammbaum heraus ist bei MATE-Genen von Pilzen nicht möglich, weil bisher nur ERC1 aus *S. cerevisiae* funktionell charakterisiert wurde. Interessant wären jedoch weiterführende Funktionsanalysen, um das Substratspektrum der Paraloge der verschiedenen Unterfamilien zu ermitteln und Schlüsse zur Bedeutung der einzelnen Transporter ziehen zu können.

Der Vergleich der Proteinsequenz der einzelnen MATEs innerhalb der Unterfamilien zeigte, dass nur wenige Aminosäuren außerhalb der Transmembrandomänen bei allen Vertretern konserviert sind. An vielen Positionen des Proteins findet man jedoch Bereiche, die hoch konserviert sind und nur bei den Proteinen von ein oder zwei Organismen abweichende Aminosäuren auftreten. Teilweise resultieren diese Abweichungen sogar aus der automatischen Annotierung. Es gibt nur wenige Untersuchungen zu konservierten Regionen in den MATE-Transportern. Eine Aminosäure, die bei allen eukaryotischen MATEs gefunden

werden kann, ist die Glutaminsäure an Position 273 in hMATE1 des Menschen (Matsumoto *et al.*, 2008). Bis auf das Protein 432789 von *Serpula lacrymans* und die der Ascomyceten *Magnaporthe grisea* MGG-03123, *Neurospora crassa* NCU00755 und *Candida albicans* CAWG-02321 ist diese Aminosäure auch in Pilzen an der Stelle konserviert. Das Glutamat an Position 278 in hMATE1, welches auch in anderen eukaryotischen Organismen konserviert ist, kann auch bei allen pilzlichen MATEs gefunden werden, wiederum mit der Ausnahme von *S. lacrymans* 432789.

Ebenso ist die Aminosäure an Position 389 als Glutamin- oder Asparaginsäure in den meisten Eukaryoten vorhanden, ausgenommen davon sind pflanzliche MATEs. Bei den untersuchten Pilzen tritt an dieser Position eine Asparaginsäure auf, aber auch hier weicht *S. lacrymans* 432789 wieder von der Konsensussequenz mit einem Histidin ab. Eine Veränderung an diesen Positionen in hMATE1 führte zu einer Einschränkung der Transporteraktivität in unterschiedlicher Ausprägung. Ob die Glutamate sich in der Substratbindungsstelle des Proteins befinden oder ob die *in vitro*-Mutagenese lediglich zu einer Konformationsänderung beigetragen hat, konnte nicht geklärt werden (Matsumoto *et al.*, 2008). Weitere Untersuchungen konservierter Bereiche wären nötig, um mehr über die Struktur und über Substratbindungen zu erfahren.

Mit Hilfe sequenzierter Genome können aber nicht nur Paraloge im Genom gesucht werden, sondern auch Syntenien untersucht werden. So gibt es Transporterproteine in den Biosynthese-Genclustern sekundärer Metabolite, die die Zelle vor der toxischen Wirkung der Substanz schützen können, wobei neben ABC-Transportern besonders häufig MFS-Transporter in diesen Regionen zu finden sind (del Sorbo *et al.*, 2000). Die Deletion eines MFS-Transporters in dem Bikaverin-Gencluster von *Fusarium fujikuroi* führte bspw. zur Reduktion der Bikaverin-Biosynthese (Wiemann *et al.*, 2009). Bei dem Rapspathogen *Leptosphaeria maculans* konnte nachgewiesen werden, dass ein ABC-Transporter im Sirodesmin-Biosynthese-Cluster die Hyphen vor dem Toxin schützt (Gardiner *et al.*, 2005). Andererseits konnte eine Beteiligung am Efflux von Sekundärmetaboliten nicht bei allen Transporterproteinen in Biosynthese-Clustern nachgewiesen werden. So ist bspw. der MFS-Transporter im Aflatoxin-Biosynthese-Cluster von *Aspergillus parasiticus* nicht am Efflux des Aflatoxins beteiligt, wie Deletionsstudien gezeigt haben (Chang *et al.*, 2004).

Bei einigen der MATE-Gene der Basidiomyceten-spezifischen Unterfamilie konnte ein MFS-Transporter in der Nähe des MATE-Transporters identifiziert werden. Hinweise auf Synergie oder Ergänzung im Transport konnten nicht gefunden werden. Bisher sind keine Untersuchungen im Hinblick auf ein mögliches Transporter-Cluster bekannt. Bei allen Transportergenen von Basidiomyceten der allgemein pilzlichen MATEs, außer bei *M. laricis-poplina* 73831, konnte ein Gen, welches für eine Arginase/Agmatinase kodiert, identifiziert werden. Diese Enzyme gehören zur Ureohydrolase-Superfamilie (IPR006035) und spielen

eine bedeutende Rolle im Arginin/Agmatin-Stoffwechsel und im Harnstoffzyklus. So ist die Agmatinase an der Umwandlung von Agmatin zu Putrescin und Harnstoff beteiligt, die Arginase katalysiert die Umwandlung von Arginin in Ornithin und Harnstoff. Die Rolle des MATE-Transporters beim Transport eines möglichen Produkts dieser enzymatischen Reaktionen ist überaus spekulativ, sollte jedoch in den Fokus weiterer Untersuchungen rücken.

5.1.3 *In vitro* Adaption an Fungizide

S. cerevisiae-Zellen, die das MATE-Transportergen *mte1* aus *T. vaccinum* überexprimierten, zeigten eine höhere Toleranz gegenüber dem Epoxyconazol-Fungizid Opus. Durch die Adaption an das Fungizid wurde versucht, „Multi-Drug“-Transporter zu aktivieren und die Effluxkapazität zu steigern. Als Fungizid diente neben Opus auch das Strobilurin Amistar. Beide Fungizide haben unterschiedliche Wirkweisen. Opus als Epoxyconazol hemmt die Sterolbiosynthese, wohingegen Amistar, mit dem Wirkstoff Azoxystrobin in der Atmungskette den Elektronentransfer inhibiert (Oerke & Steiner, 2003). Die Fungizide werden in der Landwirtschaft zum Schutz verschiedener Getreide eingesetzt, Amistar zudem zur Bekämpfung von Krankheitserregern bei Gemüse und Obst- und Zierpflanzen. Bei einer unsachgemäßen Verwendung treten jedoch Resistenzen bei den pathogenen Pilzen auf, die zum Einsatz höherer Fungizidmengen führen oder zu einer vollständigen Resistenz. Einzelne Mutationen in den Zielgenen der Fungizide können in einer Proteinveränderung resultieren, die zur Ausbildung einer qualitativen Resistenz führten (Ishii *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003). Andererseits können durch die Exposition mit geringeren Fungizidkonzentrationen auch quantitative Resistenzen ausgebildet werden, die polygenetischen Ursprungs sind. Es können Strategien entwickelt werden, die zur geringeren Aufnahme des Fungizides führen oder, durch die Aktivierung von Transportern, zu einer vermehrten Effluxkapazität beitragen. Außerdem können Enzyme rekrutiert werden, die die Funktion des eigentlichen Zielenzym des Fungizides ersetzen bzw. das Fungizid entgiften (del Sorbo *et al.*, 2000; Miguez *et al.*, 2004; Ma & Michailidis, 2005).

Myzelien von *T. vaccinum* und *S. commune* W22 wurden schrittweise an höhere Fungizidkonzentrationen adaptiert, wobei *S. commune* W22 an höhere Opus-Konzentrationen adaptiert werden konnte als *T. vaccinum*. Die Adaptationsfähigkeit ist speziesabhängig und könnte eventuell mit der Wachstumsgeschwindigkeit zusammenhängen, weil gegebenenfalls ein schnelleres Wachstum auch eine schnellere Anpassung zur Folge haben könnte. Bei dem Ascomycet *Pyrenophora tritici-repentis* konnte eine Adaption bis 50 mg/l Epoxyconazol bzw. Strobilurin-Fungizid erreicht werden (Reimann & Deising, 2005).

Zudem zeigte sich *S. commune* W22 nicht sensitiv gegenüber dem Strobilurin-Fungizid. Die Resistenz gegenüber Strobilurinen kann durch eine Mutation einiger möglicher Aminosäuren im Cytochrom b oder durch die Anwesenheit eines Introns bedingt sein, wie sie bei einigen Spezies bereits beschrieben wurde (Ma & Michailidis, 2005; Luo *et al.*, 2010).

Bei den Adaptionen handelt es sich um quantitative Resistenzen, da die Anpassungsfähigkeit nur bis zu einer bestimmten Konzentration möglich war. Ebenso konnte durch die Effluxfärbungen gezeigt werden, dass Transporter an der Resistenzvermittlung eine Rolle spielen. Dabei wurde bei allen adaptierten Pilzen eine Fluoreszenz im Bereich der Zellmembran, der Zellwand und zum Teil auch des Cytoplasmas festgestellt, wohingegen die Wildtypyphen lediglich eine Kernfärbung aufwiesen. Diese charakteristische Färbung mit DNA-interkalierenden Farbstoffen konnte ebenfalls bei dem an Strobilurin- und Azolfungizide adaptierten Pflanzenpathogen *Pyrenophora tritici-repentis* gefunden werden (Reimann & Deising, 2005). Das Ionophor CCCP konnte auch bei *T. vaccinum* und *S. commune* die Membranfärbung aufheben, so dass Hyphen, bei denen der Protonengradient entkoppelt wurde, wieder lediglich eine Färbung der Zellkerne und anderer Nukleinsäure-enthaltenden Zellorganellen aufwiesen. Die Mitwirkung von MATE-Transportern bei dem vermehrten Efflux wird vermutet, weil die Vermittlung einer Resistenz gegenüber dem Fungizid Opus durch Mte1 nachgewiesen werden konnte und zudem bei eukaryotischen MATEs ein Protonen-Antiport vorliegt, welcher durch CCCP aufgehoben würde. Allerdings wären auch andere Protonen-abhängige Transporterproteine in der Zellmembran, die auf CCCP ansprechen, mögliche Kandidaten der Resistenzvermittlung. Ebenso konnte bei *S. commune* keine erhöhte Expression der MATE-Gene unter Fungizid-Exposition in den Biochip-Daten festgestellt werden, was eine Beteiligung am Efflux aber nicht ausschließen muss, weil die Färbungen lediglich eine erhöhte Transporteraktivität nachweisen, aber keinen Rückschluss auf die Expression zulassen.

5.1.4 Die MATE-Transporter von *Schizophyllum commune*

Im Genom des Agaricomyceten *S. commune* konnten zwei MATE-Transportergene identifiziert werden, wovon Mte1 aus *S. commune* eine höhere Sequenzähnlichkeit zu Mte1 aus *T. vaccinum* aufweist als das zweite Transporterprotein Mte2. Mte1 aus *S. commune* zeigt die typische 12-Transmembrandomänen-Struktur, Mte2 besitzt hingegen nur 10 transmembrane Bereiche, was jedoch durchaus auch bei anderen MATE-Proteinen beschrieben wurde (Yazaki *et al.*, 2007). Beide Proteine gleichen sich in den konservierten Domänen. Die mögliche Promotorregion wurde untersucht und bei beiden Genen konnten STREs in der Sequenz gefunden werden. STREs sind Pentanukleotide in der Promotorregion, die die Genexpression unter verschiedenen Stressbedingungen regulieren,

darunter Schwermetall-induzierter Stress, Hitze und osmotischer Stress, aber auch Stress durch Nährstoffmangel und einem geringen pH-Wert (Siderius und Mager, 1997; Treger *et al.*, 1998; Zähringer *et al.*, 2000). Unter welchen Bedingungen die Genexpression der beiden MATE-Gene von *S. commune* induziert wird, ist unbekannt und kann durch die fehlende funktionelle Charakterisierung der Transporter nicht belegt werden. Aufgrund der großen Schwankungen der Transkriptmenge in den Wildtyp-Stämmen können keine statistisch signifikanten Änderungen der Expression im Microarray beobachtet werden. Auch unter Stressbedingungen wie der Exposition gegenüber Cadmium und der Adaption an das Fungizid Opus blieb die Expression unverändert. Desweiteren wurde keine erhöhte Transkriptmenge beim Wachstum auf Haldensickerwasser beobachtet. Dieses Wasser entstammt dem ehemaligen Uranbergbauggebiet Wismut in Thüringen und ist mit verschiedenen Schwermetallen belastet, weswegen als Analogie zu *mte1* aus *T. vaccinum*, zu dessen Substrate Schwermetalle gehören, eine erhöhte Expression vermutet wurde. Im Gegenzug dazu zeigte sich in verschiedenen Kreuzungen und bei den in den kreuzungsrelevanten Genen veränderten Mutanten erwartungsgemäß keine veränderte Expression. Die geringe Expression von *mte1* im Δ gap-Stamm steht in keinem Zusammenhang zum deletierten Gen und kann aufgrund der großen Standardabweichung nicht gewertet werden. Beide Gene unterscheiden sich in ihrer Expression nicht wesentlich voneinander, auch wenn *mte2* etwas höher exprimiert ist, lässt dies keine Schlüsse auf eine mögliche Funktion oder eine größere Bedeutung für die Detoxifikation zu. Möglicherweise findet für die Transporter eine Regulation auf Proteinebene statt oder es wird die Aktivität der Transporter erhöht, wodurch ein vermehrter Efflux erfolgen kann.

Die Amplifikation des ca. 1,4 kb großen Fragments des *mte1*-Gens verschiedener *S. commune*-Stämme zeigte Sequenzunterschiede auf. Eine große Ähnlichkeit zum sequenzierten Stamm H4-8 konnte bei den Stämmen E6 und T1 beobachtet werden. Insgesamt ist bekannt, dass Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen Stämmen vorhanden sind, so sind z.B. im *ura1*-Gen 7% der Nukleotide und 3% der Aminosäuresequenz verändert (Lengeler & Kothe, 1994). Der Sequenzunterschied der Stämme H4-8 und 4-40 beträgt im amplifizierten Fragment 12,9% und weicht damit von dem beschriebenen Unterschied beider Stämme von ca. 0,2% ab, welche durch eine partielle Genomsequenzierung ermittelt wurden (Ohm *et al.*, 2010). Dass vor allem die Nukleotide in Intronregionen vom Nukleotidaustausch betroffen sind, geht mit der bestehenden Funktionalität des Proteins einher. Gerade bei Membranproteinen kann durch Änderung einer Aminosäure die Struktur verändert werden und das Protein möglicherweise seine Funktion verlieren. Für den menschlichen MATE-Transporter hMATE1 konnte durch *in vitro* Mutagenese gezeigt werden, dass die Transporteraktivität, je nach mutierter Aminosäure

drastisch reduziert war bzw. auch die Expression unter dem nachweisbaren Niveau lag (Matsumoto *et al.*, 2008).

Besonders auffällig ist jedoch die Aminosäureposition 119, bei der in fünf *S. commune*-Stämmen ein Stoppcodon auftritt. Die Beendigung der Translation am Triplet UGA hätte zur Folge, dass das Protein nur 319 Aminosäuren besitzen würde. Inwiefern sich diese Verkürzung auf die Funktionalität auswirkt, müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. Möglicherweise ist durch diese Mutation das gesamte Transporterprotein funktionslos, weil lediglich die ersten drei Transmembran-Helices ausgebildet werden könnten. Denkbar wäre auch, dass die Transkription an einem Startcodon hinter der mutierten Stelle erst anfängt und dann das verkürzte Protein noch zur Detoxifikation in der Lage wäre. Untersuchungen zum Transport von Substraten bei verkürzten Proteinkonstrukten von *mte1* könnten die Folgen der Mutation erklären.

Andererseits dient das Triplet TGA nicht nur als Stoppcodon, sondern es kann in der Translation überlesen werden und zum Einbau von Selenocystein führen. Bei Pilzen konnten aus Untersuchungen der Genomsequenzen bisher jedoch keine Hinweise auf das Vorhandensein von Selenoproteinen oder Sec-Insertionselementen gefunden werden, wodurch davon ausgegangen wird, dass Selenoproteine während der Evolution im Reich der Pilze gegen Cystein-Homologe ausgetauscht wurden (Donovan & Copeland, 2009; Lubanov *et al.*, 2009). Auch bei *Mte1* ist die Annahme eines Selenocystein-Einbaus eher unwahrscheinlich, weil die Stämme ohne TGA an dieser Position die Aminosäure Tryptophan und nicht Cystein aufweisen. Die Inkubation eines *S. commune*-Stammes, welcher TGA enthält, mit markiertem Selen und die Radiographie nach einer Proteinisolierung könnten Hinweise auf vorhandene Selenoproteine liefern. Sollten diese vorhanden sein, könnte bei *Mte1* die Analyse zur Selenocystein-Inkorporation mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden.

5.2 Genexpression unter Fungizidexposition

Das Myzel des an das Epoxyconazol Opus adaptierten *S. commune*-Stammes W22 wurde auf Fungizid-haltigem Medium kultiviert und die Transkriptmengen mit denen von nicht behandelten Monokaryen von *S. commune* verglichen. Regulierte Gene können somit nicht hauptsächlich auf die Adaption zurückzuführen sein, sondern stehen auch im engen Zusammenhang mit der Fungizidexposition.

Eine Expressionserhöhung verschiedener Transporter, darunter „Multi-Drug“-Transporter konnte meist nicht nachgewiesen werden. Der MFS-Transporter (ID 59779) und ein möglicher K^+/H^+ Antiporter (ID 80181), welche eine vermehrte Transkriptmenge unter der Fungizidbehandlung zeigten, sind auch in anderen Organismen noch nicht näher

charakterisiert, könnten jedoch als Effluxtransporter dienen. Vertreter der ABC-Familie und weitere MFS-Transporter waren nicht hochreguliert. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit einer Expressionsanalyse bei *Fusarium graminearum*, bei der unter ähnlichen Bedingungen keine veränderte Expression von ABC- und MFS-Transportern festgestellt wurde (Liu *et al.*, 2010). Ebenso zeigte sich in Microarray-Analysen bei *Candida albicans* keine Expressionserhöhung von „Multi-Drug“-Transportern unter der Behandlung mit einem Azol-Fungizid, obwohl in anderen Experimenten nachgewiesen werden konnte, dass verschiedene Transporter von *C. albicans*, darunter *cdr1* und *cdr2* am Efflux des Fungizids beteiligt waren (De Backer *et al.*, 2001). Einige Kritikpunkte, die das Fehlen regulierter Transportergene in der Microarray-Studie von *C. albicans* erklären könnten, wären zum einen die Konzentration des Fungizids, die Expositionszeit und zudem Probleme, die die Microarray-Technik im allgemeinen betreffen (Kontoyiannis & May, 2001). Möglicherweise sind diese Kritikpunkte ebenfalls auf die Analyse bei *S. commune* zurückzuführen. In Real Time PCR-Experimenten müssten ergänzend die Regulation der Expression verschiedener „Multi-Drug“-Transporter bei unterschiedlichen Fungizidkonzentrationen und Inkubationszeiten untersucht werden.

Es konnten einige hochregulierte Gene identifiziert werden, die an der zellulären Stressantwort und der Detoxifikation beteiligt sind, darunter Enzyme der Entgiftungsmaschinerie und einige Hitzeschockproteine. Die Hitzeschockproteine spielen eine große Rolle bei der Stressantwort der Zelle. Die Expression dieser Polypeptide wird unter verschiedenen Stressbedingungen, die zur Zerstörung der Tertiärstruktur von Proteinen führen, darunter Hitze, vermehrte Sauerstoffradikale, Schwermetallexposition und unter Ethanolstress, erhöht (De Maio, 1999). Die kleinen Hitzeschockproteine (sHSPs), wovon ebenfalls ein codierendes Gen hochreguliert war, binden *in vitro* an ungefaltete Proteine und schützen diese vor der Aggregation. In *in vivo*-Analysen konnte eine Bindung der sHSPs an nicht native Proteine unter Stressbedingungen nachgewiesen werden (Haslbeck *et al.*, 2004).

Als Target hemmt das Azol-Fungizid Opus die Sterolbiosynthese, indem es die Demethylierung von 24-Methylendihydrolanosterol, eine Vorstufe von Ergosterol, unterbindet (Brent, 1995). Dabei wird das Enzym 14a-Demethylase (CYP51) inaktiviert, welches zur großen Familie der Cytochrome P450 gehört, die an der Oxidation von Sekundärmetaboliten und Xenobiotika beteiligt sind (Akiyama *et al.*, 2002). Unter den hochregulierten Genen im expositionierten Stamm sind Cytochrome der Unterfamilien CYP2 und CYP4/CYP19/CYP26. In anderen Studien konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von Cytochromen unter der Behandlung von Azol-Fungiziden beobachtet werden (Liu *et al.*, 2010). Gene, die direkt an der Ergosterol-Biosynthese beteiligt sind, waren nicht hochreguliert, was im Gegensatz zu

bisher veröffentlichten Studien zur Genexpression unter Azol-Stress steht (Bammert & Fostel, 2000; Kontoyiannis & May, 2001).

Die hochregulierte Glutathion-S-Transferase (GST) und ein „Glutathione-dependent formaldehyde-activating“ GFA-Protein sind an der Detoxifizierung und dem Schutz der Zelle beteiligt. GSTs sind Entgiftungsenzyme, die die Konjugation verschiedenartigster Substanzen an Glutathion katalysieren und somit nachgewiesenermaßen am Metabolismus von bspw. Pestiziden, Peroxiden und Xenobiotika beteiligt sind (Morel *et al.*, 2009).

Andere hochregulierte Gene betreffen vornehmlich den Transport und Metabolismus von Kohlehydraten, die Transkription und Translation, welche zur höheren Expression von Genen benötigt wird und Zytoskelett und Zellstruktur. Die erhöhte Expression von Komponenten der Signaltransduktion ist ebenfalls notwendig, um vermehrt Informationen in der Zelle weiterzuleiten. Dazu kommen zu einem geringen Teil Gene des Metabolismus und Transport von Lipiden, Sekundärmetaboliten, anorganischer Ionen und Aminosäuren. Einen großen Teil, mit fast 50% der höher exprimierten Gene, stellen hypothetische Proteine dar, deren Funktion aufgrund fehlender Untersuchungen noch nicht zugeordnet werden kann. Die Analyse differentiell exprimierter Gene während der Inkubation mit einem Azolfungizid bei *Fusarium graminearum* ergab eine ähnliche Verteilung der regulierten Gene hinsichtlich ihrer Proteinfunktion (Liu *et al.*, 2010).

Die Anzahl reprimierter Gene des adaptierten Stammes unter Fungizidexposition ist mit ca. 1% ähnlich wie bei den hochregulierten Genen. Unterschiede finden sich jedoch bei der Verteilung nach der Funktion. Gene, die den Energiemetabolismus und Funktionen der Zellteilung betreffen, sind reprimiert, können hingegen bei hochregulierten Genen nicht gefunden werden. Denkbar ist, dass die Energie, die die Expression dieser Gene benötigen würde, in die Abwehrstrategie gegen das Fungizid fließt. Ebenso sind vermehrt Gene des Metabolismus reprimiert, vor allem die des Nukleotid-Metabolismus und -Transport. Interessanterweise befindet sich unter den reprimierten Genen auch ein Gen, welches bei der Ergosterol-Biosynthese eine wichtige Rolle spielt: ein Homolog zu ERG2 mit einer C-8-Sterolisomerase-Aktivität. In Studien mit *C. albicans* wurde dieses Gen unter der Azol-Behandlung als geringfügig hochreguliert identifiziert (De Backer *et al.*, 2001). Möglicherweise steht die Repression im Zusammenhang mit der Adaption, wobei diese Tatsache spekulativ ist, weil keine Kontrolle mit einem nicht-adaptierten Stamm auf fungizidhaltigem Medium vorhanden ist. Desweiteren ist ein Pheromonrezeptor der Spezifität B α 1 reprimiert, was auf eine geringere Kreuzungsfähigkeit hinweist. Bestärkt wird die Annahme, weil ebenfalls ein ABC-Transportergen reprimiert ist, welches große Ähnlichkeiten zu dem α -Faktor-Transporter Ste6 aus *S. cerevisiae* aufweist. Der Pilz spezialisiert sich unter dem Fungizid somit auf die Abwehr und den Schutz der Zelle, nicht benötigte Gene, wie bspw. das

Pheromongen oder auch Gene der Stressabwehr, die aber nicht der Detoxifikation des Azols dienen, werden in ihrer Expression gehemmt.

Unter den verschiedenen Stressbedingungen, der Cadmium-, Fungizid- und Haldensickerwasserexposition sind nur wenige gemeinsame Gene reguliert, welchen sehr unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden können. Interessant ist dabei das Gen mit der Protein ID 58836, welches unter allen Stressbedingungen sehr hoch exprimiert ist. Diese hohe Expression lässt auf ein besonders stressrelevantes Gen schließen, unterstützend dazu finden sich zwei STREs in der Promotorregion. In der blastp Analyse wurden nur Homologe mit sehr niedriger Sequenzähnlichkeit gefunden, wodurch keine Funktionszuordnung möglich ist. Ebenso fehlen konservierte Regionen und Domänen. Die Resultate müssen jedoch mit einer Real-Time-PCR verifiziert werden und weitere Untersuchungen zu diesem Gen der Stressantwort folgen, um eine genaue Funktion zuordnen zu können.

5.3 *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation

Weitergehende Untersuchungen des MATE-Transporters aus *T. vaccinum* im homologen System erfordern ein effizientes Transformationssystem, bei dem stabile Transformanten erhalten werden. Das Einbringen genetischer Information in ein Wirtsgenom wurde durch die Etablierung der *A. tumefaciens* vermittelten Transformation für eine Vielzahl von Pilzen möglich, die bis dahin mit den verfügbaren Methoden nicht transformierbar waren. Dabei spielen bei der T-DNA-Übertragung die individuellen Eigenschaften eines Pilzes eine große Rolle, weshalb das Protokoll spezifisch angepasst werden muss (Michielse *et al.*, 2005). Für *Tricholoma vaccinum* wurde zur Transformation Luftmyzel verwendet, welches auf einer auf Agar aufgelegten Nylonmembran inkubiert wurde. Bei anderen Ektomykorrhiza-Pilzen, wie *Suillus bovinus* oder *Paxillus involutus*, wurde die gleichen Kultivierungsmethode angewandt (Hanif *et al.*, 2002; Pardo *et al.*, 2002). Die Verwendung von Myzel ist für solche Pilze geeignet, bei denen keine Sporen in sterilen Laborkulturen gebildet werden. Bei den meisten Ektomykorrhiza-Pilzen können sporentragende Fruchtkörper nur durch die Assoziation mit dem Wirtsbaum gebildet werden. Unter axenischen Bedingungen in Co-Kultur mit dem kompatiblen Interaktionspartner ist es bisher nur bei sehr wenigen Pilzen gelungen, Fruchtkörper zu erhalten (Ohta, 1998; Krause, 2005; Sanmee *et al.*, 2010). Der Vorteil bei der Verwendung von Sporen ist eine bessere Quantifizierung der Effizienz auf zellulärer Ebene, die Transformation von Myzel erlaubt lediglich eine Beschreibung der Effizienz auf Koloniebasis, die jedoch auch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen verwendet werden kann.

Die Effizienz bei der Transformation mit *A. tumefaciens* ist sehr unterschiedlich ausgeprägt, auch bei Ektomykorrhiza-Pilzen zeigten sich große Differenzen bei der Übertragungsrate. Bei *Hebeloma cylindrosporium* und *Tuber borchii* konnten lediglich 6-18% bzw. 20% der Kolonien transformiert werden, bei *S. bovinus* und *P. involutus* hingegen ca. 67% bzw. sogar bis zu 80% (Hanif *et al.*, 2002; Pardo *et al.*, 2002; Grimaldi *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2006). Für *T. vaccinum* und *T. terreum* konnten Bedingungen ermittelt werden, bei denen 30% der Kolonien transformiert werden konnten. Möglicherweise können die Transformationsbedingungen für *Tricholoma* sp. noch verbessert werden. Die Co-Kultur erfolgte bei Raumtemperatur, die tageszeitabhängig und jahreszeitlich stark variieren kann. Eine gleichbleibende, für das Wachstum von *T. vaccinum* optimale Temperatur müsste ermittelt und bei der Transformation erprobt werden. Andere Faktoren wie die Zelldichte von *A. tumefaciens* und die Zeit der Co-Kultivierung wurden in Transformationsexperimenten mehrfach variiert und optimiert.

Durch die ektopische Integration der T-DNA können stoffwechsel- oder wachstumsrelevante Gene zerstört werden, die zu auffälligen Phänotypen führen würden. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass lebenswichtige Proteine durch den Einbau der Fremd-DNA funktionsunfähig werden. Solche letalen Integrationen sind hier jedoch nicht zu erwarten, da *T. vaccinum* nur als Dikaryon dauerhaft kultiviert werden kann. Die Analyse der zehn Transformanten zeigte, dass das Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gen (*hph*) und das Grün Fluoreszierendem Protein (*egfp*) keinen Einfluss auf das normale Hyphenwachstum ausüben. Somit eignet sich die *A. tumefaciens* vermittelte Transformation bei *T. vaccinum* zur funktionellen Charakterisierung von Genen.

Viele der bisher mit *A. tumefaciens* transformierten Pilze wurden auf die mitotische Stabilität der eingebrachten Gene untersucht, wobei jeweils verschiedene Zeiträume gewählt wurden. Bei *Saccharomyces cerevisiae* wurden transformierte Zellen über Nacht ohne Selektionsdruck inkubiert und zeigten eine stabile Integration (Bundock *et al.*, 1995). Pilze, die ein langsames Wachstum aufweisen, wurden über einen längeren Zeitraum getestet. Transformierte Hyphen von *Pisolithus tinctorius* wurden bis zu zehn Monate ohne das Antibiotikum Hygromycin B inkubiert, wobei die mitotische Stabilität ca. 90% betrug (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2005). Bei *S. bovinus* zeigten alle getesteten Transformanten nach zwei Monaten noch eine stabile Integration (Hanif *et al.*, 2002). Die *T. vaccinum*-Transformanten wurde in einem ersten Versuch, welcher sich zeitnah an die Transformation anschloss, auf Medium ohne Hygromycin B für drei Monate inkubiert und anschließend wieder auf Selektivmedium überführt. Bei den Transformanten wurde keine Veränderung hinsichtlich ihres Wachstums festgestellt. Zudem zeigte eine langjährige Kultivierung unter kontinuierlichen Selektionsdruck, dass bei allen Transformanten *hph* nach 5 Jahren noch im Genom nachweisbar war. Nach drei Jahren konnte bei drei der zehn Transformanten jedoch

keine Kopie von *egfp* mehr amplifiziert werden. Nach weiteren zwei Jahren konnte kein weiterer vollständiger Verlust von *egfp* bei den anderen Transformanten nachgewiesen werden. Somit zeigten sieben Transformanten nach fünf Jahren noch eine mitotische Stabilität von *egfp*. Die Untersuchungen belegen, dass die Gene stabil integriert sind und auch Gene ohne Selektionsdruck über einen längeren Zeitraum im Genom verbleiben. Bei Langzeituntersuchungen funktioneller Gene muss jedoch die Anwesenheit im Genom überprüft werden, weil vereinzelt instabile Transformanten auftreten können. Zudem erfolgten die Untersuchungen fast ausschließlich über die Amplifikation der betreffenden Gene mit Hilfe der PCR, weswegen sich keine Aussage über die Kopienzahl im Genom direkt nach der Transformation treffen lässt und ein Verlust von Genen bei Mehrfachintegrationen unbemerkt auftreten kann.

Bei einigen *T. vaccinum*-Transformanten wurden Southern-Blot-Analysen zur Ermittlung der Kopienzahl im Genom im Anschluss an die Transformation und nach fünfjähriger Inkubationszeit vorgenommen. Direkt nach der DNA-Übertragung wurde die Integration von *hph* bei fünf Transformanten untersucht. Dabei konnte bei vier von fünf Transformanten eine Einfachintegration festgestellt werden. Diese Resultate stimmen mit anderen Untersuchungen überein, in denen auch vornehmlich eine Kopie im Genom detektiert werden konnte (Hanif *et al.*, 2002; Degefu & Hanif, 2003; Kemppainen *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2006). Nach der fünfjährigen Kultivierung der Transformanten wurde die Kopienzahl beider Gene überprüft, dabei konnten alle Transformanten untersucht werden. Es zeigte sich, dass vier Transformanten, T1 und T8 mit einer, T2 mit zwei und T10 mit vier Kopien, die gleiche Anzahl von *egfp* und *hph* im Genom besitzen. Die anderen Transformanten weisen unterschiedliche Kopienzahlen auf, dabei immer mehr Kopien von *egfp* als von *hph*. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bereits bei der Transformation eine unterschiedlich hohe Anzahl an *egfp* bzw. *hph* übertragen wurde. Da die Integration der Gene über eine Rekombination erfolgt, ist es möglich, dass die Hygromycin-B-Phosphotransferase und *egfp* unabhängig voneinander in das Genom integriert wurden, so dass mehrere Kopien eines Gens im Vergleich zum anderen aufgenommen wurden. Ebenso besteht die Möglichkeit, Dimere und Haarnadelstrukturen aufgrund komplementärer Sequenzen im T-DNA-Abschnitt, im Promotor und Terminator zu bilden, so dass nur ein Gen übertragen werden kann.

Zudem kann *T. vaccinum* nur als Dikaryon stabil kultiviert und auch nur im zweikernigen Stadium transformiert werden. Dadurch können, wenn die Gene unabhängig voneinander im Rekombinationsprozess übertragen werden, auch verschiedene Kerne als Integrationsort dienen. Auch Kopien von *hph* können im Zuge der Kultivierung verloren gehen. Jedoch können durch die Anzucht auf Hygromycin B-haltigem Medium nur Hyphen wachsen, die mindestens eine Kopie des Gens besitzen, weshalb bei der Hybridisierung immer

mindestens ein Signal für *hph* erhalten werden konnte. Es gibt nur wenige Untersuchungen zur Kopienzahl von zwei Genen im Genom nach einer Transformation. Häufig wurde nur eine Sonde zur Überprüfung der erfolgreichen T-DNA-Übertragung verwendet, wodurch eine Schlussfolgerung über die gemeinsame Übertragung beider Gene nicht möglich ist. In *S. bovinus* konnte bei allen untersuchten Transformanten die gleiche Anzahl von *egfp* wie von *hph* nachgewiesen werden, bei *Hypholoma sublateritium* konnte bei drei von vier Transformanten die gleiche Kopienzahl beider Gene ermittelt werden, lediglich eine Probe wies eine abweichende Zahl auf (Hanif *et al.*, 2002; Godio *et al.*, 2004). Es wurde als Erklärungsmöglichkeit aufgeführt, dass durch die Restriktion der genomischen DNA von *H. sublateritium* Fragmente gleicher Länge entstanden sind, auf denen zwei Kopien des Gens liegen, die bei der Hybridisierung aber als ein Signal erscheinen. Andererseits ist auch hier eine unterschiedliche Integrationshäufigkeit aus den genannten Gründen möglich. Trotz der unterschiedlichen Häufigkeit der Kopien im Genom ist aber davon auszugehen, dass alle auf der T-DNA-Region befindlichen Gene in den Wirtsorganismus übertragen werden können.

Die Analyse der Integrationsorte beider Gene erfolgte mit Hilfe der Southern-Blot-Analysen, bei der die genomische DNA mit *EcoRV* geschnitten wurde. Die Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *EcoRV* liegt dabei zwischen den Genen in der T-DNA-Region. Somit ist ein Signal der Gene auf unterschiedlich großen DNA-Fragmenten anzunehmen. Interessanterweise zeigen 50% der Transformanten das Signal für *hph* bei einer Größe von ca. 1,9 kb und damit einhergehend *egfp* bei ca. 5 kb. Die anderen Signale sind im gesamten Größenspektrum der in der Elektrophorese aufgetrennten DNA verteilt und zeigen keine auffälligen Gemeinsamkeiten. Inwiefern es sich bei den fünf Transformanten um bevorzugte Integrationsorte im Genom von *T. vaccinum* handelt, kann aufgrund der Analysen nicht eindeutig gefolgert werden. Generell gibt es wenige Untersuchungen zur T-DNA-Integrationsstellen bei Pilzen. Bei *S. cerevisiae* wurden Sequenzen analysiert, in die die T-DNA eingebaut wurde. Es konnten keine Homologien zwischen den untersuchten Integrationsorten festgestellt werden, was auf illegitime, ektopische Rekombination schließen lässt. Teilweise konnte eine geringe Homologie der genomischen DNA zu einer oder beiden T-DNA-Grenzen gefunden werden, wobei die T-DNA auch verkürzt eingebaut wurde oder sogenannte Füll-DNA hinzugefügt wurde (Bundock & Hooykaas, 1996). Die Analyse der Integrationsstellen wurde v.a. bei *Arabidopsis thaliana* durchgeführt und ergab, dass sowohl kodierende als auch nicht-kodierende Regionen als Zielorte dienen. Besonders häufig sind hierbei heterochromatische Regionen betroffen, einschließlich Regionen der Centromere, Telomere und rDNA-Wiederholungen (Kim *et al.*, 2007).

Weiterführende Untersuchungen zur Integration können zur Aufklärung der Übertragungsweise und zu Integrationsorten beitragen. Es könnte mittels PCR untersucht werden, ob beide Gene zusammen oder getrennt voneinander übertragen werden. Dazu

sollten neue Transformanten generiert und Primer, die in den Genen *hph* und *egfp* liegen und ein gemeinsames Amplifikat ergeben, gewählt werden. Die Untersuchung der Integrationsorte könnte über eine TAIL-PCR erfolgen, bei der die genomische Region um *hph* oder *egfp* amplifiziert und sequenziert werden kann. Jedoch ist zu bedenken, dass eine Aussage über bevorzugte Integrationssequenzen nur durch die Untersuchung einer Vielzahl von Transformanten erfolgen kann.

Das auf dem Plasmid pBGgHg befindliche Fluoreszenzprotein *egfp* steht, wie *hph*, unter der Kontrolle des *gpd*-Promotors von *Agaricus bisporus*, zur Termination dient der 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus. Der *gpd*-Promotor reguliert die Expression des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-Gens, welches ein Schlüsselenzym in der Glykolyse darstellt und in hohem Maße konstitutiv exprimiert wird (Holland & Holland, 1978). Die Promotoren von *gpd*-Genen verschiedener Organismen konnten bereits isoliert und erfolgreich in der Überexpression und funktionellen Charakterisierung von Genen eingesetzt werden, u.a. bei den Basidiomyceten *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium*, *A. bisporus*, *Lentinus edodes* und *Tremella fuciformis* (Harmsen *et al.*, 1992; Hirano *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2009). Dabei hat sich gezeigt, dass homologe Promotoren heterologen Systemen vorzuziehen sind, weil die Expression häufig mit einer geringeren Effizienz als im eigenen Organismus stattfindet (van de Rhee *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2008). Andererseits ist nicht jeder homologe Promotor für die Expression geeignet, wie bspw. der *lcc1*-Promotor von *A. bisporus*, der die Expression eines Laccase-Gens steuert, nach der T-DNA-Übertragung jedoch keine Expression von *hph* ermöglichte und dadurch keine Transformanten auf Hygromycin B-haltigem Medium selektiert werden konnten (Burns *et al.*, 2006). Unter der Kontrolle des *gpd*-Promotors von *A. bisporus* konnten bereits in verschiedenen Basidio- und Ascomyceten Gene erfolgreich exprimiert werden (Hanif *et al.*, 2002; Campoy *et al.*, 2003; Kempainen *et al.*, 2004; Grimaldi *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2006). Bei *T. vaccinum* konnte ebenfalls für beide Gene eine Expression gezeigt werden.

Die mikroskopischen Analysen erlaubten keine klare Trennung zwischen Autofluoreszenz und der Emission ausgehend vom *egfp*. Als mögliche Ursache kommen eine zu niedrige Expression aufgrund des heterologen Promotors oder aber das Fehlen eines Introns im *egfp* in Frage, welches bei einigen Basidiomyceten zur mikroskopischen Detektion zwingend notwendig war. Bei z.B. *A. bisporus*, *S. commune* und *P. chrysosporium* konnte nach dem Hinzufügen einer nicht-kodierenden Region auch mikroskopisch GFP nachgewiesen werden (Lugones *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001; Burns *et al.*, 2005). Obwohl nur wenige Gene von *T. vaccinum* bisher vollständig sequenziert wurden, zeigte sich, dass in der Regel eine große Anzahl von Introns vorhanden war (Katrin Krause, persönliche Mitteilung). Ob die Fluoreszenz durch den Einbau eines oder mehrerer Introns verstärkt wird, oder ob ein

homologer Promotor zu einer erhöhten Fluoreszenz führt, müsste weitergehend untersucht werden.

Mit dem Ziel, in Zukunft mykorrhiza-spezifisch exprimierte Gene von *T. vaccinum* unmittelbar in der Symbiose zu untersuchen, wurde das auf *A. tumefaciens* basierende Transformationssystem entwickelt. Es wurden drei Transformanten auf die Ausbildung einer vollständigen Mykorrhiza überprüft. Nach sieben Monaten in Co-Kultur mit dem kompatiblen Wirt Fichte (*Picea abies*) konnte bei allen getesteten Pilzen die Ausbildung des Hyphenmantels und in Ansätzen die Ausprägung des Hartig'schen Netzes beobachtet werden. Das Einbringen von Fremdgenen hat somit keinen Einfluss auf die Ausbildung der Ektomykorrhiza. Die Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen an anderen transformierten Ektomykorrhiza-Pilzen überein. So konnte auch für *S. bovinus*, dessen Symbiosefähigkeit nach der Transformation mit Kiefer (*Pinus sylvestris*) getestet wurde, die Ausbildung einer Ektomykorrhiza gezeigt werden (Pardo *et al.*, 2002; Hanif *et al.*, 2002). Auch bei *Pisolithus tinctorius* zeigten die Transformanten keine signifikante Veränderung bei der Interaktion mit dem Wirt *Pinus greggii* (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2005). Andererseits kann das Einbringen von Fremd-DNA gezielt zur Erzeugung von Transformanten, die die Fähigkeit zur Mykorrhizierung verloren haben, genutzt werden, um so Gene, die an der Ausbildung der Symbiose beteiligt sind, zu untersuchen (Combiar *et al.*, 2004). Für *T. vaccinum* könnte nach einer erneuten Transformation ebenfalls nach Mutanten gesucht werden, die keine Interaktion mehr eingehen können. Jedoch ist die Ausbildung einer vollständigen Mykorrhiza erst nach einer langen Co-Kultivierung möglich, wodurch die Experimente diesbezüglich erschwert sind und solche Untersuchungen vorrangig an schneller mykorrhizierenden Pilzen stattfinden sollten.

5.4 Ausblick

Durch die Untersuchungen von *mte1* aus *T. vaccinum* konnte ein breites Substratspektrum ermittelt werden. Jedoch gibt es noch eine Vielzahl an Substanzen, wie bspw. Sekundärmetabolite weiterer Streptomyceten und anderer bodenbewohnenden Mikroorganismen sowie Abwehrsubstanzen verschiedener Pflanzen, die im heterologen System *S. cerevisiae* getestet werden könnten. Nichtsdestotrotz ist es von großer Bedeutung, *mte1* auch direkt in *T. vaccinum* zu untersuchen. Das Substratspektrum kann im filamentösen Pilz abweichen, zudem besteht nur in *in vitro*-Mykorrhizierungen die Möglichkeit die Rolle von *mte1* in der Symbiose zu untersuchen. Real-Time-PCR-Untersuchungen zur Expression von *mte1* unter dem Einfluss verschiedener Substanzen sollten unterstützend durchgeführt werden, um zu untersuchen, inwiefern eine Regulation auf Transkriptionsebene stattfindet oder ob der Transporterefflux durch eine erhöhte Aktivität bzw. auf Proteinebene

reguliert wird. Durch ein RNAi könnte festgestellt werden, ob das Wachstum des Myzels auf unterschiedlichen Substraten verändert ist. Informationen zur Struktur und Funktion konservierter Aminosäuren könnte durch *in vitro*-Mutagenese und dem Vergleich der Substratspektren untersucht werden.

Die Suche eines zweiten MATEs in *T. vaccinum* sollte fortgesetzt werden. Durch die Veröffentlichung weiterer Genome von Basidiomyceten können hochkonservierte Regionen in vielen Sequenzen identifiziert werden, von denen degenerierte Primer abzuleiten sind. Ein Vergleich der Funktion beider MATEs hinsichtlich ihrer Substrate und der Funktion in der Ausbildung der Ektomykorrhiza wäre hierbei von großem Interesse. Ebenso ist die Untersuchung der MATEs von *S. commune* interessant. Hierbei wären andere Entgiftungsstrategien möglich, da der Weißfäuleerreger Kontakt zu Totholz aufweist und somit andere Substrate zur Entgiftung in Frage kommen.

Interessante, differentiell exprimierte Gene im adaptierten Stamm unter Fungizidexposition müssten nochmals in der Real-Time-PCR untersucht werden, um die Ergebnisse zu verifizieren. Besonders das Protein 58836, welches in den Stressreaktionen sehr hoch exprimiert war, sollte mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden zur Analyse der Funktion untersucht werden, bspw. durch die Herstellung einer Deletionsmutante oder Überexpressionstransformanten, deren Wachstum unter Stress untersucht werden könnte.

Diese Arbeit lieferte Anhaltspunkte zur Funktion von pilzlichen MATE-Proteinen, von denen bisher kein einziges unter dem Aspekt eines „Multi-Drug“-Transporters untersucht wurde. In Zukunft ist der Einsatz von MATE-Genen aus Pilzen als Biomarker in Microarray-Analysen denkbar, um Schwermetallbelastungen in Böden zu identifizieren. Zudem könnten Pilze mit einer besonders hohen Transporteraktivität ausgewählt werden, um bei einer Wiederaufforstung kontaminierter Böden die Bäume effektiv zu schützen.

In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass *T. vaccinum* und *T. terreum* mit Hilfe von *A. tumefaciens* transformiert werden können. Aufgrund der sehr guten Effizienz des Systems, der mitotischen Stabilität der Transformanten, auch in der Langzeitkultivierung und der bestehenden Fähigkeit, eine Ektomykorrhiza ausbilden zu können, kann dieses System zur Untersuchung von in der Symbiose differentiell exprimierten Genen genutzt werden. Für Lokalisierungsstudien und Expressionsanalysen ist *egfp* jedoch ungeeignet, möglicherweise könnte das Fluoreszenzsignal durch das Einfügen eines Introns verstärkt und damit ein geeignetes Reportersystem etabliert werden. Es ist notwendig, starke konstitutive wie auch induzierbare homologe Promotoren aus *T. vaccinum* zu isolieren und für die Transformation zugänglich zu machen. Da aufgrund des dikaryotischen Charakters des Myzels Deletionsmutanten nicht effizient herzustellen sind, sollten zudem Untersuchungen zum RNAi bei *Tricholoma sp.* erfolgen, so dass die Funktion von Genen nicht allein aus Überexpressionsstudien ermittelt werden kann.

6. Literatur

- Agerer R.**, ed (1987-2002) Colour Atlas of Ectomycorrhizae, 1st-12th del., Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.
- Akiyama R.**, Sato Y., Kajiwarra S. und Shishido K. (2002). Cloning and expression of cytochrome P450 genes, belonging to a new P450 family, of the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66 (10): 2183-2188.
- Amann E.**, Ochs B. und Abel K.J. (1988) Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69 (2): 301-315.
- Arita A.**, Zhou X., Ellen T.P., Liu X., Bai J., Rooney J.P., Kurtz A., Klein C.B., Dai W., Begley T.J. und Costa M. (2009). A genome-wide deletion mutant screen identifies pathways affected by nickel sulfate in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics.* 10: 524.
- Asensio J.**, Ruiz-Argüeso T. und Rodríguez-Navarro A. (1976). Sensitivity of yeasts to lithium. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 42 (1-2): 1-8.
- Ausubel F.M.**, Brent R., Kingston E.R., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. und Struhl K. (1999). Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Bammert G.F.** und Fostel J.M. (2000). Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrob Agents Chemother.* 44 (5): 1255-1265.
- Barrett V.**, Lemke P.A. und Dixon R.K. (1989). Protoplast formation from selected species of ectomycorrhizal fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 381-387.
- Barrett V.**, Dixon R.K. und Lemke P.A. (1990). Genetic transformation of a mycorrhizal fungus. *Appl Microbiol Biotechnol* 33: 313-316.
- Barker S.J.**, Tagu D. und Delp G. (1998). Regulation of Root and Fungal Morphogenesis in Mycorrhizal Symbioses. *Plant Physiol* 116: 1201-1207.
- Bellion M.**, Courbot M., Jacob C., Blaudez D. und Chalot M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 254 (2): 173-181.
- Bellion M.**, Courbot M., Jacob C., Guinet F., Blaudez D. und Chalot M. (2007). Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporium*. *New Phytol.* 174 (1): 151-158.
- Bi W.X.**, Kong F., Hu X.Y. und Cui X. (2007). Role of glutathione in detoxification of copper and cadmium by yeast cells having different abilities to express cup1 protein. *Toxicol Mech Methods.* 17 (6): 371-378.
- Blaudez D.**, Botton B. und Chalot M. (2000). Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology.* 146 (Pt 5): 1109-1117.
- Braibant M.**, Guilloteau L. und Zygmunt M.S. (2002). Functional characterization of *Brucella melitensis* NorMI, an efflux pump belonging to the multidrug and toxic compound extrusion family, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3050-3053.
- Brent, K.J.** (1995). Fungicide Resistance in Crop Pathogens, How Can it be Managed. Global Crop Protection Federation, Brussels.
- Brockmann H.** und Renneberg K.H. (1952). Rubromycin, ein rotes Antibiotikum aus Actinomyceten. *Naturwissenschaften* 40 (2): 59-60.
- Brown D.G.**, Swanson J.K. und Allen C. (2007). Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence, *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2777-2786.
- Bugge A.** (2009). Auswirkung von Fungiziden auf Transporter von Basidiomyceten. Bachelorarbeit, Jena, Deutschland.
- Bundock P.**, den Dulk-Ras A., Beijersbergen A. und Hooykaas P.J. (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14 (13): 3206-3214.
- Bundock P.** und Hooykaas P.J. (1996). Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (26): 15272-15275.
- Burns C.**, Gregory K.E., Kirby M., Cheung M.K., Riquelme M., Elliott T.J., Challen M.P., Bailey A. und Foster G.D. (2005). Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. *Fungal Genet Biol.* 42 (3): 191-199.

- Burns** C., Leach K.M., Elliott T.J., Challen M.P., Foster G.D. und Bailey A. (2006). Evaluation of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus* using a range of promoters linked to hygromycin resistance. *Mol Biotechnol.* 32 (2): 129-138.
- Burse** A. (2003). Charakterisierung der Multidrug-Efflux-Transporter NorM und AcrAB in *Erwinia amylovora*. Dissertation, Marburg, Deutschland.
- Burse** A., Weingart H. und Ullrich M.S.(2004) NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in in vitro competition with other epiphytic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 693-703.
- Calvin** N.M. und Hanawalt P.C. (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170 (6): 2796-2801.
- Campoy** S., Pérez F., Martín J.F., Gutiérrez S. und Liras P. (2003). Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Curr Genet.* 43 (6): 447-452.
- Genis** J.L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucl. Acids Res.* 20: 2380.
- Chang** P.K., Yu J. und Yu J.H. (2004). *afIT*, a MFS transporter-encoding gene located in the aflatoxin gene cluster, does not have a significant role in aflatoxin secretion. *Fungal Genet. Biol.* 41: 911-920.
- Chen** X., Stone M., Schlaghaufer C. und Romaine C.P. (2000). A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol.* 66 (10): 4510-4513.
- Chen** J., Morita Y., Huda M.N., Kuroda T., Mizushima T. und Tsuchiya T. (2002). VmrA, a member of a novel class of Na⁺-coupled multidrug efflux pumps from *Vibrio parahaemolyticus*, *J. Bacteriol.* 184: 572-576.
- Chung** Y.J., Krueger, C., Metzgar, D. & Saier, M.H. Jr (2001). Size comparisons among integral membrane transport protein homologues in bacteria, archaea, and eucarya. *J. Bacteriol.* 183: 1012-1021.
- Collin-Hansen** C., Pedersen S.A., Andersen R.A. und Steinnes E. (2007). First report of phytochelatin in a mushroom: induction of phytochelatin by metal exposure in *Boletus edulis*. *Mycologia.* 99 (2): 161-174.
- Combier** J.P., Melayah D., Raffier C., Gay G. und Marmeisse R. (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *FEMS Microbiol Lett.* 220 (1): 141-148.
- Combier** J.P., Melayah D., Raffier C., Pépin R., Marmeisse R. und Gay G. (2004). Nonmycorrhizal (myc-) mutants of *Hebeloma cylindrosporium* obtained through insertional mutagenesis. *Mol Plant Microbe Interact.* 17 (9): 1029-1038.
- Courbot** M., Diez L., Ruotolo R., Chalot M. und Leroy P. (2004). Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Appl Environ Microbiol.* 70 (12): 7413-7417.
- Couturier** J., Fay E., Fitz M, Wipf D., Blaudez D. und Chalot M. (2010). PtAAP11, a high affinity amino acid transporter specifically expressed in differentiating xylem cells of poplar. *J Exp Bot* 61 (6): 1671-1682.
- Davelos** A.L., Kinkel L.L. und Samac D.A. (2004). Spatial variation in frequency and intensity of antibiotic interactions among Streptomycetes from prairie soil. *Appl Environ Microbiol.* 70(2): 1051-1058.
- De Boer** C., Meulman P.A., Wnuk R.J. und Peterson D.H. Geldanamycin, a new antibiotic. *J Antibiot (Tokyo).* 23 (9): 442-447.
- De Backer** M.D., Ilyina T., Ma X.J., Vandoninck S., Luyten W.H. und Vanden Bossche H. (2001). Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(6):1660-1670.
- De Freitas** J., Wintz H., Kim J.H., Poynton H., Fox T. und Vulpe C. (2003). Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biomaterials.* 16 (1): 185-197.
- Degefu** Y. und Hanif M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leaf-blight fungus. *Arch Microbiol* 180 (4): 279-284.
- Degenkolb** T., Heinze S., Schlegel B., Dornberger K., Möllmann U., Dahse H.M. und Gräfe U. (2000). Roseoferin, a new aminolipopeptide antibiotic complex from *Mycogone rosea* DSM 12973, structures and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 53 (2): 184-190.
- De Maio** (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock.* 11 (1): 1-12.
- Del Sorbo** G., Schoonbeek H. und De Waard M.A. (2000). Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet Biol.* 30 (1): 1-15.
- de Waard** M.A., Andrade A.C., Hayashi K., Schoonbeek H.J., Stergiopoulos I. und Zwiars L.H. (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Manag Sci.* 62 (3): 195-207.

- Dichtl** B., Stevens A. und Tollervey D. (1997). Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. *The EMBO Journal* 16 (23): 7184–7195.
- Dolniak**, B (2005). Functional characterisation of NIC2, a member of the MATE family from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Dissertation, Potsdam, Deutschland.
- Donovan J.** und Copeland P.R. (2009). Evolutionary history of selenocysteine incorporation from the perspective of SECIS binding proteins. *BMC Evol Biol.* 10: 9-229.
- Dower** W.J., Miller J.F. und Ragsdale C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16 (13): 6127-6143.
- Dridi** L., Tankovic J. und Petit J.C. (2004). CdeA of *Clostridium difficile*, a new multidrug efflux transporter of the MATE family. *Microb. Drug Resist.* 10: 191-196.
- Durrett** T.P., Gassmann W. und Rogers E.E. (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol* 144: 197–205.
- Egner** R., Mahé Y., Pandjaitan R. und Kuchler K. (1990). Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* (11): 5879-5887.
- Eide** D.J. (2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta.* 1763 (7): 711-722.
- Fang** W., Zhang Y., Yang X., Zheng X., Duan H., Li Y. und Pei Y. (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. *J Invertebr Pathol* 85:18–24.
- Fincham** J.R. (1989) Transformation in fungi. *Microbiol Rev.* 53 (1): 148-170.
- Finn** R.D., Mistry J., Tate J., Coghill P., Heger A., Pollington J.E., Gavin O.L., Gunasekaran P., Ceric G., Forslund K., Holm L., Sonnhammer E.L., Eddy S.R. und Bateman A. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research, Database Issue* 38: D211-222.
- Fischer** R. und Timberlake W. E. (1995). *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiledcoil protein necessary for nuclear positioning and completion of asexual development. *J Cell Biol* 128: 485-498.
- Fortin** A. und Piche, Y. (1979). Cultivation of *Pinus strobus* root hypocotyl explants for synthesis of ectomycorrhiza. *New Phytol.* 83: 109-119.
- Frank** A.B. (1885). Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber. Dtsch. Bot. Ges* 3: 128-145.
- Fries** N., Serck-Hanssen K., Häll Dimberg L. und Theander O. (1987). Abietic acid an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). *Exp Mycol* 11: 360-363.
- Frohman** M.A. (1993). Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymol.* 218: 340-356.
- Furukawa** J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K, Ma JF. (2007). An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol.* 48 (8): 1081-1091.
- Gadd** G.M. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124: 25-60.
- Gaetke**, L. M., und Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189: 147-163.
- Gardiner** D.M., Jarvis R.S. und Howlett B.J. (2005). The ABC transporter gene in the sirodesmin biosynthetic gene cluster of *Leptosphaeria maculans* is not essential for sirodesmin production but facilitates self-protection. *Fungal Genet Biol.* 42 (3):257-263.
- Genenger** M. (1997). Vergleichende morphologische und ontogenetische Untersuchungen zur *in vitro*-Spezifität von *Tricholoma terreum* und *Tricholoma vaccinum* mit *Pinus sylvestris* und *Picea abies*. Diplomarbeit, Marburg, Deutschland.
- Gentleman** R. C., Carey V. J., Bates D. M., Bolstad B., Dettling M., Dudoit S., Ellis B., Gautier L., Ge Y., Gentry J., Hornik K., Hothorn T., Huber W., Iacus S., Irizarry R., Leisch F., Li C., Maechler M., Rossini A. J., Sawitzki G., Smith C., Smyth G., Tierney L., Yang J. Y. H. und Zhang J. H. (2004). Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* 5: R80.
- Gietz** R.D., Schiestl R.H., Willems A.R. und Woods R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11 (4): 355-360.
- Godio** R.P., Fouces R., Gudiña E.J. und Martín J.F. (2004). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the antitumor clavatic acid-producing basidiomycete *Hypoholoma sublateritium*. *Curr Genet.* 46 (5): 287-294.
- Gola** S und Kothe E. (2003). The little difference: *in vivo* analysis of pheromone discrimination in *Schizophyllum commune*. *Curr. Genet.* 42: 276-283.

- González-Guerrero** M., Benabdellah K., Valderas A., Azcón-Aguilar C. und Ferrol N. (2010). GintABC1 encodes a putative ABC transporter of the MRP subfamily induced by Cu, Cd, and oxidative stress in *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 20 (2): 137-146.
- Gräfe** U., Ihn W., Ritzau M., Schade W., Stengel C., Schlegel B., Fleck W.F., Künkel W., Härtl A. und Gutsche W. (1995). Helioferins; novel antifungal lipopeptides from *Mycogone rosea*: screening, isolation, structures and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*. 48 (2): 126-133.
- Gray** D.J. und Morgan-Jones G. (1981). Host-parasite relationships of *Agaricus brunnescens* and a number of mycoparasitic hyphomycetes. *Mycopathologia* 75: 55-59.
- Grisshammer** R. (2006). Understanding recombinant expression of membrane proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 337-340.
- Green** L.S. und Rogers E.E. (2004). FRD3 controls iron localization in Arabidopsis. *Plant Physiology* 136: 2523–2531.
- Grimaldi** B., de Raaf M.A., Filetici P., Ottonello S. und Ballario P. (2005). Agrobacterium-mediated gene transfer and enhanced green fluorescent protein visualization in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*: a first step towards truffle genetics. *Curr Genet*. 48 (1): 69-74.
- Hanif** M., Pardo A.G., Gorfer M. und Raudaskoski M (2002). T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. *Curr Genet* 41: 183–188.
- Harmsen** M.C., Schuren F.H., Moukha S.M., van Zuilen C.M., Punt P.J. und Wessels J.G. (1992). Sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes from the basidiomycetes *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Agaricus bisporus*. *Curr Genet*. 22 (6): 447-454.
- Haslbeck** M., Braun N., Stromer T., Richter B., Model N., Weinkauff S. und Buchner J. (2004). Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 23 (3): 638-649.
- He** G.X., Kuroda T., Mima T., Morita Y., Mizushima T. und Tsuchiya T., An H⁺-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol*. 186: 262–265.
- Hebraud** M. und Fevre M. (1988). Protoplast production and regeneration from mycorrhizal fungi and their use for isolation of mutants. *Can J Microbiol* 34: 157-161.
- Herzlieb** C. (2010). Untersuchung von Transportern der MATE-Familie des Homobasidiomyceten *Schizophyllum commune*. Diplomarbeit, Jena, Deutschland.
- Hiasa** M., Matsumoto T., Komatsu T. und Moriyama Y. (2006). Wide variety of locations for rodent MATE1, a transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Am J Physiol Cell Physiol*. 291 (4): C678-686.
- Hirano** T., Sato T., Yaegashi K. und Enei H. (2000). Efficient transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* with a vector using a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter to hygromycin B resistance. *Mol Gen Genet*. 263 (6): 1047-1052.
- Holland** M.J. und Holland J.P. (1978). Isolation and Identification of Yeast Messenger Ribonucleic Acids Coding for Enolase, Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, and Phosphoglycerate Kinase'. *Biochemistry* 17 (23): 4900-4907.
- Horan** DP, Chilvers GA (1990) Chemotropism; the key to ectomycorrhizal formation? *New Phytol* 116: 297-301.
- Huda** M.N., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T. und Tsuchiya T. (2001). Na⁺-driven multidrug efflux pump VcmA from *Vibrio cholerae* non-O1, a non-halophilic bacterium, *FEMS Microbiol. Lett*. 203: 235-239.
- Huda** M.N., Chen J., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T. und Tsuchiya T. (2003). Gene cloning and characterization of VcrM, a Na⁺-coupled multidrug efflux pump, from *Vibrio cholerae* non-O1, *Microbiol. Immunol*. 47: 419–427.
- Hvorup** R.N., Winnen B., Chang A.B., Jiang Y., Zhou X.F. und Saier M.H. Jr (2003). The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur J Biochem*. 270 (5): 799-813.
- Ishii** H., Fraaije B.A., Sugiyama T., Noguchi K., Nishimura K., Takeda T., Amano T. und Hollomon D.W. (2001). Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology*. 91 (12): 1166-1171.
- Iordache** V., Gherghel F. und Kothe E. (2009). Assessing the Effect of Disturbances on Diversity of Ectomycorrhiza. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6, 414-432.
- Jentschke** G., und Godbold D.L. (2000). Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiol Plant* 109: 107-116.

- Jo W.J., Loguinov A., Chang M., Wintz H., Nislow C., Arkin A.P., Giaever G. und Vulpe C.D. (2008). Identification of genes involved in the toxic response of *Saccharomyces cerevisiae* against iron and copper overload by parallel analysis of deletion mutants. *Toxicol Sci.* 101 (1): 140-151.
- Jobb G., von Haeseler A. und Strimmer K. (2004). TREEFINDER: A powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology.*
- Jungwirth H. und Kuchler K. (2006). Yeast ABC transporters - a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett.* 580 (4): 1131-1138.
- Kaatz G.W., McAleese F. und Seo S.M. (2005). Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 1857-1864.
- Katoh K. und Toh H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9 (4): 286-298.
- Kempainen M., Circosta A., Tagu D., Martin F. und Pardo A.G. (2005). Agrobacterium-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* 16 (1): 19-22.
- Kim S.I., Veena und Gelvin S.B. (2007). Genome-wide analysis of Agrobacterium T-DNA integration sites in the Arabidopsis genome generated under non-selective conditions. *Plant J.* 51(5): 779-791.
- Knabe N. (2008). Untersuchung von Signalkomponenten der sexuellen Entwicklung bei dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune*. Dissertation, Jena, Deutschland.
- Koide R. T., Suomi L., Stevens C. M. und McCormick L. (1998). Interactions between needles of *Pinus resinosa* and ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* (1998), 140, 539-547.
- Kontoyiannis D.P. und May G.S. (2001). Identification of azole-responsive genes by microarray technology: why are we missing the efflux transporter genes? *Antimicrob Agents Chemother.* 45 (12): 3674-3676.
- Kotzias D., Sparta C. und Duane M. (1992). Distribution of Optical Isomers of Monoterpenes (α -pinene) in the Leaf-Oil of Conifers. *Naturwissenschaften* 79, 24- 26.
- Kottke I. und Oberwinkler F. (1986). Mycorrhiza of forest trees - structure and function. *Trees* 1: 1-24
- Kottke I., Guttenberger M., Hampf R. und Oberwinkler F. (1987). An *in vitro* method for establishing mycorrhiza on coniferous seedlings. *Trees* 1: 191-194.
- Krause K. (2005). Wirtsspezifität und spezifische Genexpression in Mykorrhiza-Pilzen der Gattung *Tricholoma*. Dissertation, Jena, Deutschland.
- Krause K. und Kothe E. (2006). Use of RNA fingerprinting to identify fungal genes specifically expressed during ectomycorrhizal interaction. *J Basic Microbiol* 46 (5): 387-399.
- Kretschmer M., Leroch M., Mosbach A., Walker A.S., Fillinger S., Mernke D., Schoonbeek H.J., Pradier J.M., Leroux P., De Waard M.A. und Hahn M. (2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog.* 5 (12): e1000696.
- Kropp B.R. und Fortin J.A. (1986). Formation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Can J Bot* 64: 1224-1226.
- Kunji E.R., Chan K.W., Slotboom D.J., Floyd S., O'Connor R. und Monné M. (2005). Eukaryotic membrane protein overproduction in *Lactococcus lactis*. *Curr Opin Biotechnol.* 16 (5): 546-551.
- Kuroda T. und Tsuchiya T. (2009). Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta.* 1794 (5): 763-768.
- Langer I., Krpata D., Peintner U., Wenzel W.W. und Schweiger P. (2008). Media formulation influences *in vitro* ectomycorrhizal synthesis on the European aspen *Populus tremula* L. *Mycorrhiza* 6-7: 297-307.
- Lazo G.R., Stein P.A. und Ludwig R.A. (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology (N Y)* 9 (10): 963-967.
- Leclerque A., Wan H., Abschutz A., Chen S., Mitina G.V., Zimmermann G. und Schairer H.U. (2003). *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis (AIM) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Curr Genet* 45: 111-119.
- Lee S., Shin D.S., Kim J.S., Oh K.B. und Kang S.S. (2003). Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots. *Arch Pharm Res.* 26 (6): 449-452.
- Leitch J.M., Jensen L.T., Bouldin S.D., Outten C.E., Hart P.J. und Culotta V.C. (2009). Activation of Cu,Zn-superoxide dismutase in the absence of oxygen and the copper chaperone CCS. *J Biol Chem.* 284 (33): 21863-21871.
- Lengeler K. und Kothe E. (1994). Molecular characterization of *ura1*, a mutant allele for orotidine-5'-monophosphate decarboxylase in *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiol Lett.* 119 (1-2): 243-247.

- Leyval C.**, Turnau K. und Haselwandter K. (1997). Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7 :139–153.
- Li L**, He Z, Pandey GK, Tsuchiya T, Luan S. (2002). Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *J Biol Chem.* 277 (7): 5360-5368.
- Liao X.G.**, Fang W.G., Zhang Y.J., Fan Y.H., Wu X.W., Zhou Q. und Pei Y. (2008). Characterization of a highly active promoter, PBbgpd, in *Beauveria bassiana*. *Curr Microbiol.*57 (2): 121-126.
- Ling J.M.**, Moore R.A., Surette M.G. und Woods D.E. (2006). The *mviN* homolog in *Burkholderia pseudomallei* is essential for viability and virulence. *Can J Microbiol.* 52 (9): 831-842.
- Liu X.**, Jiang J., Shao J., Yin Y. und Ma Z. (2010). Gene transcription profiling of *Fusarium graminearum* treated with an azole fungicide tebuconazole. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 Jan;85(4):1105-14. Epub 2009 Oct 10.
- Long F.**, Rouquette-Loughlin C., Shafer W.M. und Yu E.W. (2008). Functional cloning and characterization of the multidrug efflux pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 3052-3060.
- Lobanov A.V.**, Hatfield D.L. und Gladyshev V.N. (2009). Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim Biophys Acta.* 1790 (11): 1424-1428.
- Lottspeich F.** und Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, HD
- Lugones L.G.**, Scholtmeijer K., Klootwijk R. und Wessels J.G. (1999). Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*. *Mol Microbiol.* 32 (4): 681-689.
- Liu Y.** und Whittier R.F. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragment from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25: 674-681.
- Luo C.X.**, Hu M.J., Jin X., Yin L.F., Bryson P.K. und Schnabel G. (2010). An intron in the cytochrome *b* gene of *Monilinia fructicola* mitigates the risk of resistance development to QoI fungicides. *Pest Manag Sci.* 2010 Sep 2. [Epub ahead of print] DOI 10.1002/ps.2016.
- Ma B.**, Mayfield M.B. und Gold M.H. (2001). The green fluorescent protein gene functions as a reporter of gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 67 (2): 948-955..
- Ma Z.**, Yoshimura M.A. und Michailides T.J. (2003). Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Appl Environ Microbiol.* 69 (12): 7145-7152.
- Ma Z.** und Michailides T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853–863.
- MacDiarmid C.W.** und Cardner R.C. (1996). Al Toxicity in Yeast'. A Role for Mg? *Plant Physiol.* 112: 1101-1109.
- Macreadie I.G.** (2008). Copper transport and Alzheimer's disease. *Eur Biophys J.* 37 (3): 295-300.
- Madigen M.T.**, Martinko J.M. und Parker J. (2003). *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- Magalhaes JV**, Liu J, Guimarães CT, Lana UG, Alves VM, Wang YH, Schaffert RE, Hoekenga OA, Piñeros MA, Shaff JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV. (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat Genet.* 39 (9): 1156-1161.
- Magalhaes J.V.** (2010). How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. *Ann Bot.* 106 (1): 199-203.
- Maron L.G.**, Piñeros M.A., Guimarães C.T., Magalhaes J.V., Pleiman J.K., Mao C., Shaff J., Belicuas S.N. und Kochian L.V. (2010). Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *Plant J.* 61 (5): 728-740.
- Martin F.**, Laurent P., de Carvalho D., Voible C., Balestrini R., Bonfante P. und Tagu D. (1999) Cell Wall Proteins of the Ectomycorrhizal Basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: Identification, Function, and Expression in Symbiosis. *Fungal Genet Biol* 27: 161–174 .
- Martin F.**, Kohler A. und Duplessis S. (2007). Living in harmony in the wood underground: ectomycorrhizal genomics. *Curr Opin Plant Biol.* 10 (2): 204-210.
- Martin F.**, Aerts A., Ahrén D., Brun A., Danchin E.G., Duchaussoy F., Gibon J., Kohler A., Lindquist E., Pereda V., Salamov A., Shapiro H.J., Wuyts J., Blaudez D., Buée M., Brokstein P., Canbäck B., Cohen D., Courty P.E., Coutinho P.M., Delaruelle C., Detter J.C., Deveau A., DiFazio S., Duplessis S., Fraissinet-Tachet L., Lucic E., Frey-Klett P., Fourrey C., Feussner I., Gay G., Grimwood J., Hoegger P.J., Jain P., Kilaru S., Labbé J., Lin Y.C., Legué V., Le Tacon F., Marmeisse R., Melayah D., Montanini B., Muratet M., Nehls U., Niculita-Hirzel H., Oudot-Le

- Secq M.P., Peter M., Quesneville H., Rajashekar B., Reich M., Rouhier N., Schmutz J., Yin T., Chalot M., Henrissat B., Kues U., Lucas S., Van de Peer Y., Podila G.K., Polle A., Pukkila P.J., Richardson P.M., Rouzé P., Sanders I.R., Stajich J.E., Tunlid A., Tuskan G. und Grigoriev I.V. (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 6; 452 (7183): 88-92.
- Martin** F. und Nehls U. (2009) Harnessing ectomycorrhizal genomics for ecological insights. *Curr Opin Plant Biol.* 12 (4): 508-515.
- Martin** F., Kohler A., Murat C., Balestrini R., Coutinho P.M., Jaillon O., Montanini B., Morin E., Noel B., Percudani R., Porcel B., Rubini A., Amicucci A., Amselem J., Anthouard V., Arcioni S., Artiguenave F., Aury J.M., Ballario P., Bolchi A., Brenna A., Brun A., Buée M., Cantarel B., Chevalier G., Couloux A., Da Silva C., Denoeud F., Duplessis S., Ghignone S., Hilselberger B., Iotti M., Marçais B., Mello A., Miranda M., Pacioni G., Quesneville H., Riccioni C., Ruotolo R., Splivallo R., Stocchi V., Tisserant E., Viscomi A.R., Zambonelli A., Zampieri E., Henrissat B., Lebrun M.H., Paolocci F., Bonfante P., Ottonello S. und Wincker P. (2010) Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature*. 2010 Apr 15; 464 (7291): 1033-1038.
- Marjanović** Z., Uehlein N., Kaldenhoff R., Zwiazek J.J., Weiss M, Hampp R. und Nehls U. (2005) Aquaporins in poplar: what a difference a symbiont makes! *Planta* 222 (2) : 258-268.
- Matsumoto** T., Kanamoto T., Otsuka M., Omote H. und Moriyama Y. (2009). Role of glutamate residues in substrate recognition by human MATE1 polyspecific H⁺/organic cation exporter. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294 (4): C1074-1078.
- McCann** P.A. und Pogell B.M. (1979). Pamamycin: a new antibiotic and stimulator of aerial mycelia formation. *J Antibiot (Tokyo).* 32 (7): 673-678.
- Meharg** A.A. (2003). The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol Res.* 107: 1253–1265.
- Melin** E. (1921). Über die Mykorrhizenpilze von *Pinus silvestris* L. und *Picea abies* (L.) K&RST. *Svensk bot. Tidskr.* 15: 192--203.
- Meyer** V., Mueller D., Strowig T. und Stahl U. (2003) Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet.* 43 (5): 371-377.
- Michielse** C.B., Hooykaas P.J., van den Hondel C.A. und Ram A.F. (2005). Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet.* 48 (1): 1-17.
- Miguez** M., Reeve C., Wood P.M. und Hollomon D.W. (2004). Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides. *Pest Manag Sci.* 60 (1): 3-7.
- Miras** R., Morin I., Jacquin O., Cuillel M., Guillain F. und Mintz E. (2008). Interplay between glutathione, Atx1 and copper. 1. Copper(I) glutathionate induced dimerization of Atx1. *J Biol Inorg Chem.* 13 (2): 195-205.
- Mishra** N.C. und Tatum E.L. (1973). Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3875-3879.
- Molina** R., Massicotte H. und Trappe J.M. (1992). Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. *Mycorrhizal Functioning:* 357–423.
- Morel** M., Ngadin A.A., Droux M., Jacquot J.P. und Gelhaye E. (2009). The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Cell Mol Life Sci.* 66 (23): 3711-3725.
- Morita** Y., Kodama K., Shiota S., Mine T., Kataoka A., Mizushima T. und Tsuchiya T. (1998). NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1778–1782.
- Morita** M., Shitan N., Sawada K., Van Montagu M.C., Inzé D., Rischer H., Goossens A., Oksman-Caldentey K.M., Moriyama Y. und Yazaki K. (2009). Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106 (7): 2447-2452.
- Moriyama** Y., Hiasa M., Matsumoto T. und Omote H. (2008). Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica.* 38 (7-8): 1107-1118.
- Müller** T., Benjdia M., Avolio M., Voigt B., Menzel D., Pardo A., Frommer W.B. und Wipf D. (2006). Functional expression of the green fluorescent protein in the ectomycorrhizal model fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza.* 16 (6): 437-442.
- Müller** T., Avolio M., Olivi M., Benjdia M., Rikirsch E., Kasaras A., Fitz M., Chalot M. und Wipf D. (2007). Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: the *Hebeloma cylindrosporum-Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* 68 (1) : 41-51.

- Nehls** U, Göhringer F, Wittulsky S, Dietz S. (2010) Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biol* 12 (2): 292-301.
- Nishino** K., Latifi T. und Groisman E.A. (2006) Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Mol Microbiol.* 59: 126-141.
- Nolden** S. (2002). Versuche zur Lokalisierung eines Pheromonerezeptors in *Schizophyllum commune*. Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität, Jena
- Norkrans** B. (1949). Some mycorrhiza-forming *Tricholoma* species. *Svensk Bot. Tidskr* 43: 485-490
- O'Connell** K.P., Raffel S.J., Saville B.J. und Handelsman J. (1998). Mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 that do not induce chlorosis in plants. *Microbiology.* 144 (9): 2607-2617.
- Oerke** E.C.I und Steiner U. (2003). Wie funktionieren Fungizide? *Agrocourier.com*
- Ohm** R.A., de Jong J.F., Lugones L.G., Aerts A., Kothe E., Stajich J.E., de Vries R.P., Record E., Levasseur A., Baker S.E., Bartholomew K.A., Coutinho P.M., Erdmann S., Fowler T.J., Gathman A.C., Lombard V., Henrissat B., Knabe N., Kües U., Lilly W.W., Lindquist E., Lucas S., Magnuson J.K., Piumi F., Raudaskoski M., Salamov A., Schmutz J., Schwarze F.W., Vankuyk P.A., Horton J.S., Grigoriev I.V. und Wösten H.A. (2010). Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nat Biotechnol.* 11.
- Ohta** A. (1998) Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. *Mycoscience* 39: 15-19.
- Ohta** K.Y., Inoue K., Hayashi Y. und Yuasa H. (2006). Molecular identification and functional characterization of rat multidrug and toxin extrusion type transporter 1 as an organic cation/H⁺ antiporter in the kidney. *Drug Metab Dispos.* 34 (11): 1868-1874.
- Omote** H., Hiasa M., Matsumoto T., Otsuka M. und Moriyama Y. (2006). The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol Sci.* 27 (11): 587-593.
- Omura** S., Iwai Y., Takahashi Y., Sadakane N., Nakagawa A., Oiwa H., Hasegawa Y. und Ikai T. (1979). Herkimycin, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo).* 32 (4): 255-261.
- Otsuka** M., Matsumoto T., Morimoto R., Arioka S., Omote H. und Moriyama Y. (2005). A human transporter protein that mediates final excretion step for toxic organic cations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102:17923–17928.
- Pardo** J.M., Malpartida F., Rico M. und Jiménez A. (1985). Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygrosopicus*--the producing organism. *J Gen Microbiol.* 131 (6): 1289-1298.
- Pardo** A.G., Hanif M., Raudaskoski M. und Gorfer M. (2002) Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycol Res* 106: 132-137.
- Paumi** C.M., Chuk M., Snider J., Stagljar I. und Michaelis S. (2009). ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and their interactors: new technology advances the biology of the ABC (MRP) subfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73 (4): 577-593.
- Pellengahr** K. (2004). Charakterisierung von ausgewählten Protein-Phosphatasen und MATE-Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Potsdam, Deutschland.
- Penninckx** M. (2000). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb Technol.* 26: 737–742.
- Pitzschke** A. und Hirt H. (2010). New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO J.* 29 (6): 1021-1032.
- Pócsi** I., Prade R.A. und Penninckx M.J. (2004). Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi. *Advances in Microbial Physiology* 49: 1-76.
- Rambout** A. (2009). FigTree v1.2.3. Tree figure drawing tool. Published by the author at tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree.
- Rekangalt** D., Verner M.C., Kües U., Walser P.J., Marmeisse R., Debaud J.C. und Fraissinet-Tachet L. (2007). Green fluorescent protein expression in the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiol Lett.* 268 (1): 67-72.
- Reimann** S. und Deising H.B. (2005). Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. *Appl Environ Microbiol.* 71 (6): 3269-3275.
- Riedlinger** J., Schrey S.D., Tarkka M.T., Hampp R., Kapur M. und Fiedler H.P. (2006). Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain Ach 505. *Appl Environ Microbiol.* 2006 May;72(5):3550-7.
- Rieger** S. (1995). Veränderungen des Monoterpenspektrums in verletzten Fichtenwurzeln und ihre potentielle Bedeutung für die Resistenz gegenüber *Heterobasidion annosum*. *Eur. J. For. Path.* 25: 367-380.

- Ritchie** R.J. und Raghupathi S.S. (2008). Al-toxicity studies in yeast using gallium as an aluminum analogue. *Biometals*. (4): 379-393.
- Robison** R.S., Aszalos A., Kraemer N. und Giannini S.M. (1971). Production of fungichromin by *Streptomyces cinnamomeus* subsp. *cinnamomeus* NRRL B-1285. *J Antibiot (Tokyo)*. 24 (4): 273.
- Rodríguez-Tovar** A.V., Ruiz-Medrano R., Herrera-Martínez A., Barrera-Figueroa B.E., Hidalgo-Lara M.E., Reyes-Márquez B.E., Cabrera-Ponce J.L., Valdés M. und Xoconostle-Cázares B. (2005). Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *J Microbiol Methods*. 63 (1): 45-54.
- Roohparvar** R., Mehrabi R., Van Nistelrooy J.G., Zwiers L.H. und De Waard M.A. (2008). The drug transporter MgMfs1 can modulate sensitivity of field strains of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* to the strobilurin fungicide trifloxystrobin. *Pest Manag Sci*. 64 (7): 685-693.
- Rozman** D. und Komel R. (1994). Isolation of genomic DNA from filamentous fungi with high glucan level. *BioTechniques* 16, 382.
- Rudakov** O.L. (1978). Physiological Groups in Mycophilic Fungi. *Mycologia* 70 (1): 150-159.
- Ryan** P.R., Raman H., Gupta S., Horst W.J. und Delhaize E. (2009). A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiol*. 149 (1): 340-351.
- Saiki** R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. und Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sambrook** J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989) *Molecular cloning - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sambrook** J. und Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sanmee** R., Lumyong P., Dell B und Lumyong S. (2010). In vitro cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand. *Mycoscience* (2010) 51:15–22.
- Schaefer** B.C. (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem*. 227 (2): 255-273.
- Scholtmeijer** K., Wösten H.A., Springer J. und Wessels J.G. (2001). Effect of introns and AT-rich sequences on expression of the bacterial hygromycin B resistance gene in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Appl Environ Microbiol*. 67 (1): 481-483.
- Schrey** S.D. und Tarkka M.T. (2008). Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 94 (1): 11-19.
- Schubert** D., Raudaskoski M., Knabe N. und Kothe E. (2006). Ras GTPase-activating protein Gap1 of the homobasidiomycete *Schizophyllum commune* regulates hyphal growth orientation and sexual development. *Eukaryot. Cell* 5: 683-695.
- Schuck** H.J. (1982). The chemical composition of the monoterpene fraction in wounded wood of *Picea abies* and its significance for the resistance against wound infecting fungi. *Eur. J. For. Path.* 12: 175-181.
- Schützendübel** A. und Polle A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot*. 53 (372): 1351-1365.
- Schwalb** M.N. und Miles P.G. (1967). Morphogenesis of *Schizophyllum commune* L. Morphological variation and mating behavior of the thin mutation. *Am J. Bot.* 54: 440-446.
- Senftleben** D. (2009). Funktion des intrazellulären Carboxyterminus des Bar2-Signalrezeptors im Basidiomyceten *Schizophyllum commune*. Diplomarbeit, Jena, Deutschland
- Shiomi**, N. Fukuda H., Fukuda Y., Murata K. und Kimura A. (1991) Nucleotide sequence and characterization of a gene conferring resistance to ethionine in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* 71: 211–215.
- Siderius**, M., und Mager, W.H. (1997) General stress response: in search of a common denominator. *Yeast Stress Responses*. Hohmann, S., and Mager, W.H., Springer-Verlag, Heidelberg: 213-230.
- Smith** S.E. und Read D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Third Edition. Academic Press
- Southern** E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Su** X.Z., Chen J., Mizushima T., Kuroda T. und Tsuchiya T. (2005) AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 4362–4364.

- Sun** S.J., Chen D.X., Xie B.G., Hu F.P. und Zheng J.G. (2009). Isolation of GPD promoter from *Tremella fuciformis* and driving expression of EGFP gene. *DNA Cell Biol.* 28 (2): 65-70.
- Takatsuki** A., Arima K. und Tamura G. (1971). Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo).* 24 (4): 215-223.
- Tanihara** Y., Masuda S., Sato T., Katsura T., Ogawa O. und Inui K. (2007). Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem Pharmacol.* 74 (2): 359-371.
- Tomoda** H., Nishida H., Huang X.H., Masuma R., Kim Y.K. und Omura S. (1992). New cyclodepsipeptides, enniatins D, E and F produced by *Fusarium* sp. FO-1305. *J Antibiot (Tokyo).* 45 (8): 1207-1215.
- Tusnády** G.E. und Simon I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server" *Bioinformatics* 17: 849-850.
- Trappe** J. M. (1962). Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot. Rev.* 28 (4): 538-606.
- Treger** J.M., Magee T.R. und Kevin McEntee (1998). Functional Analysis of the Stress Response Element and Its Role in the Multistress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 243 (1): 13-19.
- Tzfira** T. und Citovsky V. (2002). Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol.* 12 (3): 121-129.
- Ulland** T.K., Buchan B.W., Ketterer M.R., Fernandes-Alnemri T., Meyerholz D.K., Apicella M.A., Alnemri E.S., Jones B.D., Nauseef W.M. und Sutterwala F.S. (2010). Cutting edge: mutation of *Francisella tularensis* mviN leads to increased macrophage absent in melanoma 2 inflammasome activation and a loss of virulence. *J Immunol.* 185 (5): 2670-2674.
- van de Rhee** M.D., Graça P.M., Huizing H.J. und Mooibroek H. (1996). Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance. *Mol Gen Genet.* 250 (3): 252-258.
- Weber** M, Salo V, Uuskallio M, Raudaskoski M. (2005). Ectopic expression of a constitutively active Cdc42 small GTPase alters the morphology of haploid and dikaryotic hyphae in the filamentous homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Fungal Genet Biol.* 42 (7): 624-637.
- Weiss** M., Mikolajewski S., Peipp H., Schmitt U., Schmidt J., Wray V. und Strack D. (1997). Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in Larch mycorrhizas. *Plant Physiol* 114: 15-27.
- Weld** R.J., Plummer K.M., Carpenter M.A. und Ridgway H.J. (2006). Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res.* 16 (1): 31-44.
- Wendland** J., Lengeler K. und Kothe, E. (1996). An instant preparation method for nucleic acids of filamentous fungi. *Fungal Genet. Newslet.* 43: 54-55.
- Whiffen** A.J. (1948). The production, assay, and antibiotic activity of actidione, an antibiotic from *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 56 (3): 283-291.
- Wiemann** P., Willmann A., Straeten M., Kleigrew K., Beyer M., Humpf H.U. und Tudzynski B. (2009). Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol Microbiol.* 72 (4): 931-346.
- Xu** X.J., Su X.Z., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T. und Tsuchiya T. (2003a). Molecular cloning and characterization of the HmrM multidrug efflux pump from *Haemophilus influenzae* Rd, *Microbiol. Immunol.* 47: 937-943.
- Xu** J. und Gong Z.Z. (2003b). Intron requirement for AFP gene expression in *Trichoderma viride*. *Microbiology.* 149 (Pt 11): 3093-3097.
- Yazaki** K., Sugiyama A., Morita M. und Shitan N. (2007). Secondary transport as an efficient membrane transport mechanism for plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 7 (3), DOI: 10.1007/s11101-007-9079-8.
- Yokosho** K., Yamaji N., Ueno D., Mitani N. und Ma J.F. (2009). OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol.* 149 (1): 297-305
- Zähringer** H., Thevelein J.M. und Nwaka S. (2000). Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. *Mol Microbiol.* 35 (2): 397-406.
- Zhang** X., Cherrington N.J. und Wright S.H. (2007). Molecular identification and functional characterization of rabbit MATE1 and MATE2-K. *Am J Physiol Renal Physiol.* 297 (2): F360-F370.
- Zwiers** L.H. und De Waard M.A. (2001). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Curr Genet* 39: 388-393.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes H ₂ O
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid ("komplementäre Desoxyribonukleinsäure")
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Δ	Deletion
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
IPTG	Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranosid
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	Molar
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	1,4-Piperazindiethanesulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute ("Umdrehung pro Minute")
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	sodium chloride/sodium citrate
Tab.	Tabelle
TAE	TrisAcetat-EDTA
TAIL-PCR	Thermal Asymmetric Interlaced-PCR
TE	Tris-EDTA
U	Unit = μmol Umsatz pro Minute
Vol	Volumen
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-β-D-Galactosid

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Dissertation habe ich selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen, persönliche Mitteilungen und Hilfsmittel benutzt.

Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ferner habe ich nicht versucht diese Arbeit oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation einzureichen.

Jena,

Ines Schlunk

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Erika Kothe für die Möglichkeit zur Promotion und ihrer Diskussionsbereitschaft sowie ihrem Verständnis für die verlängerte Promotionszeit aufgrund meiner Elternzeit.

Für die Bereitstellung der Naturstoffe danke ich Prof. Dr. C. Hertweck und Dr. Michael Ramm vom HKI, Jena. Ebenso möchte ich mich bei Wolfgang Schmidt-Heck vom HKI Jena, Gruppe Bioinformatik, für die statistische Auswertung der Microarray-Daten bedanken. Prof. Dr. med E. Straube aus der Medizinischen Mikrobiologie danke ich für die Möglichkeit zur Nutzung des Laser-Scanning Mikroskops und Katja Schwarzer für die nette Betreuung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Katrin Krause für ihre stete Hilfsbereitschaft trotz ihres hohen Arbeitspensums und das geduldige Lesen der Dissertation bedanken. Melanie Wirth möchte ich für ihre großartige Organisationsleistung danken, ohne die die Tagungen in Amerika und Mexico nicht so unvergesslich gewesen wären. Dominik Senftleben danke ich für die Bereitstellung der Rechnerleistung für die Erstellung des Stammbaumes und Daniela Freihorst und Dr. Susann Erdmann für ihre Geduld und Bereitschaft zur Klärung vieler Fragen rund um den Biochip. Weiterhin möchte ich mich bei allen „Pilzleuten“ bedanken sowie der gesamten Arbeitsgruppe für die nette Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Meinen Studenten und Diplomanden danke ich für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit und dafür, dass sie mich gelehrt haben, mich in Geduld zu üben. Besonders erwähnen möchte ich dabei Andre Bugge, der mit viel Engagement in seiner Bachelorarbeit einen wesentlichen Beitrag zur Adaption und Mikroskopie beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gebührt meinen Eltern und meiner Familie, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit fertig zu stellen und an den Tagungen teilzunehmen. Trude danke ich dafür, dass sie mir immer wieder den Blick für die wesentlichen Dinge im Leben gezeigt hat und mich so schön zum Lachen bringen kann.

Präsentationen auf nationalen und internationalen Tagungen

- 09/2005 7. VAAM-Symposium „Molekularbiologie der Pilze“ in Bochum, Poster „*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the ectomycorrhizal fungi *Tricholoma terreum* and *T.vaccinum*“
- 03/2009 25th Fungal Genetics Conference, Asilomar, California, USA, Poster “Multidrug efflux in ectomycorrhizal interaction”
- 09/2009 9th Molecular Biology of Fungi Symposium (MBF 2009), Münster, Poster
“A member of the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*”
- 12/2009 10th International Fungal Biology Conference, Ensenada, Mexico, Poster, “Genes of the multidrug and toxic compound extrusion (mate) family in fungi”
- 09/2010 Biotransformation by Fungal Cells or Fungal Enzymes, Senftenberg, Vortrag, “Characterization of a multidrug transporter of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*”

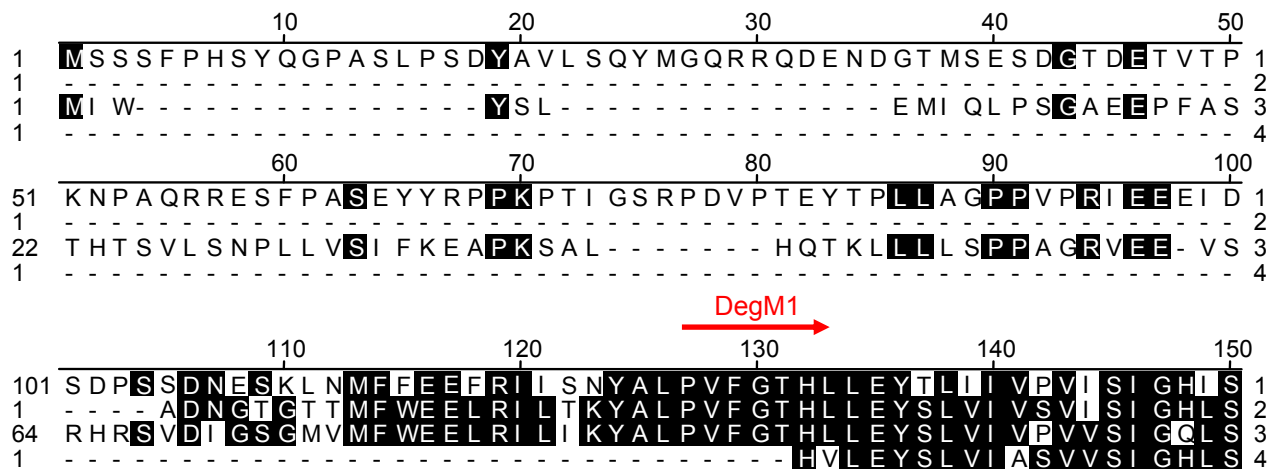
Publikationen

Asiimwe, T., Krause, K., Schlunk, I. and Kothe, E. Modulation of ethanol stress tolerance by aldehyde dehydrogenase in the mycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*. Manuskript für *Mycorrhiza*.

Asiimwe, T., Krause, K., Schlunk, I. and Kothe, E. (2010). Ectomycorrhiza in sustainable ecosystem functioning: A closer look at the symbiotic association. *In*: Behl (ed.). Resource Management Towards Sustainable Agriculture, Bioenergy and livelihood. Agrobios (International) Publishers, Jodhpur, India.

Dimkpa CO, Gherghel F, Haferburg G, Reinicke M, Schindler F, Schlunk I, Schmidt A, Schütze E, Zeggel L, Merten D, Büchel G, Kothe E (2009) The effect of acid mine drainage on soil microbiology. In Sustainable agriculture for food, bio-energy and livelihood security; Behl, R.K. et al (Eds.). Agrobios, India.

Anhang

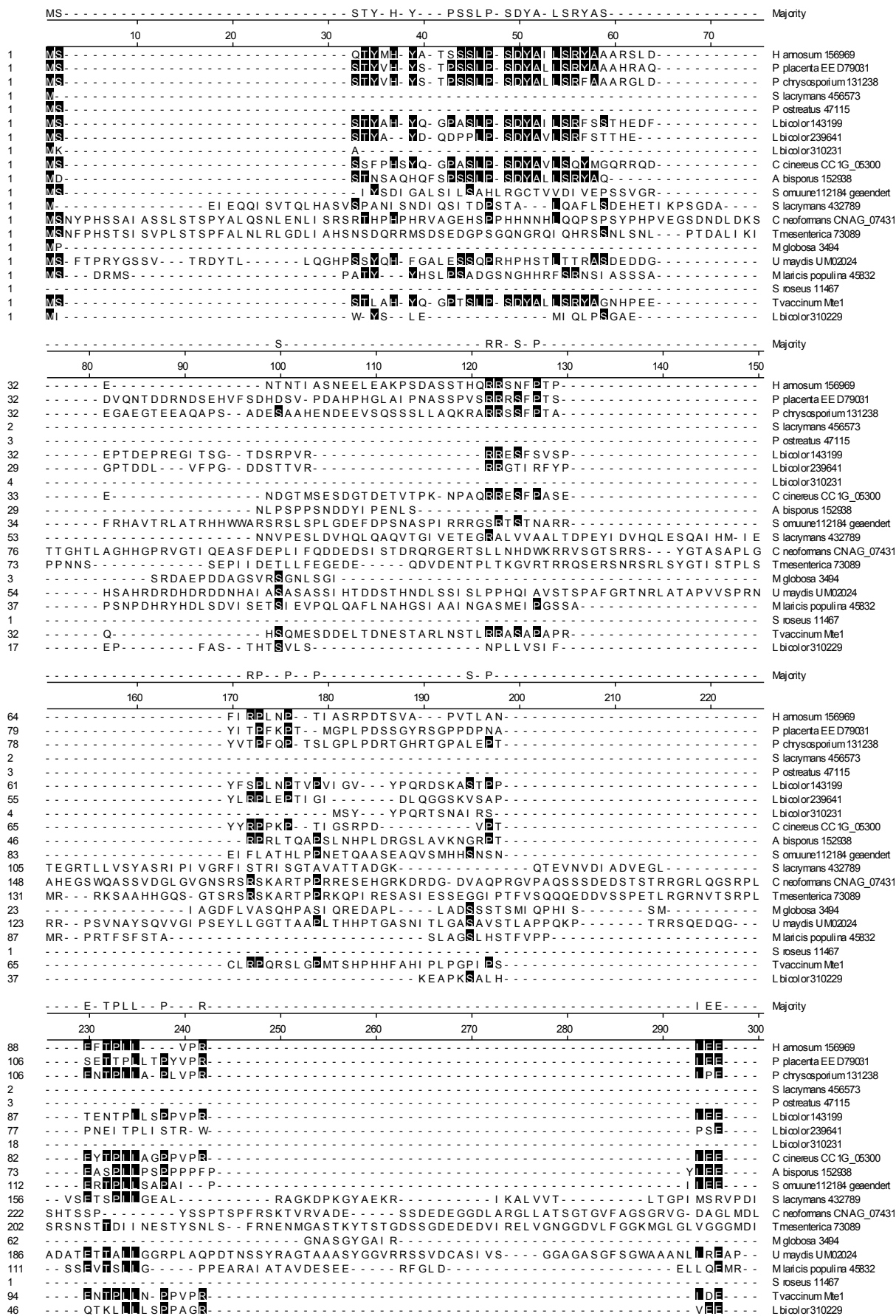
**Abb. A1 Alignment von Basidiomyceten-MATEs**

Die Proteinsequenzen wurde mittels Clustal V übereinander gelegt und anhand übereinstimmender Aminosäuren die Position des Primers bestimmt. Durch den Vergleich der Basensequenz in diesem Abschnitt wurde der degenerierte Primer abgeleitet. 1 *Coprinopsis cinereus* CC1G_05300, 2 *Laccaria bicolor* EDR01957, 3 *L. bicolor* EDR01958, 4 *Phanerochaete chrysosporium* 131238

AGATTCGATGGAGCACGAGGACACTGAAATGTCGCGCTATGCTGGGAAC

Abb. A2 Sequenz des alternativen Transkriptionsstartpunkts von *mte1* aus *T. vaccinum*

Dargestellt ist die mittels RLM-RACE-PCR ermittelte Sequenz des alternativen Transkriptionsstartpunkt von *mte1* aus *T. vaccinum*. Der Translationsstartpunkt ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, die abgelesene Sequenz wurde grau unterlegt.



LQLQRCTAFLLLLLIPIALI WWF - SESI LVRI I PEKEVA - - KLAGLYLRVLI LGAPGYALFESGKRF LQAQGLFH Majority
390 390 400 410 420 430 440 450
371 LQACRMVFLWLVLMVPLAVLWVW - SGPLIEKLVPEETA - - GLSSMLRVLLMLMPCVVAAL ESKKRFVCAACCFH Mgiisea MGG_03123.6
293 LQLCRMVFLWLVLMVPLAVLWVW - SGGVHRIDPDPDTA - - ALAGMVLRLVLLGTPEVAAF ESKKRFVCAACCFH N crassa NCU00755.3
298 LQLCRMVFLWLVLMVPLAVLWVW - GVLWLH - AEELMKFGI ARPSA - - ELAGLYLRVLI CLF SMDVAI EASKKRFVCAACCFH Mgiisea MGG_04182
305 LQLCRMVFLWLVLMVPLAVLWVW - AESLAAM - I EKDSA - - KLAAYLRVLI LCTPAVAM ESKKRFVCAACCFH N crassa NCU07720
296 LQMKMVFELWITITPLAVLWVW - ADMILRLVPRREVA - - KLACMVKVA CAPCYA CFE SSKRVMCAACCFES A fumigatus Afu6g11140
263 LQMKMVFELWITITPLAVLWVW - ADMILRLVPRREVA - - MLAGMVKVA CAPCYA CFE SSKRVMCAACCFES A niger 176833
230 IFVCRGNI ESMIFLPCAFVWVW - SSGISIKYVDDPEV - - HITQEFTRYMLL CAPCYA LFE NSKRRECAACCFE C albicans CAWG_03834
240 SYLCKRHALISVIMLPELWIFWIFGYDLICLLDDEK - - TAKLSAVMVKYTFGMBAMI LFE CKRRECAACCFE YH C albicans CWAG_05690
206 VHFIRONYLNNYPMIFVVGAPLMTLLGQDSI AMQACAKMIRI TILCLPEFI FEENAKHEATCCFHH C albicans CAWG_01291.1
112 VYFCRATLLMAMTVPLMVMVWV - SSGISINQLVDPPELV - - SMAQIFIRI HAFVCPCLIF ESKKRFVCAACCFH C albicans CAWG_02321.1
307 VHLCRGIAFSLVYIPFVMMVWV - SEPLSYLPEKELI - - NLTSRFLRVMLL CAPCYA FFENLKRRECAACCFE S cerevisiae YDR338c
244 VLVCRGAVITIFLPMVYVWFVWSEKLLALMPERE - - LCALAANYLRVTAFCVCPCLIF ESKKRFVCAACCFH S cerevisiae YHR032w
170 IYLQRGLAVLHLPVALVWV - NLEHL - - FLHODPMVAHL CCRVLRVFLAAPVAVFEAL KRYLCAACCFE S pombe SPAC323_07c
176 HLQRGLAVLHLPVALVWV - KIEGLE - - FLRQDPLTCMFAAKMVRVMMASAPVAVFEAL KRYLCAACCFE S pombe SPCC4B3_13

ASTYVLLI CAPLNALLNWLVLVWN - - I GWGFI GAPI AVAI TQWMLPLLFLVYRF - - - - - I DGRECWGGFS Majority
460 470 480 490 500 510 520
443 ATTYVLLITAPISFFINMVFVR - - FGWCEAGSASAMAVONLIDPLVLYVVE - - - - - FEGRHAWSCFES Mgiisea MGG_03123.6
365 ATTFYVLLIGAPINVLAMFFVWR - - MGCGETGAASAVFTONLDFLPELYVRE - - - - - LQCMACVNLCS N crassa NCU00755.3
370 ATTYVLLITAPISFFINMVFVR - - LMGCEVCAVSVVITONQPIHPELYVRE - - - - - VDCRYOCWCSFES Mgiisea MGG_04182
376 ATTYVLLITAPISFFINMVFVR - - VLGCEVCAVAVVITONLDFLPELYVWK - - - - - VDCRYOCWCSFES N crassa NCU07720
368 ASLFVLLIGAPINVLAMFFVWR - - VLGCEVCAVAVVITONLDFLPELYVVE - - - - - VAGSCEVNLGTS A fumigatus Afu6g11140
335 ASLVVLLIGAPINVLAMFFVWR - - FGWCEVCAVAVVITONLDFLPELYVVE - - - - - LDGSEVNLGTS A niger 176833
302 AGTIGL FVSAFNI GSWFVVMETGICYLCAPIATCFNMLMVLVLYVRY - - - - - LDGSKVFLGSA C albicans CAWG_03834
313 ISTYVLLITAPISFFINMVFVR - - IGYLCAPIAVAVNYMIFSGLIILTVFVYKPEDTSPGLHPMCAVCFES C albicans CWAG_05690
281 ASLVVLLIGAPINVLAMFFVWR - - VLGCEVCAVAVVITONLDFLPELYVWK - - - - - LDGSKVFLGSA C albicans CAWG_01291.1
184 ASLVVLLIGAPINVLAMFFVWR - - VLGCEVCAVAVVITONLDFLPELYVWK - - - - - LDGSKVFLGSA C albicans CAWG_02321.1
379 AGIYVLLITAPISFFINMVFVR - - VLGCEVCAVAVVITONLDFLPELYVWK - - - - - LDGSKVFLGSA S cerevisiae YDR338c
317 ASLVVLLIGAPINVLAMFFVWR - - VLGCEVCAVAVVITONLDFLPELYVWK - - - - - LDGSKVFLGSA S cerevisiae YHR032w
242 PITYVLLITAPISFFINMVFVR - - VLGCEVCAVAVVITONLDFLPELYVWK - - - - - SSTPIVPCFES S pombe SPAC323_07c
248 PITYVLLITAPISFFINMVFVR - - VLGCEVCAVAVVITONLDFLPELYVWK - - - - - VNGCRVAVCFES S pombe SPCC4B3_13

- K - AA - - - - FSNWGPMLKALPGMI MVEAE - WLAFEI LTLAASLYGTAALAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA Majority
530 540 550 560 570 580 590 600
506 - R - KA - - - - FRNWCPMIRLALPGMIVAEQ - FSVLELITIAAGLCTAHAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA Mgiisea MGG_03123.6
428 - R - HA - - - - FRNWCPMIRLALPGMIVAEQ - YFAFEVLTAAASQFSAHAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA N crassa NCU00755.3
433 - K - RA - - - - FRNWCPMIRLALPGMIVAEQ - WFAFEITITSGRFTSQAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA Mgiisea MGG_04182
439 - K - AA - - - - LKNWCPMIRLALPGMIVAEQ - WFAFEITITSGRFTSQAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA N crassa NCU07720
431 - N - RA - - - - FRNWCPMIRLALPGMIVAEQ - CLAFEVITASSWAGITTPAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA A fumigatus Afu6g11140
398 - T - RA - - - - LKNWCPMIRLALPGMIVAEQ - CLAFEVITASSWAGITTPAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA A niger 176833
367 SMEELF - - - - SNMNQIHLAIKCI VMMESEY - MAYEMTFASMFCTVQAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA C albicans CAWG_03834
384 IKD - AFH - - - - DWKLLVLAIGLMLAEAF - NAEITITMASNGTIAAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA C albicans CWAG_05690
346 - YRKL - YHKI - FEKHNKMLKLSVDEVLVMAE - WFAFEITITMASNGTIAAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA C albicans CAWG_01291.1
249 - WEKA - - - - SNWKPMIRLALPGMIVAEQ - FFAFEITITMASNGTIAAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA C albicans CAWG_02321.1
444 RKA - - F - - - - THWDLGHLAFSCVIMLAEAE - SYELITITMASNGTIAAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA S cerevisiae YDR338c
386 PKEQAFK - - - - NWRKMIRLALPGMIVAEQ - CLAEVITASSWAGITTPAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA S cerevisiae YHR032w
307 - RQA - - - - LKNLSPMLHFSFHGMLIVTE - WAAYEMTSGAGYVGTAPAAQSVLSTVASLTFQI PFPLSI AA S pombe SPAC323_07c
313 - REA - - - - LKNWCPMIRLALPGMIVAEQ - FELVTFASGVGCTTEASMSVSTITSTSYNLAIGVAAAA S pombe SPCC4B3_13

STRVANLI GAQLVDAAKTSAKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA Majority
610 620 630 640 650 660 670
573 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA Mgiisea MGG_03123.6
495 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA N crassa NCU00755.3
506 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA Mgiisea MGG_04182
500 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA N crassa NCU07720
498 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA A fumigatus Afu6g11140
465 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA S cerevisiae YDR338c
436 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA C albicans CAWG_03834
452 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA C albicans CWAG_05690
419 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA C albicans CAWG_01291.1
317 STRMGHFLGCDENI ASAKI LNDLTVI I GSGI CLSFCFYFGRHLVGEFHTSKDKMLV I SSKL - I LAGLNCSDS C albicans CAWG_02321.1
511 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA S cerevisiae YDR338c
455 STRVANLIGAGLVDAAKTSKVALVAGVI VGLFNMLLSSFRNVI ALLFTSDEEVI ELVAKVL - PLCAI MQI FDA S cerevisiae YHR032w
374 STRVGHMLGSRANLRLCSRVAISLALCISI DGS I FCEDRWGSLFSSPFLAVAKDIF - PLLSLFLVTDG S pombe SPAC323_07c
380 STRVGHMLGSRANLRLCSRVAISLALCISI DGS I FCEDRWGSLFSSPFLAVAKDIF - PLLSLFLVTDG S pombe SPCC4B3_13

LAASVGGLLRGQRQEI GGYVNI SYyli ALPLSFGFLAGLGW - GLFGLWI GVTI GLAVVSVVEAWYLL - - SDW Majority
680 690 700 710 720 730 740 750
647 LAASVGHILREVGRVAGGYYANFSYVVALPVSLSSTAFAAGW - KLSGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW Mgiisea MGG_03123.6
569 LAASVGHILREVGRVAGGYYANFSYVVALPVSLSSTAFAAGW - QKQWFCVAVLAVVSALELLLYYN - SDW N crassa NCU00755.3
574 VCAI SQELRQCFACYSNIISYVVALPVSLSSTAFAAGW - QKQWFCVAVLAVVSALELLLYYN - SDW Mgiisea MGG_04182
580 LAASVGHILREVGRVAGGYYANFSYVVALPVSLSSTAFAAGW - GNVGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW N crassa NCU07720
572 LAANCNEMREI GRCCEVYVQFSYVVALPVSLSSTAFAAGW - GNVGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW A fumigatus Afu6g11140
539 LAANCNEMREI GRCCEVYVQFSYVVALPVSLSSTAFAAGW - GNVGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW A niger 176833
511 IASVNSCI LRAESCKICGCI NFAYVAFAPAMVLSKIVLQ - VEGWAGVSALELLLYYN - SDW C albicans CAWG_03834
526 MNANSACLRQEQQT KGGI VNFYVVALPVSLSSTAFAAGW - GNVGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW C albicans CWAG_05690
493 LSCATACVLRQGRQCMGGI VNFYVVALPVSLSSTAFAAGW - GNVGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW C albicans CAWG_01291.1
391 UNVGTGCVLRQGRQCMGGI VNFYVVALPVSLSSTAFAAGW - GNVGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW C albicans CAWG_02321.1
585 UNAVASCRCRCMCSLCSI VNFYVVALPVSLSSTAFAAGW - GNVGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW S cerevisiae YDR338c
529 FNASTACLRQEQQT KGGI VNFYVVALPVSLSSTAFAAGW - GNVGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW S cerevisiae YHR032w
448 NAVGGLRQCFACYSNIISYVVALPVSLSSTAFAAGW - GNVGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW S pombe SPAC323_07c
454 TQCVAGLREVGRVAGGYYANFSYVVALPVSLSSTAFAAGW - KLSGLWAGLVSCAVVSALELLLYYN - SDW S pombe SPCC4B3_13

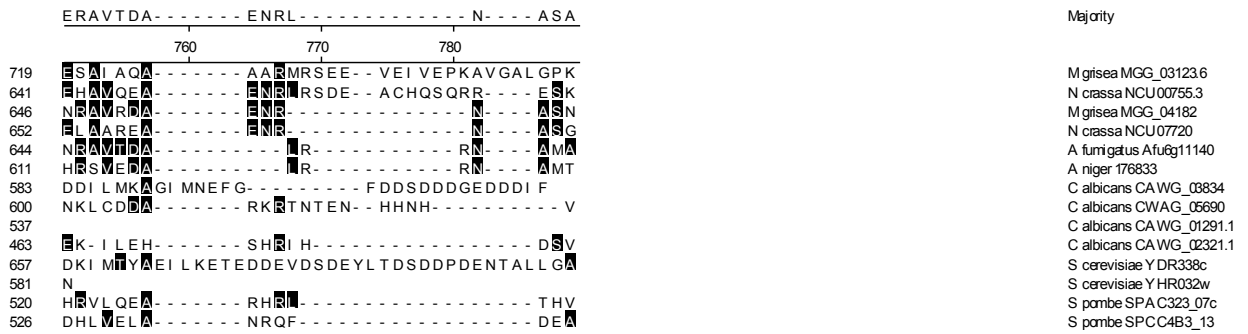
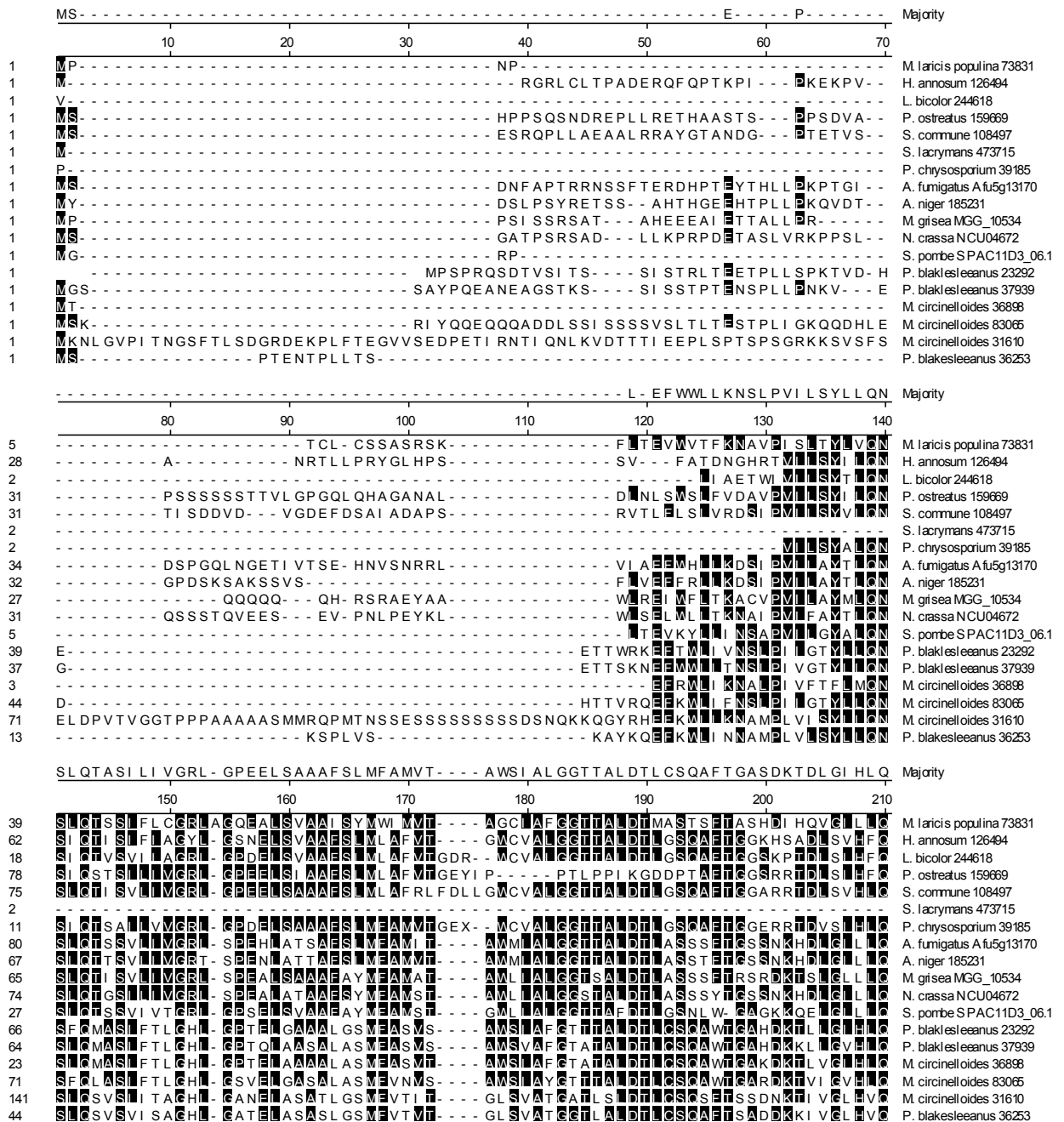


Abb. A4 Alignment der MATE-Proteine der Ascomycetengruppe



RCLLVLLWLLYI PVAVLWVFAEPI LLLALGDPELARDAGRFLRVLI PGAPGYI AFEALKKYLQAQG- - - I M Majority

220 230 240 250 260 270 280

105 R A M S L T I I Y L F G V S W W F M T L L A L C D P K L S Q D T E A F M K I S F G M L P Y W F E A V K V F V V C C - - - M M. Iariciis populina 73831
 127 R C V L L W I F V E V G I W T K S S I L L Y L C D P N L S Y D T E R Y L R I L Y G A P C Y A F E S L K K Y C C C - - - M H. annosum 126494
 85 R C N I L W S L E E V A L W A E I P I L L S C D P P A L S R V Q Q Y R V L I F G A P C Y G E F S L K K Y C C C G S R M L. bicolor 244618
 142 R C V L W T L I E V C V A M A E M P L L L R C C T E A L S K G V Q Q Y R I L I G A P A Y G E T T K K Y C C C - - - M P. ostreatus 159669
 144 R C V V L W I F V E V A M W F W I E V L L S C D P V A I C R T Q R E L R V L V G G P C Y A F E S L K K Y C C C - - - M S. commune 108497
 2 R C I F L W L F A V V A V W I Y A P V L L A F C G A E R L S R V Q A F L R I L I G A P C Y A F E S L K K Y C C C - - - M S. lacrymans 473715
 145 R G F V L G L F V E V A I W A C S E H V F V F L C D Q V L S R E S A F E L T C L P C G L G Y Y E E V M K K Y C A C C - - - M P. chrysosporium 39185
 132 R A F F V L G F V E V A I W T C S E P V F L C D P Q I S R S A F E L T C L P C G L G Y Y E E A M K K Y C A C C - - - M A. fumigatus Afu5g13170
 130 R G F V I T A Y A V V V V W A E D V F R A C P E E I C V M S A F E L R L A B C G L C Y V W E C M K F C A C A - - - Y A. niger 185231
 139 R G L A V L S A Y V M A L I W T S E P L F R V C E E Y I C V Q S A M E L R R L P C G L G Y W E E C M K F C A C E - - - Y M. grissea MGG_10534
 91 T G F I V S I L Y I C L V W Y S K P I L I F H C T P E L A E A S Q K F L R Y L P C G L C Y V C E L K K F C A C E - - - V S. pombe SPAC11D3_06.1
 131 R A I M I L A I M F E I G I M N A T G L L S N C E P D I A F R A C Q E L R Y L I G A P A Y T E R A T K K Y C A C C - - - M P. blakleeianus 23292
 129 R A I I L A M F E I A V I M N A T R L L A C E E E R A L H A C M E L R V L I G A P A F A F E A V K K F C A C C - - - M P. blakleeianus 37939
 88 R A I C I L G M F E I A V V M N C T K L L S N C D P E L A L H A C L F L R C M L G A P A F A F E A T K K Y C A C C - - - M M. circinnell oides 36898
 136 R A Y M A L F E V I A C V M L N A T P I M K F N C D P E L A E F A L F L R Y L R C A P A Y A F E A T K R Y C A C C - - - M M. circinnell oides 83065
 206 R C L A F M S I Y E I V G I W H A H F L L R C D P V A Q L A C H Y V R W M L L A P A F A L F E A L K K M C A C C - - - F M. circinnell oides 31610
 109 R C L A F I S V I Y E I V C V W W A E S V F L L R C D P E V A R L A C Y V R W M L L A P A F A I F E A L K K M C A C C - - - F P. blakesleeianus 36253

R A S T Y V L L I T S P L N L L L N Y L L V H Y - - T G L G L L G A P L A T S I S Y W L S F L L L V L Y I R - F V K G H E - - - A W G G W S Majority

290 300 310 320 330 340 350

172 H A S T I V L V V S E I N V F L N W F C I S K - - L E L G F R C A A L G I M T Y W A F L M I C V L G K - T M G C G K - - - A M C C M S M. Iariciis populina 73831
 194 A L S T I V L C V S E V N V L N I A M I H Y - - T P R I W G S A V A L T I T Y W S E G I L T F T I - Y S P V H R N K T W C C I R H. annosum 126494
 155 G A S T I I A V S E I N I L H L W I H H - - T S I C I G S P A L S I T Y M C E L I G V L T Y - E S Q K H R E N G T W C C I R L. bicolor 244618
 209 G A S T I V L V S E V N I N I Y T H Y - - T S G L W G S A T A L S V T Y W F A I L L L V T A - R S K I H K R N G T W C C I R P. ostreatus 159669
 211 S L S T I V L V M C V N I A N I A F M H Y - - T S I C I G S A V A L C A T Y M C E L I C I F T Y - E S P T H D K N G T W C C L Q S. commune 108497
 49 R T S T I V L I M A I N I M I V M H H - - T S G L G S P A L S F T Y W S C E F L L V I F T S - L S P T H K S H G T W C C L Q S. lacrymans 473715
 145 R A S T A V L I A V L E V N V L N I M V H H - - T P R F L G S P A L S L S Y W A F L L V I V T R - L S P A H Q R N G T W C C L D P. chrysosporium 39185
 212 R P G T Y V L I T S E F N A L N Y F C Y T - - F K M G L L G A P A T G I S Y W S E A L L V Y A R - F I A C S E - - - C M C C M S A. fumigatus Afu5g13170
 199 R P G T Y V L I T S E F N A L N Y F C Y T - - F R M C L C A P A T G I S Y W S E A L L V Y A R - F I A C S E - - - C M C C M S A. niger 185231
 197 R P G T Y A L M L T S E F N A L N Y I Y K - - L D M G L D C A P A T G I S Y W S E F F L V G A V - F V Q C S - - - C M C C F D M. grissea MGG_10534
 206 R P G T Y V L I T S E F N A L N Y F I H K - - L G C L H C A P A T G I S Y W C S E F L L V A Y A T - F V R C H E - - - C M C C L S M. crassa NCU04672
 158 R A G S Y I L L V S E L N V A N F L V H Y - - Y E G L K C A P A T G L S Y W S E I L L T Q Y A K - Y V K G A E - - - A M C C W N S. pombe SPAC11D3_06.1
 198 R A S T Y V L M V A S E I N G N Y M M Y - - P L C I C F I C A P A T S L S Y W I M L G I L L Y R - F V A C S E - - - A M C C M S P. blakleeianus 23292
 196 R A S T Y V L F A A E I N I M N A F Y Q E P F N C F I C A P A T S Y S Y W M L L L G Y R W S K A S - - - A M C C W T P. blakleeianus 37939
 155 Q A S T Y V L M V S E I N C N Y S F Y L A P F K C F I C A P A T S F S Y W M L T L L V Y I K - F V N C K E - - - A M C C G I M. circinnell oides 36898
 203 H A S T C S M V I A E I N F V N M F Y - - T E M C F I C A P A T S F S Y W I M E L L L A Y K - F V K G E - - - G M C C M S M. circinnell oides 83065
 273 R A P T V L M V A T E I N L L A M V I P A T S F C F S C A P M A S C L S Y W I V I M A Y I Y W - V D C Y Q - - - A M P A M S M. circinnell oides 31610
 176 R A P T V L L M G A E I N I L S V L M W S S T L C E G F S C A P A S C L T Y W I V I F M A Y I Y R - V D C Y Q - - - V M P A M S P. blakesleeianus 36253

L R A A F E L R G W - P F L K L A I P G I L M V G T E W W - - A F E I V A L A A G R L G T V P L A A Q S V I M T T D Q I L N T I P F G I G V Majority

360 370 380 390 400 410 420

236 - R Q C F K S L W - P M F K L S I S E F V M V G T E W A - - F E I V A L A A C R C H V S A A C S V I M T T D Q I N T I P F C L C V M. Iariciis populina 73831
 261 R A V F F Q S C V L F K I A L P E I M V G T E W - - A A F E V A A A C R C H V S A A C S V I M T T D Q I N T I P F C L C V H. annosum 126494
 222 R G E V L S F T S C Y G F Q I A L P E I M V G T E W - - A A F E V A A A C R C A M P A A C S V I M T T D Q I N T I P F C L C V L. bicolor 244618
 276 P R L V L H R S C Y T F K L A L P E I M V G T E W - - A A F E V A A A C R C E P T S A A C S V I M T T D Q I N T I P F C L C V P. ostreatus 159669
 278 P S L F H A R S C Y T F R I A L P E I M V G T E W - - A A F E V A A A C R C E I P A A C S V I M T T D Q I N T I P F C L C V S. commune 108497
 116 P K V L D G S C Y T F K I A L P E I M V G T E W - - A A F E V A A A C R C E L S A A C S V I M T T D Q I S I T I P F C L C V S. lacrymans 473715
 212 A T V L D F S S C I E F K I A L P E I M V G T E W L A A A F E V A A A C R C A L P A A C S I M T T A D Q I N T I P F C L C V P. chrysosporium 39185
 276 - R E A F N N L C - T E A R A F L C V I H V C T E W A - F E I V A A A C R C E I P A A C S V I M T A D Q V N T I P F C V G V A. fumigatus Afu5g13170
 263 - R K A F E N L C - T E A R A F L C V V H V C T E W A - F E I V A A A C R C E I P A A C S V I M T A D Q V N T I P F C V G V A. niger 185231
 261 R R R A T N V C - E E A R A A L C V V H V C T E W A - F E I V A A A C R C E I P A A C S V I M T A D Q I N T I P F C L C V M. grissea MGG_10534
 270 P H R A L S N I C - P F I R L A L L C N I H V C T E W A - F E I V A A A C Q C E I P A A A C S V I M T A D Q I N T I P F C L C V M. crassa NCU04672
 222 - K R C L E N F C - P F V K L S L C I V M V G T E W A - F E I V A V A C K C A T I P A A C S V I M T T D Q I N T I P F C L C I S. pombe SPAC11D3_06.1
 262 R E S - - - L E G W S E F K I A L P E I M V G T E W - - S E E L C A A A S Y S I V D I A A C S I L L I T I S A T Y I T I P F C L A I P. blakleeianus 23292
 263 R E C - - - L T C W E F R I A A P V M V C S E W - - A F E L A A A A S Y C T I W D I A A C S I V L T S G S A A Y T I P F C L S I P. blakleeianus 37939
 221 R E C - - - L T C W E F R I A A P V M V C S E W - - A F E L S S A A S Y S T R D L A A C S I V L T T A S A T Y I T I P F C V S I M. circinnell oides 36898
 267 R E C - - - L K D W E F I K L A S S C I V I I C A E W T - - A F E V S S A A S Y C T I D L A A C S I L L I L S S A T Y I T I P M C I A V M. circinnell oides 83065
 339 T S A E N M H W G E M A K I A P E I L I C H E T W - - A Y E I A F G A S W I D I P N I G A M S I L L I S I T A Y I L A E C V C I M. circinnell oides 31610
 242 T R Q A E F W R A G E M S R A I P E I L I C H E T W - - A Y E I A F G A S W I D I T S I G A C S V L T S I T A Y I L A E C V C I P. blakesleeianus 36253

A A S N R V G N L L G A R D A K G A R R A A H A A A L L S V V V G G L V M A V L M A T R D V F G Y L F S D D E D V V R L V A K V M P L V A L Majority

430 440 450 460 470 480 490

301 S A S A R I C H L L C A R Q P N R A R C A G S A A V F L A T L V C C S V T I L L M S N R N R C S F F T K D E V I R L V T D V L P Y V A A M. Iariciis populina 73831
 329 A A S I R V C N I C S K D A P C A K L A G H M S A Y M S V I A G S I V V M I C A K D V Y C Y I E S D E E V I R V S Q V M P L V A S H. annosum 126494
 290 A A S T R V C N I C E S N A S C A K H A A H A S A M S M I V C A L P V A M I A F K D V Y C Y F E S D R K R V L V S K M M P L V A S L. bicolor 244618
 344 A T S T R V C N I L G N R S A I D A K R A A H A S A F V S V V G A L V T A M L L K D V E G Y M E S D D E H V V T L V A R V M P L V A S P. ostreatus 159669
 346 A A S A R V C N I C A R S A S C A K H A A H A S A L L S V M V G V V V M T M I A A K D V E G Y F E S D D E A V V K V S R V M P L V A S S. commune 108497
 184 V A S N B I C N I C A R T A T G A R R A A H A V A N A V L V C L V I M A M L A A K D I E G Y I E S D R O R V V N V S K M M P F V A S S. lacrymans 473715
 282 A A S T R V C N Y I C E S S A A L A K R A S H M S A F S V I M C F V A S L V T K N W E G Y F E S D E P R V R V S K M M P L V A S P. chrysosporium 39185
 341 A A S A R V C N I C A R D A G C A A R A A N T A A W S M M L C C V L A V L M G T R D D E A R I E N D E G V V R T A E V L P Y V A A A. fumigatus Afu5g13170
 328 A T S S R V C S I C E S D A A C A S R A A N T A A W S M A L C C A M L A V L M G T R H W A K I E N S R E G V V Q T A E V L P W A L A. niger 185231
 327 A E S A R V C N I C A G D V R C A R R S A H S A A I S M V F G T L L V M A A R H V R G A E N D R E Q V I A V A E V P Y V A A M. grissea MGG_10534
 336 A A S R V C N I C A R K V K E A S R A S H C A V V S I V A G A I L T M S V K V D V G R L E N D E R V I R V A D V M P F V A L M. crassa NCU04672
 287 I T S N R V A Y L C A G L P D N A S L T A K V A I V G V A V C S V I M T M I A V R N I Y C R I F T N P D V I Q V A L V M P L V A A S. pombe SPAC11D3_06.1
 327 A A S N R V C N I C E A K A K K A R C A T I V A M I Y A M I F G S N S I M A T R S W E G Y F E T S E D E V N R V A S I I P M C A P. blakleeianus 23292
 328 A A S N R V C N A C E G N A Y K A T A S K M A M V F A A F A S I N S L I F F M S T R K H E G Y M E T S R P E V M A V A S I L P C A F P. blakleeianus 37939
 286 A A S N R I C N S C E S N A I K A R R A S V V A I M F A I F F C F T N S T F F M A V R S K E G Y L E T E A D V V E L V S K I M P L C A M M. circinnell oides 36898
 332 A A T N R V C N A L C G S F S N R A V A S H T A L F A I V G L I N S T F L V T R L C Y L F S D P D V I D M V A R L P L C A I M. circinnell oides 83065
 407 A S A N R V C N I C A Q R P Q Q A R I A V R T T L C V A T G F A I N S L A L V F R K W A Y I F T S D A E V A Q V T N V L P V A I M. circinnell oides 31610
 310 A S A N R V C N I C A Q R P Q Q A R I A A I T A I Y A A M L V A G N S L L L V F R H K W A Y M E T S P R M V S A V A K L L P W A I P. blakesleeianus 36253



Abb. A5 Alignment der MATE-Proteine der allgemein pilzlichen MATE-Gruppe

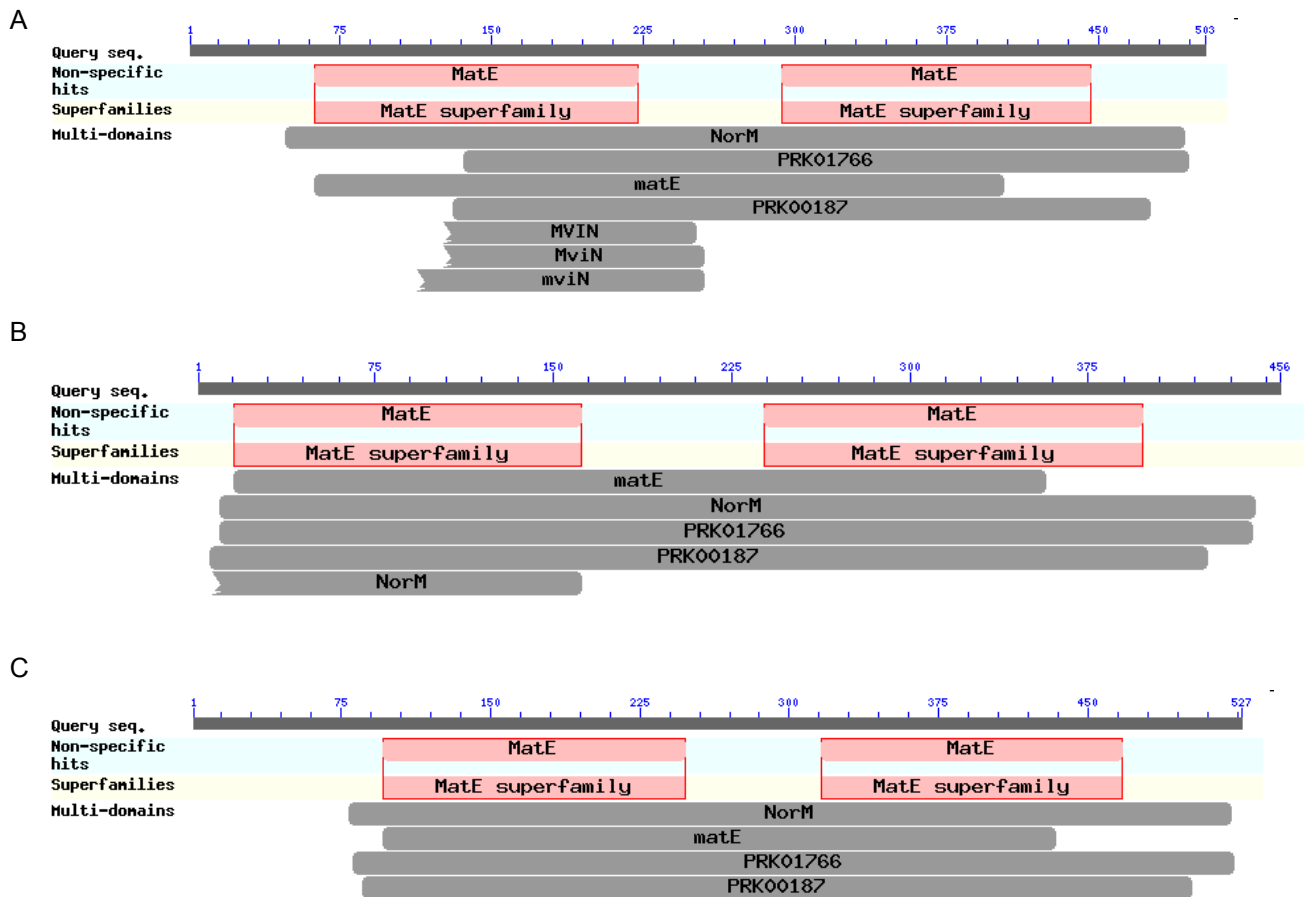


Abb. A6 Konservierte Domänen der Konsensussequenzen

Die Domänensuche erfolgte über ein Proteinblast in NCBI. Dargestellt ist die Lokalisierung der Domänen in der Konsensussequenz. A Basidiomyceten-Gruppe, B Ascomyceten-Gruppe, C allgemein pilzliches MATE

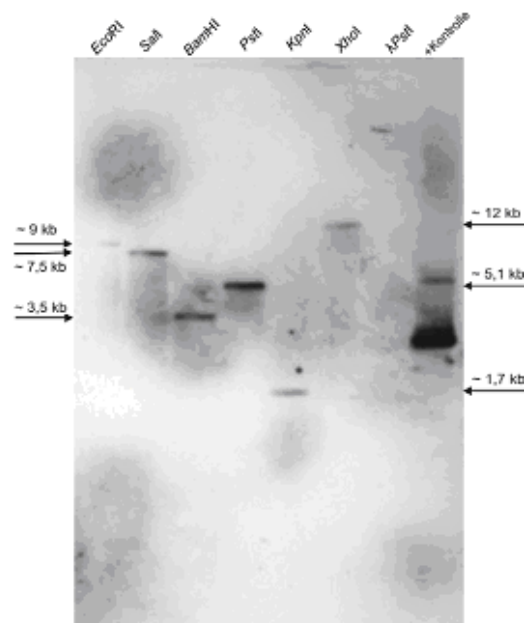


Abb. A7 Kopienzahl der MATE-Gene in *T. vaccinum*

Genomische DNA von *T. vaccinum* wurde isoliert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Nach der Gelelektrophorese wurden die Fragmente auf eine Membran übertragen und mit dem Fragment KI5r8-26 als Sonde unter nicht stringenten Bedingungen bei 55°C hybridisiert.

M-----PTEYTSLLPKPTD-D-----S--D-----LTEF Majority
10 20 30 40 50 60 70
1 V-----
1 MSES RQPLL-----AEAAL RRAYGTANDGPTETVSTI SDDV DVG-----DEF DSAI ADAPS R---VTL F 1
1 P-----
1 MY-----SSI HTTAPGPE-----YDSPT PTEYTSLLPKPTD-DLFPDSL SSRDAEVT D HDSR KAI LAEF 2
1 MY---DSLPSYRETSSAH-----THEEHTPLLPKQVDPDP-----DSKSAKSSVSFLVEF 3
1 M---YRQRSPRYGDT PNI E-----EEPT EYTSLLPKPTD DLSSEDP-GCYE SHDS DDEGW RQY LTEL 4
1 MWL MPLPPARFSFALT VDRMRNEPDDI RNMDADG PDEYTSLLPTPI DI DSSRGLLDDAQSKDE DGP NRRLI I EEF 5
1 M--T-----SNTF--E-----EDPT EYTSLLPKPTD HRAYD DS-DEYDTSQ-----RQWLA EF 6
1 M-----SGAT PPRSADLLKPRPDETASLVRKPPSLQSSSTQVE--ESEVPNL PEYK LWSL 7
1 M-----GR-----LITEV 8
1 M-----GR-----LITEV 9
1 M-----GR-----LITEV 10

WLL LK GSI PVI LAYTLQNSLQTVSVLI VGRLSPEELATAAFSLMFAMVTA--WMI ALGGTTALDTLASSAFTGSS Majority
80 90 100 110 120 130 140 150
2 --LIAETW VILSYTLQNSLQTVSMV IAGRLG PDEL SVAAFS LMLAFVT GDRWCVALGGTTALDTLGSQAFTGGS 1
57 LSLV RDSI PVLISYVLQNSLQTI SMLIVGR LGPEEL SAAAFSLMLAFVTG--WCVALGGTTALDTLGSQAFTGGA 2
2 -----VILSYA LQNSLQTSALIVVGR LGPEEL SAAAFSLMFAMVTGEX WCVALGGTTALDTLGSQAFTGGE 3
59 LLLKSSV PVI LAYALQNSLQTVSMV IAGRLG PDEL SVAAFS LMLAFVTG--WCVALGGTTALDTLGSQAFTGGS 4
49 FRLLKDSI PVI LAYTLQNSLQTVSMV IAGRLG PDEL SVAAFS LMLAFVTG--WCVALGGTTALDTLGSQAFTGGS 5
59 WILFKGSI PVI LAYTLQNSLQTVSMV IAGRLG PDEL SVAAFS LMLAFVTG--WCVALGGTTALDTLGSQAFTGGS 6
76 WHLLKGSV PVI LAYTLQNSLQTVSMV IAGRLG PDEL SVAAFS LMLAFVTG--WCVALGGTTALDTLGSQAFTGGS 7
44 WILKGSV PVI LAYTLQNSLQTVSMV IAGRLG PDEL SVAAFS LMLAFVTG--WCVALGGTTALDTLGSQAFTGGS 8
56 WLLTKNAI PVI LAYTLQNSLQTVSMV IAGRLG PDEL SVAAFS LMLAFVTG--WCVALGGTTALDTLGSQAFTGGS 9
9 KYLLI NSAPVILGYALQNSLQTVSMV IAGRLG PDEL SVAAFS LMLAFVTG--WCVALGGTTALDTLGSQAFTGGS 10

NKHD LGI LLQRGFVLSLLYVPVAILWAFSEPVFLLLGQDPQLSRDSARFLTCLIPGGLGYIYFELMCKKYLQAQG Majority
160 170 180 190 200 210 220
75 KPTDLSHFQRCLIIWSLIPVALVWAFI EPI LLSLGGPALS RDVQQFLRVLI F GAP GYI GFESLKKYLQCG 1
130 RRTDLSVHLQRQCVLLWLFVFPVAVLWFWI EPVLSLGGPVAI CRDTQRFLRVLI VGGP GYI AFESLKKYLQCG 2
68 RRTDVSILHQRCLIFLWLFAPVAVLWYAYPVLLAFGQAERL SRDVAQFLRI LII GAP GYI AFESLKKYLQCG 3
131 DKRNLGILLQRGFVLSLFIYPVAVLWIFSEKVFLLGGDADLSKDSAQFLTALI PGG GYI YFELMCKKYLQAQG 4
122 NKHD LGI LLQRGFVLSLFIYPVAVLWITCSEPVFLLGGDPQLSRDSARFLTCLIPGG GYI YFELMCKKYLQAQG 5
132 NKHD LGI LLQRGFVLSLFIYPVAVLWACSEPVFLLGGDPQLSRDSARFLTCLIPGG GYI YFELMCKKYLQAQG 6
149 NKHD LGI LLQRGFVLSLFIYPVAVLWASSEHVFLLLGGDADLSKDSARFLTCLIPGG GYI YFELMCKKYLQAQG 7
117 NKHD LGI LLQRGFVLSLFIYPVAVLWACSEPVFLLGGDPQLSRDSARFLTCLIPGG GYI YFELMCKKYLQAQG 8
129 NKHD LGI LLQRGFVLSLFIYPVAVLWITFSEPLFRV LGGEEYI CVQSAMFLRRLI PGG GYI WFECKKYLQAQG 9
81 KQELGILLQTFGLVLSLFIYPVAVLWITFSEPLFRV LGGEEYI CVQSAMFLRRLI PGG GYI WFECKKYLQAQG 10

---IMRPGTYVLLITSPFNALLNYLFCHTFGLGLLGA PLALGI SYWLSFALLVLYARFVAGSE---CWGGWS-RE Majority
230 240 250 260 270 280 290 300
150 GSRIMGASTIILAIVSPI NILLHLWLIHTS LGLGSPALSLTYM CELLGLVLTYSQKHRENGTWGGI RLGE 1
205 -----IMCPVNI ALNI AFVHYTS LGLGSAVALCATYML CELLFCI FTYSPTHDKNGTWGGI QPSL 2
143 ---IMRSTAVLI AVL PVN LNI LLVHHTPLRFLGSPALSLSYWLAFFLLVIVTRLS PAHQNRNGTWGGI DLAT 3
206 ---IMRPGTYVLLITSPFNALLNYLFCYTKLGLDLGAPALGLSYWLSFALLVLYARFVAGSE---CWGGWS-RE 4
197 ---IMRPGTYVLLITSPFNALLNYLFCYTFRMGLGAPFATG LSYWLSFALLVLYARFVAGSE---CWGGWS-RK 5
207 ---IMRPGTYVLLITSPFNALLNYLFCYTFMGLGAPFATG LSYWLSFALLVLYARFVAGSE---CWGGWS-RE 6
224 ---IMRPGTYVLLITSPFNALLNYLFCYTFEMGLGAPFATG LSYWLSFALLVLYARFVAGSE---CWGGWS-QE 7
192 ---IMRPGTYVLLITSPFNALLNYLFCYTFENMGLGAPFATG LSYWLSFALLVLYARFVAGSE---CWGGWS-RE 8
204 ---VYRPGTYVLLITSPFNALLNYLFCYTFHKLGLGLHGA PLATG LSYWLSFALLVLYARFVAGSE---CWGGI SPHR 9
156 ---ITRAGSYI LLVITSPFNALLNYLFCYTFHKLGLGLHGA PLATG LSYWLSFALLVLYARFVAGSE---AWNGWN-KR 10

ALENL G--TFARLAI LGI HVGT EWWA--FEI VALAAGR LGTI PLAAQSVI MTADQV LNTI PFGVGVAT SARVGN Majority
310 320 330 340 350 360 370
225 VLSFTSCYQFLQLA PGLMVGTEW--AAFEI VALAAGR LGAVPLAAQSVI MTTDQI LNTI PFGI GVAASTRVGN 1
267 FFEARSCAI FLRLAL PGLMVGTEW--AAFEI VALAAGR LGELPLAAQSVI MTTDOV LNTI PFGI GVAASARVGN 2
215 VLD FSSCI EFLKLA PGLMVGTEWLA AAFEI VALAAGR LGALPLAAQSVI MTTADQI LNTI PFGI GVAASTRVGN 3
274 ALTNLQ--TFSR LA LGVVHVGT EWWA--FEI VALAAGR LGTIP LAAQSVI MTADQV LNTI PFGVGVAT SARVGN 4
265 AFENL G--TFARLAF LGVHVGT EWWA--FEI VALAAGR LGTIP LAAQSVI MTADQV LNTI PFGVGVAT SARVGN 5
275 AFONL G--TFARLAF LGVHVGT EWWA--FEI VALAAGR GTI PLAAQSVI MTADQV LNTI PFGVGVAT SARVGN 6
292 AFKNLR--TFARLAF LGVHVGT EWWA--FEI VALAAGR GTI PLAAQSVI MTADQV LNTI PFGVGVAT SARVGN 7
260 AFONL G--TFARLAF LGVHVGT EWWA--FEI VALAAGR GTI PLAAQSVI MTADQV LNTI PFGVGVAT SARVGN 8
273 ALSNI G--PFI RLAL LGVHVGT EWWA--FEI VALAAGR GTI PLAAQSVI MTADQV LNTI PFGI GVAASARVGN 9
224 CLENFG--PFVKLSL LGVHVGT EWWA--FEI VALAAGR LGAVPLAAQSVI MTTDQI LNTI PFGI GVAASARVGN 10

LLGARSASGAARAANA AAWLSVILGGVVLAVLMGT K--HVF GKI FNSDERVVRLVADVLP LVALFQI ADGLNGSC Majority
380 390 400 410 420 430 440 450
298 LIGSRNASGAKHAAHASALMSVIVGALVMVAMI AFKDV--YGYFSDDKDVVLLVSKVMP L VASFQVADGLAGSC 1
340 LIGARSASGAKHAAHASALMSVMVGVVVMVTMI AAKDVQVFGYLFSDDEAVVKLVSKVMP L VASFQVADGLAGSC 2
290 YIGSRSAALAKRASHMSAFLSVIVGGVFMASLVTKNV--FGYLFSDDEAVVKLVSKVMP L VASFQVADGLAGSC 3
345 LLGAKDAKARRAANVAWLSMILGLVVLVAFMGT K--HFEAKIFNSDPRVVS L T SAVL P VVALFOI ADGLNGSC 4
336 LLGSRDAAGASRAANTAAWLSMALGGAVLAVLMGTR--HFEAKIFNSDEGVVQLTAEVLP VVALFOI ADGLNGSC 5
346 LLGSRNAPGAAKAANTAAWLSL LGGVVLAVLMGTR--HFEAKIFNSDERVVRLTADVLP VVALFOI ADGLNGSC 6
363 LLGSRSATCAARAANTAAWLSMLGGVVLAVLMGTR--HFEAKIFNSDERVVQLTADVLP VVALFOI ADGLNGSC 7
331 LLGARNASGAARAANA AAWLSMVLGGVVLAVLMGTR--HFEAKIFNSDERVVRLTAEVLP VVALFOI ADGLNGSC 8
344 LLGARKVKEASRASHCAVLSIVAGALILT V LMSVK--DFGRLFNDDERVI RL VADVMP VVALFOI ADGLNGSC 9
295 YLGAGLPDNASLTKVAAI VGVAVGSMI MITMI AVR--NIYGRIFNDPDI QLVALVMP VVALFOI SDLSLNGTM 10

	GGSLRGMGRQHV	GALVNLVSYYCGAL	PLGIWLA	AFHGW	--	GLKGLWVGQC	VALYLVGAL	EWAIV	-	ALSDWDKEVD	Majority				
	460	470	480	490		500	510	520							
371	GGVLRGQGRQHL	GALFNI	VAYYYVLA	ALPMGLT	LAFHPRADL	GLQGLWV	GQVVALFI	VGI	GEYCV	VWLGT	DWEKEVQ	1			
415	GGVLRGQGRQHL	GAVFNL	VAYYYVLA	ALPMGVSL	AF--KTSL	GLQGLWV	GQVVALFI	VGI	GEYLT	VWLWT	DWDKEVR	2			
363	GGVLRGQGRQHL	GALFNI	AYYYVLA	ALPMGLT	LAFNSRTHM	GLQGLWV	GQVVALFI	VGF	GEYAV	VWLGT	DWDKEIQ	3			
418	GGSLRGMGRQHV	GAAVNI	VSYYCGAL	PLGVYL	AFHGW	--	GLKGLWVGQC	VALYLVGAL	EWVI	V-	AASDFKEVR	4			
409	GGSLRGMGRQHV	GALVNL	ASYYCGAL	PLGIWLA	AFHGW	--	GLKGLWVGQC	ALYLVGAL	EWI	V-	AFSNWEGEVD	5			
419	GGSLRGMGRQHV	GAMVNL	VSYYCGAL	PLGIWLA	AFHGW	--	GLKGLWVGQC	ALYLVGAL	EWMI	V-	ALSNWNKEVD	6			
436	GGSLRGMGRQHV	GAMVNL	VSYYCGAL	PLGIWLA	AFHGW	--	GLKGLWVGQC	ALYLVGAL	EWVI	V-	VLSNWDKEVD	7			
404	GGSLRGMGRQHV	GAMVNL	VSYYCGAL	PLGIWLA	AFHGW	--	GLKGLWVGQC	ALYLVGAL	EWAI	V-	ALSHWDGEVE	8			
417	GGVLRGT	GROVGA	VNLVSYYG	ALPTGI	YLA	AFHGW	--	GLRGLWV	GQCVALYLV	GVLEWL	V-	GMSNWEDEVK	9		
368	GGALRGT	GROKVGAI	VNI	TAYYL	FALPLGI	YLA	AFHGK	--	GLVGLWV	GQVIALSI	VGI	LELKI	V-	MATDWISQSR	10
	KAI SRMDAHERLEA-----G-----														
	530	540	550	560								Majority			
446	LGI	ERTGAT	PNFTSL	-----	REFRDEAYT							1			
488	KGL	ERNEAE	KARAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2			
438	KGL	ERNKE	QAKI	RAL	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3			
489	KAF	KRMD	-----	E-----	AAYAE	EEEEG	-----	-----	-----	-----	-----	4			
480	KAF	QRMDI	HDRL	EV-----	CHTTNGATT	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5			
490	KAF	SRMDV	HERLE	D-----	G-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	6			
507	QAF	QRMDV	HERLE	T-----	G-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	7			
475	KAF	L	RMDI	HERME	V-----	GGI	AEGE	-----	-----	-----	-----	8			
488	RAI	SRL	DDGGF	GDSSAHVYAY	CAI	GEGQADEAL	GERHREGREP	V	-----	-----	-----	9			
439	KAI	SRF	GDSS	ELT	ALLN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	10			

Abb. A8 Alignment 2. MATE-Protein von Basidiomyceten

Die Proteinsequenzen wurde mittels Clustal V übereinander gelegt und anhand übereinstimmender Aminosäuren die Position des Primers bestimmt. Durch den Vergleich der Basensequenz in diesem Abschnitt wurde der degenerierte Primer abgeleitet. 1 *Laccaria bicolor* EDR13880, 2 *Schizophyllum commune* 108497, 3 *Phanerochaete chrysosporum* 39185, 4 *Aspergillus nidulans* An6870.2, 5 *A. niger* An14g05970, 6 *A. oryzae* XP_001824163, 7 *A. clavatus* XM_001274594, 8 *A. terreus* XM_001215371, 9 *Neurospora crassa* NCU04672, 10 *Schizosaccharomyces pombe* NP_592803

```
TGGCGCTGGAGTTTTCGCCAGTTCCTCCGTCGACGATCTCTTCGGCGAGTTCATTATTGAGGATGAGCACGCC
GCCAGTGAAGACGCCGATGACGAGCACGAAGCAAACGAGGAAGATGGGCACGATGAAGGCCGGTGTGGCGGTG
TAGTCTGTCCGGCGCTCGAGATGCATCCTGGGCGGTTAGTTTGTGCTGGAAGGCAAGTGCCCTTATGATGGCC
AGAGACAGGCGCCGGTTCAGCGGATGTTGAACGGCCTTCCATCACGCGGGATGACGCGCATGGCCGGGCGTGAC
GCGGACGACGCGCCGGTCCAAGCGTAGCGCCCCCTTACC TAAAAAGGAAGCGATCGCCCGGTACCTGTTCCGCG
GCAGCCCCGAGTTGGCCGCAGAGTTCGCCGCCGTTTCGACAGGTTGACCGCCGACCAAGGCGCCTGACTCTGC
AGCCAGCCCAAGACCCGGGCGTGTACAGCCCTCTGACTCGTCGAGAGTCC TCAAAGCCCTCCCCCTCGTGTCT
CACGACCTCACGAACGGAGAATAGGAGCCGCACGAAGTTTGTGACGAACCCACCGCGATAGCGCAATACCTTAG
CTCCCACCGCCATGTCTCTCGACATACGCACACTATCAAGGACTGCGGGCTCCCTCCCCCAGGACTACGGCAT
CCTCTCCCCTCCTTCGGGCACCGAGAGCTCCAGCCTCCGGCCCCCCCTCAC TGGCACCTCGTGACGAGGAACCC
GATGAAGGGGACGAGCACAGGGCTACAGATCTCTGAAATCGGCCCCACGAATGATGGCACATGGCGCCCCCG
GGCCCTGCCTTTTTTTGGAAGAAATGATGGCAAGGTGTTGGCCAGGCCAGCGACTCGACTTGCAGCCTGAGGT
CAGTGGTCAGTAACCGGGCCCTCCAGAAATCGGGAGCTGTAAGTACTAGCTGGACTGCATAGAGTAGTAAAAAAGT
CGTAAACCTTACAGTTTACAACCTTCTACGTGATTTTTGTTCAGGGCAGTGGCCGACTCGTTGCGGCTTGGCT
GCGACATTGACAAGGGCGGCGAGCAACTCTCGCTCGAGTGGGACTTACATGATCCCGGTAAGAGTCCATCACA
GATTAGTGTCTCGAGACCAGGAATGAACGCGCAGGAACCAATGCATGGACCTTCGACTGCCGCCACCTCTGC
CGTCTCGCATGTAGTAATATTGGTCTTTGTCTGCGCTTTTTCGCAAGTGAACATTCATGAGTATATATTCAGA
TATCGGACCCCTTCCATCCTCTCCGCGCACCTTCGAGGTCGACAGTCTGACATCGTTCGACATCGTTGAACCCAGCAGC
GTGGGCCGCTTTTCGGCACGCGTACGAGGCTCGCCACGCGACATCACTGGTGGGCCCCGATCCAGATCTCTGT
CACCTCTTGGGGACGAGTTTCGATCCGAGCAACGCCCTCCCCGATACGCCCGCTGGCAGCCGACCCAGCACTAA
TGCCAGACGGGAAATCTTCTCCTCGCGACCCACCTTCTCCCAACGAAACCCAGGCCGCGAGCGAGGCCAGGTG
TCG
```

Abb.A9 Promotorsequenz von *scomte1*

Dargestellt ist die mögliche Promotorsequenz des Gens *scomte1*. „Stress response elements“ (STREs) sind hervorgehoben.

```
CGGAACGCGACATGCGACGAGATAGCAGCAGAGACGAGGACGAGGAGGAGCTTCATGATGACTGCGTATGAAT
GCCGACGTTGTGAACTTCAAAATCGGGGGACTGAGGCTTTTATACCTCCACACCTCCTCTTCGCCGTCGCCGT
CGCCCATCGCGGACAGAGGCGATAAGGC AAAATGACGCCGAAATGCTGTCAGCCGTCCAAGACAGCTCCGCT
CAAGCGCAGACGGTATTCAGAATTTTCGGCCGAGATAACGAAGGAAGGGTTTTTCCTTGAGATGGAAGACGGC
GTGGCCTGACTCGAGGCGGACTCGAAGCCTGTCCGAGGGTGGCCGGCGAGCAATCGCAGATAAGGGCATCGTC
TGGAGCGATAACTCACTCGGAGAGGCCATAAGTAGGGGGGATACGCTTAGTCCTTCGCTCGGCCGCGCTCTAT
CACTCACCCAACGAGCTCGCCGCACTCGAATCGCACAAAGTTCAAACAAAAAAGCGCAGAAT
```

Abb.A10 Promotorsequenz von *scomte2*

Dargestellt ist die mögliche Promotorsequenz des Gens *scomte2*. Das „Stress response elements“ (STREs) ist hervorgehoben.

	C C T T A C G A G A G T G A A C C T T T T A C G C A C T C T A T A C T T G C G C T T G G G C T A T A	Majority
	1210 1220 1230 1240 1250	
1187	C C T T A C G A G A G T G A A C C T T T T A C G C A C T C T A T A C T T G C G C T T G G G C T A T A	2-2
1186	C C T T A C G A G A G T G A A C C T T T T A C G C A C T C T A T A C T T G C G C T T G G G C T A T A	2-7
1186	C C T T A C G A G A G T G A A C C T T T T A C G C A C T C T A T A C T T G C G C T T G G G C T A T A	4-40
1186	C C T T A C G A G A G T G A A C C T T T T A C G C A C T C T A T A C T T G C G C T T G G G C T A T A	12-44
1192	C T T T A C G A G A G C G A A C C T T T C A C G C A T T C T A T A C T T G C C C T T G T G C T A C A	E6
1186	C T T T A C G A G A G T G A A C C T T T T A C G C A C T C T A T A C T T G C G C T T G G G C T A T A	T40
1186	C C T T A C G A G A G T G A A C C T T T T A C G C A C T C T A T A C T T G C G C T T G G G C T A T A	W21
1187	C C T T A C G A G A G T G A A C C T T T T A C G C A C T C T A T A C T T G C G C T T G G G C T A T A	W22
1191	C T T T A C G A G A G C G A A C C T T T C A C G C A T T C T A T A C T T G C C C T T G T G C T A C A	T1
1191	C T T T A C C A G A G T C A A C C T T T C A C G C A C T C T A T A C T T G C G C C T T G G G C T A T A	H 4-8
	A T G G G T T G C A A G C T A T A G T G G C C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	Majority
	1260 1270 1280 1290 1300	
1237	A T G G G T T G C A A G C T A T A G T G G C C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	2-2
1236	A T G G G T T G C A A G C T A T A G T G G C C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	2-7
1236	A T G G G T T G C A A G C T A T A G T G G C C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	4-40
1236	A T G G G T T G C A A G C T A T A G T G G C C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	12-44
1242	A T G G G C T T G C A C G C T A G A G T G G G C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	E6
1236	A T G G G T T G C A A G C T A T A G T G G C C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	T40
1236	A T G G G T T G C A A G C T A T A G T G G C C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	W21
1237	A T G G G T T G C A A G C T A T A G T G G C C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	W22
1241	A T G G G C T T G C A C G C T A G A G T G G G C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	T1
1241	A T G G G C T T G C A T G C T A T A G T A G G C T C C G T G C G C T A G C T T C G C C T A T G G C C A	H 4-8
	T G C T G T C T G C T A G C G T C A C C C T T T G G C T T G C T A C T G T G C T G T C G C T T G C C	Majority
	1310 1320 1330 1340 1350	
1287	T G C T G T C T G C T A G C G T C A C C C T T T G G C T T G C T A C T G T G C T G T C G C T T G C C	2-2
1286	T G C T G T C T G C T A G C G T C A C C C T T T G G C T T G C T A C T G T G C T G T C G C T T G C C	2-7
1286	T G C T G T C T G C T A G C G T C A C C C T T T G G C T T G C T A C T G T G C T G T C G C T T G C C	4-40
1286	T G C T G T C T G C T A G C G T C A C C C T T T G G C T T G C T A C T G T G C T G T C G C T T G C C	12-44
1292	T G C T A T T T T C C A G C G T C A C C C T T T T G T T T C T T G C T G T T C T T T G C C G T G C C	E6
1286	T G C T G T C T G C T A G C G T C A C C C T T T G G C T T G C T A C T G T G C T G T C G C T T G C C	T40
1286	T G C T G T C T G C T A G C G T C A C C C T T T G G C T T G C T A C T G T G C T G T C G C T T G C C	W21
1287	T G C T G T C T G C T A G C G T C A C C C T T T G G C T T G C T A C T G T G C T G T C G C T T G C C	W22
1291	T G C T A T T T T C C A G C G T C A C C C T T T T G T T T C T T G C T G T T C T T T T G C G T G C C	T1
1291	T G C T A T C T T C C A G C G T C A C C C T T T T G T T T C T T G C T G T T C T T T T G C G T G C C	H 4-8
	C A T C T G T T T T C G - A A A A T T G A G A T G T T C A T G T T C A C T G A C C G C C T C C C T T	Majority
	1360 1370 1380 1390 1400	
1337	C A T C T G T T T T C G - A A A A T T G A G A T G T T C A T G T T C A C T G A C C G C C T C C C T T	2-2
1336	C A T C T G T T T T C G - A A A A T T G A G A T G T T C A T G T T C A C T G A C C G C C T C C C T T	2-7
1336	C A T C T G T T T T C G - A A A A T T G A G A T G T T C A T G T T C A C T G A C C G C C T C C C T T	4-40
1336	C A T C T G T T T T C G - A A A A T T G A G A T G T T C A T G T T C A C T G A C C G C C T C C C T T	12-44
1342	T G T T T G T T T T T G - A A A G C A G A G A A G T G C A T G T T C T C T G A C C G C A T T C C T T	E6
1336	C A T C T G T T T T C G - A A A A T T G A G A T G T T C A T G T T C A C T G A C C G C C T C C C T T	T40
1336	C A T C T G T T T T C G - A A A A T T G A G A T G T T C A T G T T C A C T G A C C G C C T C C C T T	W21
1337	C A T C T G T T T T C G - A A A A T T G A G A T G T T C A T G T T C A C T G A C C G C C T C C C T T	W22
1341	T G T T T G T T T T T G - A A G G C A G A G A A G T G C A T G T T C T C T G A C C G C A T T C T T T	T1
1341	T G T T T T T C T T T A C A A A G C G G A G A T G T T C A T G A T C A C T G A C C A C C T C C C T C	H 4-8
	C G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	Majority
	1410 1420 1430	
1386	C G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	2-2
1385	C G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	2-7
1385	C G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	4-40
1385	C G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	12-44
1391	C G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	E6
1385	C G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	T40
1385	C G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	W21
1386	C G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	W22
1390	C G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	T1
1391	T G C A G C C T A C G T C T T T C A A C A A C G T C A G C C G C C G	H 4-8

Abb. A11 Sequenzvergleich des *scmte1*-Gens verschiedener *S. commune*-Stämme
 Die Basensequenz von *scmte1* aus verschiedenen Stämmen wurde mittels ClustalIV verglichen. Im Alignment sind die Abweichungen von der Konsensussequenz schwarz hervorgehoben.

A		G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S V P A I										Majority			
		10			20			30			40			50	
1	G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S V P A I											2-2			
1	G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S V P A I											2-7			
1	G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S V P A I											4-40			
1	G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S V P A I											12-44			
1	G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S V P A I											E6			
1	G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S V P A I											T40			
1	G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S V P A I											W21			
1	G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S V P A I											W22			
1	G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S V P A I											T1			
1	G S R T S T N A R R E I F L A T H L P P N E T Q A A S E A Q V S M H H S N S N E R T P L L S A P A I											H 4-8			
		P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G										Majority			
		60			70			80							
151	P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G											2-2			
151	P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G											2-7			
151	P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G											4-40			
151	P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G											12-44			
151	P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G											E6			
151	P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G											T40			
151	P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G											W21			
151	P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G											W22			
151	P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G											T1			
151	P I I E E E V D A R G D P D T E S R T V M F W E E L R I L T K Y A A P V F G											H 4-8			
B		T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D										Majority			
		10			20			30			40			50	
1	T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D											2-2			
1	T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D											2-7			
1	T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D											4-40			
1	T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D											12-44			
1	T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D											E6			
1	T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D											T40			
1	T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D											W21			
1	T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D											W22			
1	T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D											T1			
1	T H L L E Y S L V M A S V V T I G H L S T S A L A A I T L G S M T A S V S G F S I I Q G F A S A L D											H 4-8			
		T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M										Majority			
		60			70										
151	T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M											2-2			
151	T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M											2-7			
151	T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M											4-40			
151	T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M											12-44			
151	T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M											E6			
151	T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M											T40			
151	T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M											W21			
151	T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M											W22			
151	T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M											T1			
151	T V L P S A W T S D K P Q L V G L W S Q R M											H 4-8			
C		P T V I I W V N A E P I L L F L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A										Majority			
		10			20			30							
1	P T V I I . V N A E P I L L F L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A											2-2			
1	P T V I I . V N A E P I L L F L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A											2-7			
1	P T V I I W V N A E P I L L F L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A											4-40			
1	P T V I I . V N A E P I L L L L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A											12-44			
1	P T V I I W V N A E P I L L F L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A											E6			
1	P T V I I . V N A E P I L L F L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A											T40			
1	P T V I I . V N A E P I L L F L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A											W21			
1	P T V I I W V N A E P I L L F L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A											W22			
1	P V I I W V N A E P I L L F L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A											T1			
1	P T V I I W V N A E P I L L F L R Q D P E V A R L A A L Y L R W E L L C L P A											H 4-8			

Abb. A12 Aminosäurenvergleich des Scmte1-Proteins verschiedener *S. commune*-Stämme Die Aminosäuresequenz von Scmte1 aus verschiedenen Stämmen wurde mittels ClustalV verglichen. Im Alignment sind die Abweichungen von der Konsensussequenz schwarz hervorgehoben.

```

GCAAGTGACTCTTGTAGGCTTTCTGACCGTGATATTTGCCGTCCTCGGGCATCTCCACGTCATCCTCGCCCCG
GTCGATAGCCTCCTTCCGCCCGTTTCGCGAGGACTGCCTCGATTTTCGTGCGCCAGCCAGAATCTCAGCCGCG
TCGTTCTTGTGCGAGGCCCCAGCCGCGTACTTCACGTCGGGGCCCTCGCGCACGTTCTCAGCATCGTCGTTGT
CGAGGTCGTGCGGTTGGTGGGTCTTACGCTTCGTCCCCGCGCTCAGAAGGTTGCCTGCCGCTTTCTTCTGCGG
GAGGACGACCTGAGTGCCGCTCGGGTCGGTAGAGGTCGAGGGGGATACTGAGCGCTGTCTTCGCGTAGCAGTG
GGCGGGCTTTTCCCTTCTTGAAGAAGGGAACTTTGACTTCGGACGACGACATGATGGCGGTACGGGATGGAG
GCTGATCGTGCTGACCAAGCACGCGTGACCCCTCAATCAATCACGTCGGCCCCGGAGTTCCGACGTTGAACTC
AACCACCGTCACACATCGCCAGTCGCGGCCATAAATCAGGCGAATTCAGGCGCTGAAATCACGAACGCTGACTC
TGAGTTACTGAAAGTTCCCATGCGCTACATGTCTACGGTGCTGTGTCTCTCTGGCCTCGAGCCCCGACTGGTC
GGCGCCCTTTTATCTGAGTCCATCAGCGCCCAAACCGCGGTGTTTCAGGAGGCCGTCGCCGCGCTTCATCGCCAC
AAACCATGCACTCTTAAACAGGTGGCATCAGCCAGCTCAACGACGTTCCCTACACCTTTCCCTTATACCACC

```

Abb. A13 Promotorsequenz des Gens 58836 aus *S. commune*

Dargestellt ist die mögliche Promotorsequenz des Gens 58836. „Stress response elements“ (STREs) sind hervorgehoben.

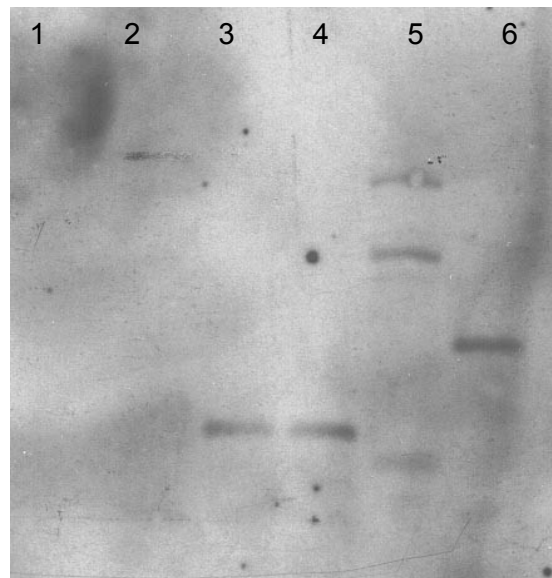


Abb. A14 Kopienzahl von *hph* im Genom der *T. vaccinum*-Transformanten

Die genomische DNA wurde mit der CTAB-Methode isoliert und mit *Eco*RI geschnitten. Dargestellt sind der Wildtyp (1) und die Transformanten T1 (2), T4 (3), T5 (4), T2 (5) und T3 (6).

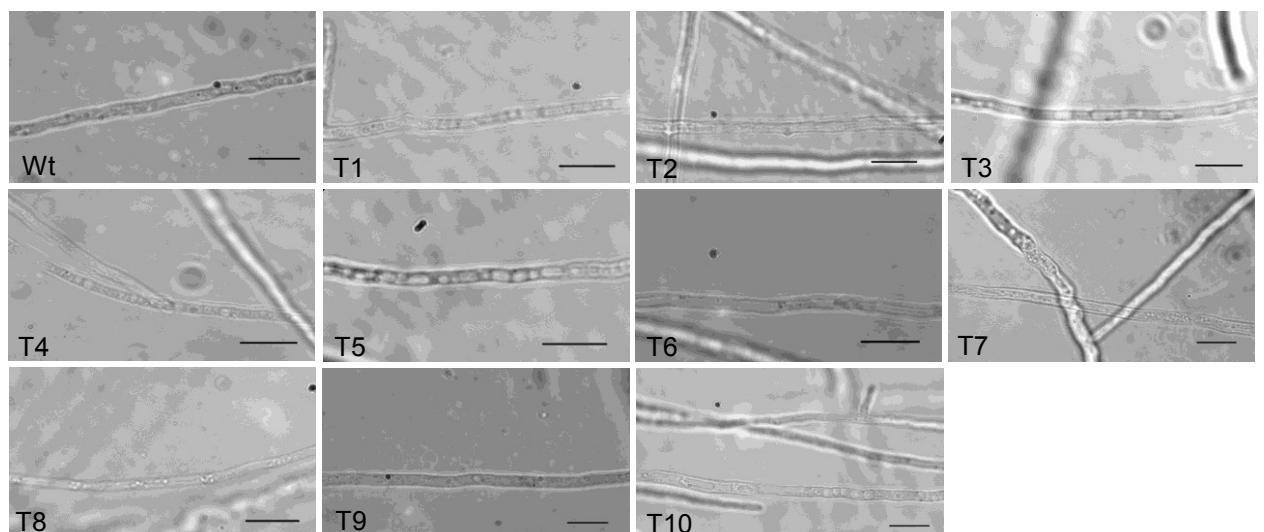


Abb. A15 Hyphenwachstum der *T. vaccinum*-Transformanten

T. vaccinum Transformanten (T1-T10) und der Wildtyp (Wt) wurden in MMNb-Flüssigmedium inkubiert und mikroskopiert. Der Größenbalken entspricht 10 µm.

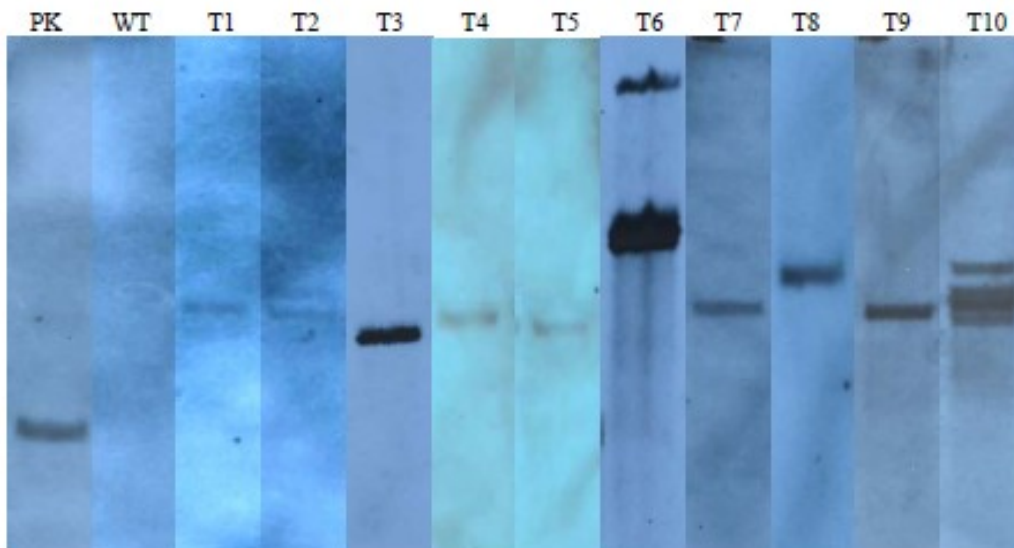


Abb. A16 Kopienzahl von *hph* im Genom der *T. vaccinum*-Transformanten nach fünfjähriger Langzeitkultivierung. Die genomische DNA wurde mit der CTAB-Methode isoliert und mit *Eco*RI geschnitten. Die Hybridisierung erfolgte mit dem *hph*-PCR-Fragment unter stringenten Bedingungen. Dargestellt sind der Wildtyp (WT) und die Transformanten (T1-T10) sowie die Positivkontrolle (PK).

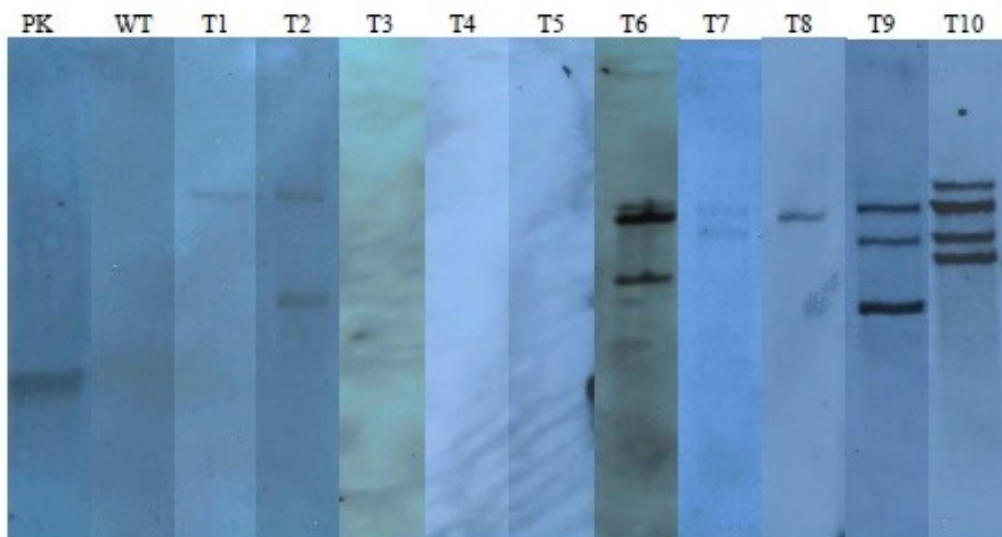


Abb. A17 Kopienzahl von *egfp* im Genom von *T. vaccinum*- Transformanten nach fünfjähriger Langzeitkultivierung

Die genomische DNA wurde mit der CTAB-Methode isoliert und mit *Eco*RI geschnitten. Die Hybridisierung erfolgte mit dem *egfp*-PCR-Fragment unter stringenten Bedingungen. Dargestellt sind der Wildtyp (WT) und die Transformanten (T1-T10) sowie die Positivkontrolle (PK).

Tab.AT1 Ethioninsensitivität der Hefe-Deletionsmutanten

Konz. [mM]	BY4741				YDR338c					
	OD 600 nm			MW	Std	OD 600 nm			MW	Std
2	0,021	0,018	0,028	0,022	0,01	0,025	0,023	0,023	0,024	0,00
1	0,032	0,039	0,025	0,032	0,01	0,031	0,029	0,032	0,031	0,00
0,5	0,056	0,055	0,06	0,057	0,00	0,058	0,054	0,075	0,062	0,01
0,25	0,086	0,083	0,081	0,083	0,00	0,121	0,09	0,084	0,098	0,02
0,125	0,111	0,116	0,113	0,113	0,00	0,141	0,113	0,116	0,123	0,02
0,063	0,115	0,117	0,116	0,116	0,00	0,143	0,116	0,124	0,128	0,01
0	0,269	0,264	0,255	0,263	0,01		0,244	0,364	0,304	0,08

Konz. [mM]	YHR032w				
	OD 600 nm			MW	Std
2	0,019	0,021	0,018	0,019	0,00
1	0,029	0,032		0,031	0,00
0,5	0,052	0,055	0,028	0,045	0,01
0,25	0,088	0,1	0,045	0,078	0,03
0,125	0,114	0,128	0,08	0,107	0,02
0,063	0,128	0,14	0,114	0,127	0,01
0	0,248	0,255	0,245	0,249	0,01

MW = Mittelwert, Std = Standardabweichung

Tab. AT2a Hemmhofdurchmesser Xenobiotika in [mm]

	Opus			Cycloheximid			TTC			Hygromycin		
	wt	pYes260	<i>mte1</i>	wt	pYes260	<i>mte1</i>	wt	pYes260	<i>mte1</i>	wt	pYes260	<i>mte1</i>
	45	54	45	52	62	53	22	20	19	27	31	28
	44	56	46	53	63	56	20	27	23	27	32	29
	45	52	45	52	60	55	23	27	23	27	32	30
	45	51	46	50	61	55	25	25	23	28	30	30
	42	50		51	60		25	25		27	32	
MW	44,2	52,6	45,5	51,6	61,2	54,8	23	24,8	22	27,2	31,4	29,3
Stabw	1,30	2,408	0,58	1,14	1,30	1,26	2,12	2,84	2,0	0,45	0,89	0,96

MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung, TTC = 2,3,5-Triphenyltetrazoliumehlorid

Tab. AT2b Hemmhofdurchmesser Xenobiotika in [mm]

	Etbr			Benomyl			SDS			Propanil		
	wt	pYes260	<i>mte1</i>	wt	pYes260	<i>mte1</i>	wt	pYes260	<i>mte1</i>	wt	pYes260	<i>mte1</i>
	28	28	27	20	19	18	34	39	31	25	20	21
	32	31	27	19	19	17	37	40	34	25	20	22
	28	31	25	19	19	17	34	38	34	25	17	20
	27	31	27	20	18	19	35	41	36	26	17	18
	28	31	26	19	20	18	40	38	36	26	17	18
MW	28,6	30,4	26,4	19,4	19	17,8	36	39,2	34,2	25,4	18,2	19,8
Stabw	1,95	1,34	0,89	0,55	0,71	0,84	2,55	1,30	2,5	0,55	1,64	1,79

MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung, Etbr = Ethidiumbromid

Tab. AT3a Hemmhofdurchmesser Sekundäre Pflanzenstoffe in [mm]

	α -Pinen			β -Pinen			Fichtennadelöl		
	wt	pYes260	mte1	wt	pYes260	mte1	wt	pYes260	mte1
	43	48	46	25	23	19	20	21	21
	43	52	46	23	24	22	21	21	20
	43	52	46	22	23	22	21	21	20
	45	50	48	23	26	20	20	21	21
	45	54	46	26	24	22	22	21	20
MW	43,8	51,2	46,4	23,8	24	21	20,8	21	20,4
Stabw	1,09	2,28	0,89	1,64	1,22	1,41	0,84	0	0,55

MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung

Tab. AT3b Hemmhofdurchmesser Sekundäre Pflanzenstoffe in [mm]

	Limonen			Berberin		
	wt	pYes260	mte1	wt	pYes260	mte1
	15	15	14	27	35	25
	15	15	14	28	34	26
	15	15	15	27	32	26
	15	15	14	25	35	28
	15	15	15	28	33	26
MW	15	15	14,4	27	33,8	26,2
Stabw	0	0	0,55	1,22	1,30	1,1

MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung

Tab. AT4 Hemmhofdurchmesser Naturstoffe in [mm]

	Geldanamycin			Pamamycin			Helioferin B			Tunicamycin		
	wt	pYes260	mte1	wt	pYes260	mte1	wt	pYes260	mte1	wt	pYes260	mte1
	18	18	19	17	19	17	25	25	20	15	17	16
	18	20	18	18	21	17	21	23	22	16	16	17
	18	18	19	17	18	16	23	25	21	16	16	16
	19	18	19	17	19	17	25	25	21	15	17	16
	18	18	18	17	18	17				16	17	16
MW	18,2	18,4	18,6	17,2	19	16,8	23,5	24,5	21	15,6	16,6	16,2
Stabw	0,45	0,89	0,55	0,45	1,22	0,45	1,91	1,00	0,82	0,55	0,55	0,45

MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung

Tab. AT 5 TNB-Konzentrationsbestimmung im Kulturüberstand bei OD=412 nm unter 0,25 mM CuSO₄

	wt		pYES260		mte1	
	- Cu	+ Cu	- Cu	+ Cu	- Cu	+ Cu
	0,0069	0,025	0,0088	0,0282	0,0076	0,0246
	0,0072	0,0256	0,0086	0,0291	0,0077	0,0245
	0,0064	0,025	0,008	0,0312	0,0086	
MW	0,0068	0,0252	0,0085	0,0295	0,0080	0,0246
Stabw	0,0004	0,0003	0,0004	0,0015	0,0006	0,0001

MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung

Tab. AT6 TNB-Konzentrationsbestimmung bei 412 nm für die Ermittlung der Standardkurve für die Messung unter 0,25 mM CuSO₄

Konzentration Glutathion [mM]			MW	Stabw
50	0,4796	0,4864	0,483	0,0048
25	0,2908	0,2981	0,29445	0,0052
12,5	0,1504	0,1526	0,1515	0,0016
6,25	0,0793	0,0801	0,0797	0,0006
3,125	0,0408	0,0419	0,04135	0,0008
1,5625	0,0238	0,023	0,0234	0,0006

MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung

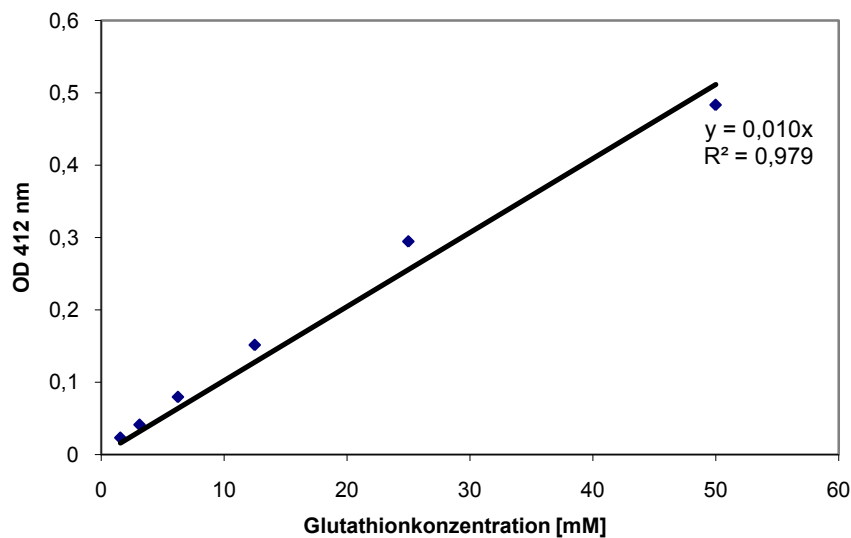


Abb. AT6a Standardkurve zur Ermittlung der Glutathionkonzentration unter 0,25 mM CuSO₄

Tab. AT7 TNB-Konzentrationsbestimmung im Kulturüberstand bei OD=412 unter 1 mM CuSO₄

	wt		pYES260		mte1	
	- Cu	+ Cu	- Cu	+ Cu	- Cu	+ Cu
	0,01035	0,02455	0,01375	0,05925	0,01815	0,07625
	0,01075	0,02745	0,01425	0,04325	0,01615	0,09205
	0,00995	0,02295	0,01425	0,04595	0,01585	0,08825
MW	0,0104	0,0250	0,0141	0,0495	0,0167	0,0855
Stabw	0,0004	0,0023	0,0003	0,0086	0,0013	0,0082

MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung

Tab. AT8 TNB-Konzentrationsbestimmung bei 412 nm für die Ermittlung der Standardkurve für die Messung unter 0,25 mM CuSO₄

Konzentration Glutathion [mM]			MW	Stabw
50	0,50415	0,50225	0,5032	0,0013435
25	0,50965	0,47015	0,4899	0,02793072
12,5	0,31125	0,29985	0,30555	0,00806102
6,25	0,15945	0,16845	0,16395	0,00636396
3,125	0,09125	0,08335	0,0873	0,00558614
1,5625	0,04665		0,04665	

MW = Mittelwert, Stabw = Standardabweichung

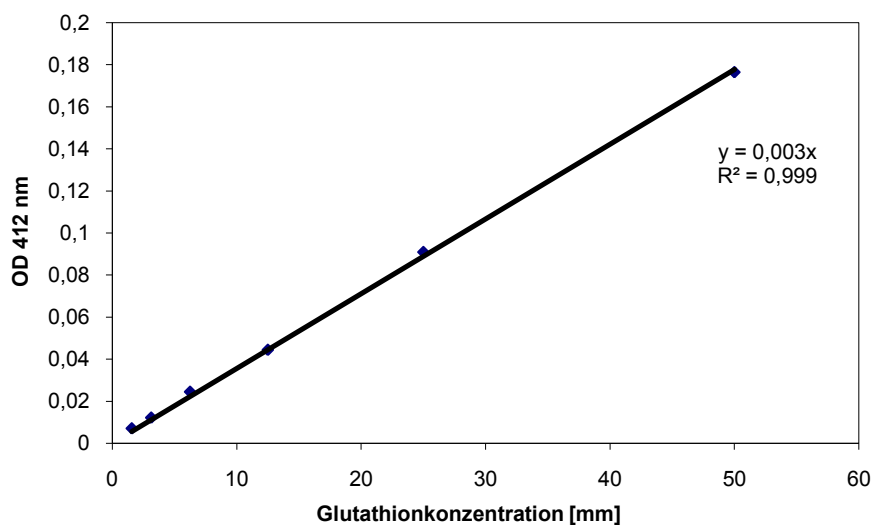


Abb. AT8a Standardkurve zur Ermittlung der Glutathionkonzentration unter 1 mM CuSO₄

Tab. AT9 Expression *scomte1* und *scomte2* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

	<i>scomte1</i>		<i>scomte2</i>	
	MW	Stabw	MW	Stabw
12-43 HSW	8,87	0,14	11,37	0
12-43	9,69	0,2	11,43	0,78
4-39	7,22	2,47	10,57	0,07
W22	9,14	0,43	10,74	0,05
W22 x 12-43	8,92	0,22	11,37	0,18
W22 x 4-39	9,1	0,56	11,11	0,08
W21 x 4-39	9,5	0,18	10,83	0,15
delta gap	5,98	0,97	11,34	0,09
A6x4-39	8,87	1,6	11,47	0,13
G11x4-39	9,59	0,45	10,86	0,21
Tx4-39	8,28	0,03	11,17	0,05
T2G12V	10,02	0,09	10,56	0,04
cdc42	9,59	0,45	10,86	0,21
W22 auf Cd	8,87	0,14	11,37	0
W22ad auf Opus	8,87	1,6	11,47	0,13
12-43 x 4-39 auf Amp + Stein	8,3	1	11,21	1
12-43 x 4-39 auf Amp	8,26	1	11,14	1

MW = Mittelwert der Intensitäten, Stabw = Standardabweichung

Tab. AT10 Hochregulierte Gene unter Fungizidexposition

FEBIT-ID	12-43 (Chip1) vs W22 auf Opus (Chip4)			4-39 (Chip2) vs W22 auf Opus (Chip4)			Gene Ontology	Domain Info	EC : Definition	Pathway : Pathway-Class	KOG-Info	Funktion	
	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q							
422-111240-PM	-7,02	2,18E-02		1	-8,09	1,49E-02	1				KOG4476: Gluconate transport-inducing protein, KOG4476: Gluconate transport-inducing	KH Transport und Metabolismus	
59-70287-PM	-5,83	7,17E-04		1	-8,45	1,13E-04	1	GO:0004348: glucosylceramidase activity(MF), GO:0005764: lysosome(CC), GO:0006665: sphingolipid metabolic process(BP), GO:0007040: lysosome organization and biogenesis(BP)	IPR001139: Glycoside hydrolase, family 30(IPR00843: GLHYDRASE30), IPR001139: Glycoside hydrolase, family 30(PF02055: Glyco_hydro_30)	3.2.1.45: Glucosylceramidase.	Sphingoglycolipid metabolism: Sphingoglycolipid metabolism	KOG2566: Beta-glucocerebroside	KH Transport und Metabolismus
60-59779-PM	-7,92	3,68E-04		1	-15,45	1,90E-05	1				KOG2533: Permease of the major facilitator superfamily	KH Transport und Metabolismus	
220-110277-PM	-9,82	3,04E-05		1	-18,61	1,50E-06	1				KOG2806: Chitinase	KH Transport und Metabolismus	
57-17408-PM	-8,08	1,88E-06		1	-5,15	3,52E-05	1					KH Transport und Metabolismus	
84-110551-PM	-11,83	4,16E-04		1	-11,85	4,13E-04	1	GO:0004553: hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds(MF), GO:0005975: carbohydrate metabolic process(BP)	IPR001524: Glycoside hydrolase, family 6(PD003733: sp_Q8WZJ4_PENFN_Q8WZJ4.), IPR001524: Glycoside hydrolase, family 6(PR00733: GLHYDRASE6), IPR001524: Glycoside hydrolase, family 6(PF01341: Glyco_hydro_6), IPR001524: Glycoside hydrolase, family 6(PF00655)			KOG4157: beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, contains WSC domain, KOG4157: beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, contains WSC domain	KH Transport und Metabolismus
321-236921-PM	-16,11	4,96E-03		1	-12,67	9,00E-03	1	GO:0004553: hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds(MF), GO:0005576: extracellular region(CC), GO:0005975: carbohydrate metabolic process(BP), GO:0030248: cellulose binding(MF)	IPR000254: Cellulose-binding region, fungal(PD001821: sp_Q8WZJ4_PENFN_Q8WZJ4.), IPR000254: Cellulose-binding region, fungal(PF00734: CBM_1), IPR000254: Cellulose-binding region, fungal(SM00236: fCBD), IPR010126: Esterase, PHB depolymerase(TIGR01840: ester				KH Transport und Metabolismus
174-60446-PM	-13,11	3,63E-02		1	-22,75	1,34E-02	1	GO:0004348: glucosylceramidase activity(MF), GO:0005764: lysosome(CC), GO:0006665: sphingolipid metabolic process(BP), GO:0007040: lysosome organization and biogenesis(BP)	IPR001139: Glycoside hydrolase, family 30(PF02055: Glyco_hydro_30)			KOG2566: Beta-glucocerebroside	KH Transport und Metabolismus
57-40236-PM	-8,49	1,03E-09		1	-10,59	2,27E-10	1	GO:0005215: transporter activity(MF), GO:0006810: transport(BP), GO:0016020: membrane(CC)	IPR000425: Major intrinsic protein(PD000295: sp_Q9CLD3_PASMU_Q9CLD3.)			KOG0224: Aquaporin (major intrinsic protein family)	KH Transport und Metabolismus
60-14901-PM	-5	5,72E-04		1	-5,54	3,20E-04	1	GO:0016051: carbohydrate biosynthetic process(BP), GO:0016758: transferase activity, transferring hexosyl groups(MF)	IPR0002495: Glycosyl transferase, family 8(PF01501: Glyco_transf_8)				KH Transport und Metabolismus
303-234329-PM	-7,48	9,48E-03		1	-5,33	2,64E-02	1	GO:0004553: hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds(MF), GO:0005975: carbohydrate metabolic process(BP)	IPR001579: Glycoside hydrolase, chitinase active site(PS01095: CHITINASE_18)				KH Transport und Metabolismus
219-61757-PM	-22,38	2,85E-02		1	-34,03	1,47E-02	1	GO:0005215: transporter activity(MF), GO:0006810: transport(BP), GO:0008289: lipid binding(MF), GO:0051118: glucan endo-1,3-alpha-glucosidase activity(MF)	IPR0005197: Glycoside hydrolase, family 71(PD139156: sp_Q9P8T5_PENPU_Q9P8T5.), IPR0005197: Glycoside hydrolase, family 71(PF03659: Glyco_hydro_71), IPR000463: Cytosolic fatty-acid binding protein(PS00214: FABP)	3.2.1.59: Glucan endo-1,3-alpha-glucosidase.	IN: IN		KH Transport und Metabolismus
53-41145-PM	-8,82	3,46E-05		1	-5,32	5,14E-04	1	IPR005103: Glycoside hydrolase, family 61(PF03443: Glyco_hydro_61)				KH Transport und Metabolismus	
98-16216-PM	-11,96	3,96E-03		1	-11,04	4,99E-03	1	GO:0004553: hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds(MF), GO:0005576: extracellular region(CC), GO:0005975: carbohydrate metabolic process(BP), GO:0030248: cellulose binding(MF)	IPR000254: Cellulose-binding region, fungal(PD001821: sp_Q9C1R4_LENED_Q9C1R4.), IPR000254: Cellulose-binding region, fungal(PF00734: CBM_1), IPR000254: Cellulose-binding region, fungal(SM00236: fCBD)				KH Transport und Metabolismus
61-80181-PM	-6,07	4,02E-04		1	-10,65	2,34E-05	1					KOG1650: Predicted K+/H+-antiporter	Inorganic ion transport and metabolism
98-63049-PM	-15,11	1,90E-03		1	-10,61	5,35E-03	1	GO:0005524: ATP binding(MF), GO:0006810: transport(BP), GO:0015662: ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism(MF), GO:0016020: membrane(CC), GO:0003824: catalytic activity(MF), GO:0008152: metabolic	IPR001757: ATPase, E1-E2 type(IPR001119: CATATPASE), IPR008250: E1-E2 ATPase-associated region(PF00122: E1-E2_ATPase), IPR006121: Heavy metal transport/detoxification protein(PF00403: HMA), IPR005834: Haloacid dehalogenase-like	3.6.3.4: Copper-exporting ATPase.	IN: IN	KOG0207: Cation transport ATPase	Inorganic ion transport and metabolism
98-53464-PM	-13,4	5,14E-06		1	-8,84	4,01E-05	1	GO:0005524: ATP binding(MF), GO:0015662: ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism(MF), GO:0015992: proton transport(BP), GO:0016020: membrane(CC), GO:0006810: transport(BP), GO:0006812: cation transport(BP), GO	IPR001757: ATPase, E1-E2 type(IPR001119: CATATPASE), IPR000695: H+ transporting ATPase, proton pump(IPR00120: HATPASE), IPR008250: E1-E2 ATPase-associated region(PF00122: E1-E2_ATPase), IPR006068: Cation transporting ATPase, C-terminal(IPF00689: Cation_ATPase			KOG0202: Ca2+-transporting ATPase	Inorganic ion transport and metabolism
77-49211-PM	-15,55	7,76E-03		1	-12,4	1,31E-02	1	GO:0003824: catalytic activity(MF), GO:0008152: metabolic process(BP), GO:0006508: proteolysis(BP), GO:0008237: metalloproteinase activity(MF), GO:0008270: zinc ion binding(MF), GO:0016207: 4-coumarate-CoA ligase activity(MF)	IPR000873: AMP-dependent synthetase and ligase(IPR00154: AMPBINDING), IPR000873: AMP-dependent synthetase and ligase(PF00501: AMP-binding), IPR006025: Peptidase M, neutral zinc metalloproteinase, zinc-binding site(PF00142: ZINC_PROTEASE), IPR000873: AMP-de	6.2.1.12: 4-coumarate-CoA ligase.	Flavonoids, stilbene and lignin biosynthesis : Flavonoids, stilbene and lignin biosynthesis	KOG1176: Acyl-CoA synthetase	Lipid transport and metabolism

77-61780-PM	-5,3	7,74E-04	1	-6,9	1,95E-04	GO:0004806: triacylglycerol lipase activity(MF), GO:0006629: lipid metabolic process(BP)	IPR002921: Lipase, class 3(PF01764: Lipase_3)			KOG4569: Predicted lipase	Lipid transport and metabolism	
143-112422-PM	-22,22	1,25E-02	1	-34,38	5,44E-03		IPR000379: Esterase/lipase/thioesterase(PSS0187: ESTERASE)				Lipid transport and metabolism	
204-53325-PM	-9,04	5,11E-04	1	-7,43	1,16E-03		IPR002347: Glucose/ribitol dehydrogenase(PR00081: GDHRD1), IPR002198: Short-chain dehydrogenase/reductase SDR(PF00106: adh_short)			KOG1208: Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	
111-41944-PM	-11,85	9,48E-03	1	-9,47	1,66E-02	GO:0008152: metabolic process(BP), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF)	IPR0016631: enoyl[acyl-carrier-protein] reductase activity(MF), GO:0018498: 2,3-dihydroxy-2,3-dihydro-phenylpropionate dehydrogenase activity(MF), GO:0018499: cis-2,3-dihydrodiol DDT dehydrogenase activity(MF), GO:0018500: trans-9R,10R-dihydrodiolphenant	IPR003866: Isoflavone reductase(PF02716: Isoflavone_redu)	1.3.1.-: With NAD(+) or NADP(+) as acceptor.	IN: IN	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	
58-111260-PM	-15,2	2,00E-03	1	-13,5	2,82E-03		IPR001128: Cytochrome P450(PR00385: P450), IPR002401: E-class P450, group (IPR00463: EP450), IPR001128: Cytochrome P450(PF00067: p450), IPR001128: Cytochrome P450(P500086: CYTOCHROME_P450)	IPR001077: O-methyltransferase, family 2(PF00891: Methyltransf_2), IPR001601: Generic methyltransferase(PSS0124: MET_TRANS), IPR000194: H+-transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit, central region(P500152: ATPASE_ALPHA_BETA)	1.14.14.1: Unspecific monooxygenase, 1.14.14.1: Unspecific monooxygenase, 1.14.14.1: Unspecific monooxygenase, 1.14.14.1: Unspecific monooxygenase	Tryptophan metabolism: Tryptophan metabolism, Fatty acid metabolism: Fatty acid metabolism, gamma-Hexachloro cyclohexane degradation: gamma-Hexachloro cyclohexane degradation	KOG0156: Cytochrome P450 CYP2 subfamily	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
182-51167-PM	-10,12	3,34E-05	1	-8,04	1,05E-04	GO:0004497: monooxygenase activity(MF), GO:0005506: iron ion binding(MF), GO:0006118: electron transport(BP), GO:0020037: heme binding(MF), GO:0050381: unspecific monooxygenase activity(MF)	IPR0015078: hydrogen ion transmembrane transporter activity(MF), GO:0016469: proton-transporting two-sector ATPase complex(CC), GO:0008171: O-methyltransferase activity(MF), GO:0017096: acetylserotonin O-methyltransferase activity(MF)	IPR001077: O-methyltransferase, family 2(PF00891: Methyltransf_2), IPR001601: Generic methyltransferase(PSS0124: MET_TRANS), IPR000194: H+-transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit, central region(P500152: ATPASE_ALPHA_BETA)	2.1.1.4: Acetylserotonin O-methyltransferase	Tryptophan metabolism: Tryptophan metabolism	KOG3178: Hydroxyindole e-O-methyltransferase and related SAM-dependent methyltransferases	Amino acid transport and metabolism
177-110470-PM	-9,03	3,08E-02	1	-8,3	3,69E-02	GO:0008152: metabolic process(BP), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF), GO:0043738: F420H2 dehydrogenase activity(MF), GO:0043826: sulfur oxygenase reductase activity(MF), GO:0043883: malolactate enzyme activity(MF), GO:0051341: regulation of oxidoredu	IPR002347: Glucose/ribitol dehydrogenase(PR00081: GDHRD1), IPR002198: Short-chain dehydrogenase/reductase SDR(PF00106: adh_short), IPR002198: Short-chain dehydrogenase/reductase SDR(P500061: ADH_SHORT)		1.-.-.-: Oxidoreductases.	IN: IN	Metabolism	
58-14559-PM	-20,27	2,79E-03	1	-13,79	7,29E-03		IPR001601: Generic methyltransferase(PSS0124: MET_TRANS), IPR000051: SAM (and some other nucleotide) binding motif(P500193: SAM_BIND)			KOG1269: SAM-dependent methyltransferases, KOG1269: SAM-dependent methyltransferases	Lipid transport and metabolism	
84-56510-PM	-85,18	1,53E-06	1	-62,83	3,79E-06	GO:0004497: monooxygenase activity(MF), GO:0005506: iron ion binding(MF), GO:0006118: electron transport(BP), GO:0020037: heme binding(MF)	IPR001128: Cytochrome P450(PR00385: P450), IPR002401: E-class P450, group (IPR00463: EP450), IPR001128: Cytochrome P450(PF00067: p450), IPR001128: Cytochrome P450(P500086: CYTOCHROME_P450)			KOG0157: Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies, KOG0157: Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	Lipid transport and metabolism	
53-13891-PM	-8,39	1,97E-02	1	-14,8	4,62E-03	GO:0016614: oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors(MF), GO:0050660: FAD binding(MF)	IPR000172: Glucose-methanol-choline oxidoreductase(PF00732: GMC_oxred_N), IPR007867: GMC oxidoreductase(PF05199: GMC_oxred_C), IPR000172: Glucose-methanol-choline oxidoreductase(P500623: GMC_OXRED_1), IPR000172: Glucose-methanol-choline oxidoreductase(P500623: GMC_OXRED_1)			KOG1238: Glucose dehydrogenase/choline dehydrogenase/mandelonitrile lyase (GMC oxidoreductase family)	Metabolism	
125-258521-PM	-11,96	2,51E-04	1	-19,47	3,82E-05		NULL: NULL(P500215: MITOCH_CARRIER)				Metabolism	
191-111672-PM	-15,55	3,14E-03	1	-11,68	6,79E-03		NULL: NULL(P500453: FKBP_PP1ASE_1)				Metabolism	
56-82730-PM	-7,13	3,26E-04	1	-7,91	1,97E-04	GO:0006118: electron transport(BP), GO:00090055: electron carrier activity(MF)	IPR000658: 2Fe-2S ferredoxin, iron-sulfur binding site(P500197: 2FE2S_FERREDOXIN)				Metabolism	
189-113881-PM	-305,19	2,17E-06	1	-214,02	4,86E-06					KOG3673: FtsJ-like RNA methyltransferase	RNA processing and modification	
111-114675-PM	-9,41	3,33E-05	1	-9,41	3,33E-05	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC), GO:0008270: zinc ion binding(MF)	IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PF00096: zf-C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(P500028: ZINC_FINGER_C2H2_1)			KOG1869: Splicing coactivator SRm160/300, subunit SRm300	RNA processing and modification	
144-109599-PM	-7,32	1,44E-05	1	-5,03	1,44E-04	GO:0003725: double-stranded RNA binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC)	IPR001159: Double-stranded RNA binding(PF00035: dsrm), IPR001159: Double-stranded RNA binding(P50137: DS_RBD)				RNA processing and modification	
324-238927-PM	-11,24	9,28E-05	1	-6,05	1,50E-03					KOG1869: Splicing coactivator SRm160/300, subunit SRm300	RNA processing and modification	
69-255941-PM	-7,55	1,14E-04	1	-10,4	2,28E-05	GO:0003700: transcription factor activity(MF), GO:0005634: nucleus(CC), GO:0006355: regulation of transcription, DNA-dependent(BP), GO:000810: diacylglycerol pyrophosphate phosphatase activity(MF), GO:0004787: thiamin-pyrophosphatase activity(MF), GO:000	IPR000818: TEA/ATTS(SM00426: TEA)	3.6.1.-: In phosphorus containing anhydrides., 3.6.1.-: In phosphorus containing anhydrides.	Starch and sucrose metabolism: Starch and sucrose metabolism, Folate biosynthesis: Folate biosynthesis	KOG2510: SWI-SNF chromatin remodeling complex protein	Chromatin structure and dynamics	
116-104274-PM	-6	4,03E-02	1	-8,81	1,54E-02		IPR001159: Double-stranded RNA binding(PF00035: dsrm), IPR001159: Double-stranded RNA binding(SM00358: DSRM), IPR000999: Ribonuclease III(SM00335: RIBO3), IPR001159: Double-stranded RNA binding(P50137: DS_RBD), IPR000999: Ribonuclease III(S50142: RNA5E)			KOG1904: Transcription coactivator	Transcription	
430-256898-PM	-5,07	6,82E-05	1	-8,37	2,88E-06	GO:0003723: RNA binding(MF), GO:0004525: ribonuclease III activity(MF), GO:0006396: RNA processing(BP), GO:0003725: double-stranded RNA binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC)	IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PF00096: zf-C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(P50157: ZINC_FINGER_C2H2_2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(P50028: ZINC_FINGER_C2H2_1), IPR000194: H+-transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit, central region			KOG0260: RNA polymerase II, large subunit	Transcription	

163-43053-PM	-11,28	7,57E-03	1	-6,78	2,85E-02	GO:000370: transcription factor activity(MF), GO:0005634: nucleus(CC), GO:0006355: regulation of transcription, DNA-dependent(BP), GO:0043565: sequence-specific DNA binding(MF), GO:0046883: protein dimerization activity(MF)	IPR004827: Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor(SM00338: BRLZ), IPR004827: Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor(PS50217: BZIP), IPR004827: Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor(PS00036: BZIP_BASIC)			Transcription
68-112446-PM	-36,71	4,99E-05	1	-36,65	5,02E-05	GO:0005515: protein binding(MF), GO:0008270: zinc ion binding(MF), GO:0003676: nucleic acid binding(MF)	IPR001878: Zn-finger, CCHC type(IPR000939: C2HC2ZNFINGER), IPR001878: Zn-finger, CCHC type(IPR000939: CCHC), IPR002867: Zn-finger, cysteine-rich C6HC(PF01485: IPR), IPR002807: Zn-finger, cysteine-rich C6HC(SM00947: IPR), IPR001878: Zn-finger, CCHC type(PS5)		KOG1812: Predicted E3 ubiquitin ligase	Transcription
117-107506-PM	-30,55	1,18E-03	1	-20,38	3,20E-03	GO:0005515: protein binding(MF), GO:0008270: zinc ion binding(MF), GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC)	IPR002867: Zn-finger, cysteine-rich C6HC(PF01485: IPR), IPR002867: Zn-finger, cysteine-rich C6HC(SM00947: IPR), IPR001841: Zn-finger, RING(PS50089: ZF_RING_2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PS00028: ZINC_FINGER_C2H2_1)		KOG1812: Predicted E3 ubiquitin ligase	Transcription
57-238571-PM	-39,72	1,39E-04	1	-64,91	3,62E-05	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC), GO:0008270: zinc ion binding(MF)	IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PF00096: ZF_C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(SM00355: Znf_C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PS50157: ZINC_FINGER_C2H2_2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PS50028: ZINC_FINGER_C2H2_1)		KOG1721: FOG: Zn-finger	Transcription
79-35878-PM	-9,71	3,09E-03	1	-14,84	7,66E-04	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC), GO:0008270: zinc ion binding(MF)	IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PF00096: ZF_C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(SM00355: Znf_C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PS50157: ZINC_FINGER_C2H2_2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PS50028: ZINC_FINGER_C2H2_1)		KOG1721: FOG: Zn-finger	Transcription
82-104983-PM	-22,89	1,31E-03	1	-23,69	1,16E-03	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC), GO:0008270: zinc ion binding(MF)	IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PF00096: ZF_C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(SM00355: Znf_C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PS50157: ZINC_FINGER_C2H2_2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PS50028: ZINC_FINGER_C2H2_1)		KOG4443: Putative transcription factor HALR/MLL3, involved in embryonic development	Transcription
80-76272-PM	-8,27	3,03E-03	1	-5,14	1,89E-02	GO:0006464: protein modification process(BP)	IPR000938: CAP-Gly(PF01302: CAP_GLY), IPR000526: Ubiquitin(SM00213: UBQ), IPR000938: CAP-Gly(PS50245: CAP_GLY_2), IPR000938: CAP-Gly(PS00845: CAP_GLY_1)		KOG3206: Alpha-tubulin folding cofactor B	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
105-231359-PM	-8,14	4,18E-04	1	-7,34	6,67E-04	GO:0004177: aminopeptidase activity(MF), GO:0006508: proteolysis(BP), GO:0005737: cytoplasm(CC), GO:0016804: prolyl aminopeptidase activity(MF)	IPR002410: Peptidase S33, prolyl aminopeptidase(IPR00073: PROAMINOPTASE), IPR000073: Alpha/beta hydrolase fold(IPR00561: Ahydrolase_1), IPR005945: Peptidase S33, tricom interacting factor 1(TTIGR01292: pro_mimo_pep_2), IPR000379: Esterase/lipase/thioesterase		KOG3206: Alpha-tubulin folding cofactor B	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
66-54225-PM	-27,37	9,44E-05	1	-35,36	4,21E-05	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC)	IPR001810: Cyclin-like F-box(PF00646: F-box), IPR001810: Cyclin-like F-box(PS50181: FBOX)		KOG1216: Serine/threonine protein phosphatase involved in cell cycle control, PP2A-related, KOG0373: Serine/threonine specific protein phosphatase involved in cell cycle control, PP2A-related	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
152-107660-PM	-26,12	8,84E-03	1	-16,66	2,07E-02	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC)	IPR001810: Cyclin-like F-box(PF00646: F-box), IPR001810: Cyclin-like F-box(PS50181: FBOX), IPR000585: Cyclic nucleotide-binding(PS00888: CNMP_BINDING_1)		KOG1216: Serine/threonine protein phosphatase involved in cell cycle control, PP2A-related	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
117-107506-PM	-30,55	1,18E-03	1	-20,38	3,20E-03	GO:0005515: protein binding(MF), GO:0008270: zinc ion binding(MF), GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC)	IPR002867: Zn-finger, cysteine-rich C6HC(PF01485: IPR), IPR002867: Zn-finger, cysteine-rich C6HC(SM00947: IPR), IPR001841: Zn-finger, RING(PS50089: ZF_RING_2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PS00028: ZINC_FINGER_C2H2_1)		KOG1812: Predicted E3 ubiquitin ligase	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
65-286849-PM	-5,72	5,94E-03	1	-7,53	2,03E-03	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC)	IPR001810: Cyclin-like F-box(PF00646: F-box), IPR001810: Cyclin-like F-box(PS50181: FBOX), IPR000585: Cyclic nucleotide-binding(PS00888: CNMP_BINDING_1)		KOG1216: Serine/threonine protein phosphatase involved in cell cycle control, PP2A-related	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
56-237741-PM	-14,33	6,92E-07	1	-8,87	8,68E-06	GO:0004672: protein kinase activity(MF), GO:0005524: ATP binding(MF), GO:0006468: protein amino acid phosphorylation(BP), GO:0004674: protein serine/threonine kinase activity(MF)	IPR000719: Protein kinase(PD000001: sp_PHY1_CERPU_P25848), IPR002290: Serine/threonine protein kinase(SM00220: S_TKc), IPR000719: Protein kinase(PS50011: PROTEIN_KINASE_DOM)		KOG1187: Serine/threonine protein kinase	Signal transduction mechanisms
79-60581-PM	-5,83	2,16E-02	1	-9,05	5,89E-03	GO:0016787: hydrolase activity(MF), GO:0004721: phosphoprotein phosphatase activity(MF), GO:0004723: calcium-dependent protein serine/threonine phosphatase activity(MF), GO:0004724: magnesium-dependent protein serine/threonine phosphatase activity(MF), GO	IPR006186: Serine/threonine-specific protein phosphatase and bis(5-nucleosyl) tetraphosphatase(PD000252: sp_O9Y74_FLUGRU_O9Y74), IPR006186: Serine/threonine-specific protein phosphatase and bis(5-nucleosyl) tetraphosphatase(PR00114: STPHPTASE), IPR00048	3.1.3.16: Serine/threonine specific protein phosphatase	KOG0373: Serine/threonine specific protein phosphatase involved in cell cycle control, PP2A-related	Signal transduction mechanisms
112-52055-PM	-13,13	2,48E-02	1	-9,76	4,37E-02	GO:0004672: protein kinase activity(MF), GO:0005524: ATP binding(MF), GO:0006468: protein amino acid phosphorylation(BP), GO:0004674: protein serine/threonine kinase activity(MF)	IPR000719: Protein kinase(PD000001: sp_PHY1_CERPU_P25848), IPR002290: Serine/threonine protein kinase(SM00220: S_TKc), IPR000719: Protein kinase(PS50011: PROTEIN_KINASE_DOM)	N..N	KOG1216: Serine/threonine protein phosphatase involved in cell cycle control, PP2A-related	Signal transduction mechanisms
171-81761-PM	-10,65	3,20E-06	1	-6,02	8,05E-05	GO:0004672: protein kinase activity(MF), GO:0005524: ATP binding(MF), GO:0006468: protein amino acid phosphorylation(BP), GO:0004674: protein serine/threonine kinase activity(MF)	NULL: NULL(SSSF58394: Bacteriocidal permeability-increasing protein, BPI)		KOG1216: Serine/threonine protein phosphatase involved in cell cycle control, PP2A-related	Signal transduction mechanisms
69-37220-PM	-5,98	2,89E-03	1	-7,15	1,37E-03	GO:0003847: 1-alkyl-2-acetylglucophosphocholine esterase activity(MF)	IPR001680: G-protein beta WD-40 repeat(PD000018: sp_PKWA_THECU_P49695), IPR001680: G-protein beta WD-40 repeat(PR000320: GPROTEINBRPT), IPR001680: G-protein beta WD-40 repeat(PF00400: WD40), IPR001680: G-protein beta WD-40 repeat(SM00320: WD40), IPR001680	3.1.1.47: 2-alkyl-1-alkylglycerophosphocholine esterase.	Glycerolipid metabolism	Signal transduction mechanisms
60-106922-PM	-8,4	3,89E-04	1	-9,12	2,71E-04	GO:0004672: protein kinase activity(MF), GO:0005524: ATP binding(MF), GO:0006468: protein amino acid phosphorylation(BP), GO:0004713: protein-tyrosine kinase activity(MF), GO:0004674: protein serine/threonine kinase activity(MF)	IPR000719: Protein kinase(PD000001: sp_077328_FLA7_077328), IPR000719: Protein kinase(PF00069: Pkinase), IPR001245: Tyrosine protein kinase(SM0219: TKc), IPR002290: Serine/threonine protein kinase(SM00220: S_TKc), IPR000719: Protein kinase(PS50011: P		KOG0271: Notchless-like WD40 repeats containing protein	Signal transduction mechanisms
96-105193-PM	-9,7	2,58E-04	1	-13,44	6,49E-05	GO:0006508: proteolysis(BP), GO:0003693: caspase activity(MF)	IPR001309: Caspase-1, g2v(PF00656: Peptidase_C14), NULL: NULL(SSSF52129: Caspase like)		KOG1546: Metacaspase involved in regulation of apoptosis, KOG1546: Metacaspase involved in regulation of apoptosis	Signal transduction mechanisms
53-107158-PM	-8,66	1,52E-02	1	-9,47	1,20E-02	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC), GO:0008270: zinc ion binding(MF)	IPR000719: Protein kinase(PD000001: sp_077328_FLA7_077328), IPR000719: Protein kinase(PF00069: Pkinase), IPR001245: Tyrosine protein kinase(SM0219: TKc), IPR002290: Serine/threonine protein kinase(SM00220: S_TKc), IPR000719: Protein kinase(PS50011: P		KOG1216: von Willebrand factor and related coagulation proteins, KOG1216: von Willebrand factor and related coagulation proteins	Defense mechanisms

186-111995-PM	-8,92	3,11E-07	1	-8,03	6,03E-07	1		IPR001938: Thaumatin, pathogenesis-related(PD001321: sp_081927; ClCAR_081927.); IPR001938: Thaumatin pathogenesis-related(PR00347: THAUMATIN); IPR001938: Thaumatin, pathogenesis-related(SM00205: THN)				Defense mechanisms
62-232646-PM	-5,1	1,52E-03	1	-10,1	5,26E-05	1	GO:0004601: peroxidase activity(MF), GO:0006118: electron transport(BP)	IPR000028: Chloroperoxidase(PD040763: sp_Q9HGK3 AGABI_Q9HGK3); IPR002068: Heat shock protein Hsp20(PS01031: HSP20)				stress response
123-27760-PM	-7,8	1,71E-02	1	-13,36	3,93E-03	1		IPR002068: Heat shock protein Hsp20(PS01031: HSP20)				stress response
109-55038-PM	-16,02	8,40E-04	1	-16,02	8,40E-04	1		IPR002068: Heat shock protein Hsp20(PF00011: HSP20), IPR002068: Heat shock protein Hsp20(PS01031: HSP20)			KOG0710: Molecular chaperone (small heat-shock protein Hsp26/Hsp42)	stress response
105-83196-PM	-6,58	5,21E-07	1	-5,53	1,88E-06	1	GO:0004364: glutathione transferase activity(MF), GO:0005737: cytoplasm(CC), GO:0008152: metabolic process(BP)	IPR005442: Glutathione S-transferase, omega-class(PR01625: GSTRNSFRASEO), IPR004045: Glutathione S-transferase, N-terminal(PF02798: GST_N), IPR004045: Glutathione S-transferase, N-terminal(PS50404: GST_N), IPR004045: Glutathione S-transferase, C-terminal	2.5.1.18: Glutathione transferase.	Glutathione metabolism: Glutathione metabolism	KOG0406: Glutathione transferase	stress response
155-48590-PM	-104,39	1,76E-08	1	-80,93	3,97E-08	1	GO:0008152: metabolic process(BP), GO:0016846: carbon-sulfur lyase activity(MF)	IPR006913: Glutathione-dependent formaldehyde-activating, GFA(PF04828: DUF636)				stress response
59-111285-PM	-5,85	1,51E-02	1	-7,52	6,69E-03	1	GO:0006950: response to stress(BP)	IPR003718: OsmC-like protein(PF02566: OsmC)				stress response
491-113877-PM	-10,58	3,65E-02	1	-9,62	4,37E-02	1					KOG3544: Collagens (type IV and type XIII), and related proteins	Extracellular structures
146-111587-PM	-17,3	3,75E-02	1	-30,51	1,50E-02	1					KOG3587: Galectin, galactose-binding lectin	Extracellular structures
128-114788-PM	-13,52	2,51E-02	1	-18,84	1,31E-02	1	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC), GO:0008270: zinc ion binding(MF)	IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PF00096: zf-C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(SM00355: ZnF_C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PS00028: ZINC_FINGER_C2H2_1)			KOG2992: Nuclear GTPase/ATPase p130	Nuclear structure
56-71189-PM	-16,87	2,14E-04	1	-25,23	5,31E-05	1	GO:0046872: metal ion binding(MF), GO:0008738: L-fucose-phosphate aldolase activity(MF)	IPR001303: Class II aldolase/adducin, N-terminal(PF00596: Aldolase_II)	4.1.2.17: L-fucose-phosphate aldolase.	Fructose and mannose metabolism: Fructose and mannose metabolism	KOG3699: Cytoskeletal protein Adducin, KOG3699: Cytoskeletal protein Adducin	Cytoskeleton
253-235821-PM	-14,42	1,38E-03	1	-27,04	2,00E-04	1					KOG0161: Myosin class II heavy chain	Cytoskeleton
89-232440-PM	-6,75	1,18E-02	1	-6,35	1,43E-02	1		IPR000782: Beta-Ig-H3/fasciclin(PF02469: Fasciclin), IPR000782: Beta-Ig-H3/fasciclin(SM00554: FAS1), IPR000782: Beta-Ig-H3/fasciclin(PS50213: FAS1)			KOG3671: Actin regulatory protein (Wiskott-Aldrich syndrome protein), KOG3671: Actin regulatory protein (Wiskott-Aldrich syndrome protein)	Cytoskeleton
64-237407-PM	-12,85	6,09E-04	1	-15,3	3,29E-04	1					KOG1830: Wiskott Aldrich syndrome proteins	Cytoskeleton
437-257367-PM	-19,8	4,51E-04	1	-30,27	1,22E-04	1	GO:0005525: GTP binding(MF), GO:0005874: microtubule(CC), GO:0007017: microtubule-based process(BP), GO:0004308: exo-alpha-sialidase activity(MF)	IPR000217: Tubulin(PS00227: TUBULIN)	3.2.1.18: Exo-alpha-sialidase.	N-Glycan degradation: N-Glycan degradation, Sphingoglycolipid metabolism: Sphingoglycolipid metabolism	KOG3915: Transcription regulator dachshund, contains SKI/SNO domain	Cytoskeleton
71-107207-PM	-6,02	1,84E-03	1	-5,01	4,18E-03	1		IPR002110: Ankyrin(PR01415: ANKYRIN), IPR002110: Ankyrin(PF00023: Ank), IPR002110: Ankyrin(SM00248: ANK), IPR002110: Ankyrin(PS50088: ANK_REPEAT), IPR002110: Ankyrin(PS50297: ANK_REP_REGION)				Cytoskeleton
103-237626-PM	-7,13	3,82E-03	1	-5,12	1,27E-02	1	GO:0005198: structural molecule activity(MF), GO:0005525: GTP binding(MF), GO:0005874: microtubule(CC), GO:0007018: microtubule-based movement(BP)	IPR002453: Beta tubulin(PS00228: TUBULIN_B_AUTOREG)				Cytoskeleton
175-62035-PM	-46,26	2,27E-07	1	-78,04	3,76E-08	1		IPR003877: SPla/Ryanodine receptor SPRY(PF00622: SPRY), IPR003877: SPla/Ryanodine receptor SPRY(SM00449: SPRY), IPR006595: CTLH, C-terminal to Lish motif(SM00668: CTLH), IPR003877: SPla/Ryanodine receptor SPRY(PS50224: SPRY), IPR006594: Lissencephaly type I			KOG1477: SPRY domain-containing proteins	Funktion unbekannt
63-61814-PM	-5,92	3,68E-02	1	-8,16	1,60E-02	1		IPR006603: Cystinosin/ERS1p repeat(PF04193: PQ-loop), IPR006603: Cystinosin/ERS1p repeat(SM00679: CTNS)				hypothetisches Protein
243-110808-PM	-14,85	3,43E-03	1	-10,31	9,18E-03	1						hypothetisches Protein

70-110391-PM	-5,83	4,90E-02	1	-6,84	3,36E-02	1						hypothetisches Protein
94-50814-PM	-14,65	1,03E-03	1	-7,59	8,31E-03	1						hypothetisches Protein
106-107823-PM	-12,61	1,36E-02	1	-8,71	3,11E-02	1						hypothetisches Protein
288-114974-PM	-11,31	9,33E-06	1	-14,66	2,65E-06	1						hypothetisches Protein
53-235209-PM	-7,37	1,30E-02	1	-5,03	3,84E-02	1						hypothetisches Protein
62-86341-PM	-32,87	8,24E-08	1	-17,96	1,10E-06	1						hypothetisches Protein
59-236698-PM	-18,05	1,26E-03	1	-14,48	2,38E-03	1						hypothetisches Protein
82-113234-PM	-8,97	1,14E-02	1	-7,75	1,69E-02	1						hypothetisches Protein
60-60099-PM	-5,25	2,11E-02	1	-9,9	2,67E-03	1						hypothetisches Protein
533-49340-PM	-11,09	1,28E-06	1	-8,71	4,92E-06	1						hypothetisches Protein
297-111227-PM	-16,98	9,69E-05	1	-19,76	5,05E-05	1						hypothetisches Protein
119-58836-PM	-106,28	9,63E-04	1	-57,38	3,01E-03	1						hypothetisches Protein
102-114396-PM	-80,77	7,57E-04	1	-51,54	1,88E-03	1						hypothetisches Protein
53-59497-PM	-8,72	3,33E-03	1	-6	1,17E-02	1						hypothetisches Protein
108-113864-PM	-17,68	2,16E-02	1	-15,48	2,74E-02	1						hypothetisches Protein
225-111318-PM	-7,01	1,67E-02	1	-7,49	1,38E-02	1						hypothetisches Protein
73-12028-PM	-36,73	3,29E-05	1	-67,03	5,29E-06	1						hypothetisches Protein
56-113806-PM	-8,71	3,79E-02	1	-8,01	4,50E-02	1						hypothetisches Protein
53-107068-PM	-16,75	1,23E-03	1	-13,08	2,58E-03	1						hypothetisches Protein
56-11500-PM	-18,72	9,55E-04	1	-21,87	6,04E-04	1						hypothetisches Protein
59-46742-PM	-30,35	6,88E-04	1	-46,86	2,23E-04	1						hypothetisches Protein
91-103449-PM	-22,55	1,23E-04	1	-14,28	5,76E-04	1						hypothetisches Protein
89-28634-PM	-7,05	2,28E-02	1	-6,5	2,81E-02	1						hypothetisches Protein
75-114106-PM	-32,95	4,88E-04	1	-61,35	9,66E-05	1						hypothetisches Protein
222-231681-PM	-11,1	3,17E-02	1	-8,97	4,77E-02	1						hypothetisches Protein
96-230875-PM	-8,74	5,33E-04	1	-13,09	9,93E-05	1						hypothetisches Protein
56-112604-PM	-7,63	4,41E-03	1	-6,05	9,86E-03	1						hypothetisches Protein
79-111634-PM	-10,36	1,61E-02	1	-6,99	4,01E-02	1						hypothetisches Protein
58-258069-PM	-10,44	1,69E-07	1	-5,32	1,35E-05	1						hypothetisches Protein
63-105272-PM	-6,64	1,93E-05	1	-5,23	8,67E-05	1						hypothetisches Protein
82-85731-PM	-12,25	3,23E-04	1	-8,36	1,41E-03	1						hypothetisches Protein
142-233627-PM	-13,51	1,14E-02	1	-7,27	4,53E-02	1						hypothetisches Protein
55-232049-PM	-10,1	1,15E-06	1	-6,04	2,53E-05	1						hypothetisches Protein
68-232755-PM	-15,19	1,13E-04	1	-11,16	3,75E-04	1						hypothetisches Protein
68-111226-PM	-6,69	2,16E-04	1	-12,05	1,12E-05	1						hypothetisches Protein
194-254958-PM	-18,29	1,24E-03	1	-23,59	5,97E-04	1						hypothetisches Protein
336-231028-PM	-6,84	2,84E-04	1	-5,76	6,78E-04	1						hypothetisches Protein
204-60480-PM	-16,74	8,32E-03	1	-9,16	3,13E-02	1						hypothetisches Protein
56-111597-PM	-32,43	2,12E-02	1	-34,83	1,90E-02	1						hypothetisches Protein
57-255247-PM	-13,71	2,43E-06	1	-9,04	2,01E-05	1						hypothetisches Protein
117-231022-PM	-10,75	8,29E-07	1	-7,17	8,84E-06	1						hypothetisches Protein
90-107312-PM	-10,97	8,73E-03	1	-6,79	2,99E-02	1						hypothetisches Protein
110-30133-PM	-14,72	8,40E-06	1	-8,65	1,01E-04	1						hypothetisches Protein
84-109269-PM	-13,62	4,85E-03	1	-20,96	1,53E-03	1						hypothetisches Protein
96-103648-PM	-6,79	3,09E-07	1	-8,95	4,68E-08	1						hypothetisches Protein
217-234366-PM	-31,75	1,32E-09	1	-20,22	1,07E-08	1						hypothetisches Protein
93-236758-PM	-11,37	2,99E-06	1	-9,96	6,03E-06	1						hypothetisches Protein
102-85227-PM	-7,77	2,11E-07	1	-6,47	7,54E-07	1						hypothetisches Protein
94-76730-PM	-7,83	2,88E-05	1	-5,38	2,44E-04	1						hypothetisches Protein
99-58098-PM	-6,38	1,44E-03	1	-6,55	1,28E-03	1						hypothetisches Protein
74-258821-PM	-10,27	2,85E-03	1	-8,68	4,91E-03	1						hypothetisches Protein
66-111147-PM	-9,47	1,85E-03	1	-8,2	3,08E-03	1						hypothetisches Protein
206-233748-PM	-12,44	1,06E-02	1	-9,85	1,85E-02	1						hypothetisches Protein
56-53069-PM	-8,75	1,61E-04	1	-5,65	1,29E-03	1						hypothetisches Protein
114-104764-PM	-7,77	4,55E-02	1	-8,26	4,02E-02	1						hypothetisches Protein
182-109019-PM	-5,22	4,97E-02	1	-9,44	1,44E-02	1						hypothetisches Protein
173-232945-PM	-6,11	1,58E-04	1	-6,93	7,86E-05	1						hypothetisches Protein
132-71214-PM	-116,69	9,62E-05	1	-64,27	3,68E-04	1						hypothetisches Protein

„Fold“ bezieht sich auf die Veränderung der Expression des erstgenannten (unbehandelten) Stammes

Tab. AT11 Reprimierte Gene unter Fungizidexposition

FEBIT-ID	12-43 (Chip1) vs W22 auf Opus (Chip4)			4-39 (Chip2) vs W22 auf Opus (Chip4)			Gene Ontology	Domain Info	EC : Definition	Pathway : Pathway-	KOG-Info	Funktion
	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q						
58-234509-PM	14,89	2,46E-03	1	14,29	2,77E-03	1	GO:0003899: DNA-directed RNA polymerase activity(MF), GO:0006350: transcription(BP), GO:0003900: DNA-directed RNA polymerase I activity(MF), GO:0003901: DNA-directed RNA polymerase II activity(MF), GO:0003902: DNA-directed RNA polymerase III activity(MF)	IPR005576: RNA polymerase Rpb7, N-terminal(PF03876: RNA_pol_Rpb7_N)	2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase., 2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase., 2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase.	RNA polymerase: RNA polymerase, Purine metabolism: Purine metabolism,	KOG3298: DNA-directed RNA polymerase subunit E'	Transcription
53-237070-PM	20,83	2,33E-04	1	18,53	3,42E-04	1	GO:0003677: DNA binding(MF), GO:0003899: DNA-directed RNA polymerase activity(MF), GO:0006350: transcription(BP), GO:0046983: protein dimerization activity(MF), GO:0003900: DNA-directed RNA polymerase I activity(MF), GO:0003901: DNA-directed RNA polymerase II activity(MF), GO:0003902: DNA-directed RNA polymerase III activity(MF)	IPR011261: RNA polymerase, dimerisation(PF01193: RNA_pol_L), IPR008193: DNA-directed RNA polymerase, 13 to 16 kDa subunit(P501154: RNA_POL_L_13KD)	2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase., 2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase., 2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase.	RNA polymerase: RNA polymerase, Purine metabolism: Purine metabolism, Pyrimidine metabolism:	KOG3438: DNA-directed RNA polymerase, subunit L	Transcription
638-233578-PM	6,01	2,57E-03	1	8,4	6,16E-04	1					RNA polymerase II, large subunit	Transcription
217-255163-PM	13,75	1,95E-07	1	11,19	5,95E-07	1					KOG0047: Transcription factor, contains HOX domain	Transcription
54-255115-PM	8,58	1,07E-06	1	11,36	2,05E-07	1	GO:0003677: DNA binding(MF), GO:0003899: DNA-directed RNA polymerase activity(MF), GO:0006350: transcription(BP), GO:000497: monooxygenase activity(MF), GO:0005506: iron ion binding(MF), GO:0006118: electron transport(BP), GO:0020037: heme binding(MF), G	IPR001128: Cytochrome P450(P450: P450), IPR002401: E-class P450, group I(P450: EP450), IPR001128: Cytochrome P450(PF00067: p450), IPR000722: RNA polymerase, alpha subunit(PF00623: RNA_pol_Rpb1_2), IPR007066: RNA polymerase Rpb1, domain 3(PF04983: R	2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase., 2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase., 2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase.	RNA polymerase: RNA polymerase, Purine metabolism: Purine metabolism,	KOG0262: RNA polymerase I, large subunit	Transcription
129-15473-PM	75,97	4,90E-06	1	56,07	1,19E-05	1	GO:0003677: DNA binding(MF), GO:0006306: DNA methylation(BP), GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0004308: helicase activity(MF), GO:000524: ATP binding(MF), GO:0004003: ATP-dependent DNA helicase activity(MF), GO:0004004: ATP-dependent RNA helicase	IPR001525: C-5 cytosine-specific DNA methylase(PF00145: DNA_methylase), IPR001650: Helicase, C-terminal(PF00271: Helicase_C), IPR001410: DEAD/DEAH box helicase(SM00487: DEXDc)	2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase., 2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase., 2.7.7.6: DNA-directed RNA polymerase.	Purine metabolism: Adenosinetriphosphatase.	KOG1015: Transcription regulator XNP/ATRX, DEAD-box superfamily	Transcription
120-44555-PM	8,67	3,85E-03	1	7,76	5,59E-03	1	GO:0003700: transcription factor activity(MF), GO:0005634: nucleus(CC), GO:0006355: regulation of transcription, DNA-dependent(BP), GO:0008270: zinc ion binding(MF), GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0008766: UDP-N-acetylmuramoylalanine-D-glutamate	IPR000967: Zn-finger, NF-X1 type(PF01422: zf-NF-X1), IPR001374: Single-stranded nucleic acid binding R3H(PF01424: R3H), IPR001374: Single-stranded nucleic acid binding R3H(SM00393: R3H), IPR000967: Zn-finger, NF-X1 type(SM00438: Znf_NFX)	6.3.2.-: Acid-D amino-acid ligases (peptide synthases), 6.3.2.-: Acid-D amino-acid ligases (peptide synthases)	Tryptophan metabolism: Tryptophan metabolism, Ubiquinone biosynthesis:	KOG1952: Transcription factor NF-X1, contains NFX-type Zn2+-binding and R3H domains	Transcription
57-104512-PM	39,72	6,61E-09	1	21,52	9,22E-08	1		IPR004274: NLI interacting factor(SM00577: CPDc)			KOG1605: TFIIIF-interacting CTD phosphatase, including NLI-interacting factor (involved in RNA polymerase II	Transcription
77-84558-PM	26,82	4,49E-08	1	28,43	3,49E-08	1	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC), GO:0008270: zinc ion binding(MF)	type(PF00096: zf-C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PSS0157: ZINC_FINGER_C2H2_2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PF00096: zf-C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PSS0157: ZINC_FINGER_C2H2_2).			KOG0562: Predicted hydrolase (HIT family)	Transcription
89-27513-PM	28,24	5,24E-05	1	43,82	1,28E-05	1	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC), GO:0008270: zinc ion binding(MF)	type(PF00096: zf-C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PSS0157: ZINC_FINGER_C2H2_2).			KOG0562: Predicted hydrolase (HIT family)	Transcription
58-82481-PM	85,5	1,11E-05	1	121,73	4,36E-06	1	GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0008270: zinc ion binding(MF)	IPR000571: Zn-finger, C-x8-C-x5-C-x3-H type(PF00842: zf-CCH1), IPR000571: Zn-finger, C-x8-C-x5-C-x3-H type(SM00356: Znf_C3H1)				Transcription
53-74309-PM	5,4	9,15E-07	1	5,98	4,20E-07	1	GO:0003700: transcription factor activity(MF), GO:0005622: intracellular(CC), GO:0006355: regulation of transcription, DNA-	IPR000379: Esterase/lipase/thioesterase(PSS0187: ESTERASE), IPR000843: Bacterial regulatory protein.				Transcription
58-84485-PM	12,54	4,18E-04	1	13,69	3,03E-04	1	GO:0003887: DNA-directed DNA polymerase activity(MF), GO:0003401: DNA polymerase activity(MF)		2.7.7.7: DNA-directed DNA polymerase., 2.7.7.7: DNA-directed DNA polymerase., 2.7.7.7: DNA-directed DNA polymerase.	Purine metabolism: Purine metabolism, DNA polymerase: DNA polymerase, Pyrimidine	KOG2732: DNA polymerase delta, regulatory subunit 55	Replication, recombination and repair

181-105719-PM	10,53	1,68E-04	1	6,36	1,52E-03	1	GO:0003896: DNA primase activity(MF), GO:0005558: alpha DNA polymerase:primase complex(CC), GO:0006269: DNA replication, synthesis of RNA primer(BP), GO:0003720: telomerase activity(MF), GO:0003724: RNA helicase activity(MF), GO:0003887: DNA-directed DNA	IPR007238: Eukaryotic-type DNA primase, large subunit(PF04104: DNA_primase_lrg)	2.7.7.-: Nucleotidyltransferases, 2.7.7.-: Nucleotidyltransferases.	DNA polymerase: DNA polymerase, Ubiquinone biosynthesis: Ubiquinone biosynthesis	KOG2267: Eukaryotic-type DNA primase, large subunit	Replication, recombination and repair
80-16864-PM	13,1	3,00E-03	1	8,12	1,19E-02	1	GO:0003677: DNA binding(MF), GO:0005524: ATP binding(MF), GO:0006270: DNA replication initiation(BP), GO:0008094: DNA-dependent ATPase activity(MF), GO:0005634: nucleus(CC), GO:0004003: ATP-dependent DNA helicase activity(MF), GO:0004004: ATP-dependent RN	IPR001208: MCM(PD001041: sp_Q8H0G9_TOBAC_Q8H0G9), IPR001208: MCM(PR01657: MCMFAMILY), IPR008045: MCM protein 2(PR01658: MCMPROTEIN2), IPR001208: MCM(PF00493: MCM), IPR001208: MCM(SM00350: MCM), IPR001208: MCM(PSS0051: MCM_2), IPR001208: MCM(PS00847: MCM_	3.6.1.3: Adenosinetriphosphatase.	Purine metabolism: Purine metabolism	KOG0477: DNA replication licensing factor, MCM2 component	Replication, recombination and repair
53-50965-PM	5,25	4,10E-03	1	5,74	2,80E-03	1	GO:0003910: DNA ligase (ATP) activity(MF), GO:0005524: ATP binding(MF), GO:0006270: DNA replication initiation(BP), GO:0008281: DNA repair(BP), GO:0006310: DNA recombination(BP), GO:0003677: DNA binding(MF), GO:0006270: DNA replication initiation(BP), GO:0008094: DN	IPR001208: MCM(PD001041: sp_CC47_YEAST_P38132), IPR001208: MCM(PR01657: MCMFAMILY), IPR008050: MCM protein 7(PR01663: MCMPROTEIN7), IPR001208: MCM(PF00493: MCM), IPR001208: MCM(SM00350: MCM), IPR003593: AAA ATPase(SM00382: AAA), IPR001208: MCM(PSS0051: M	3.6.1.3: Adenosinetriphosphatase.	Purine metabolism: Purine metabolism	KOG0482: DNA replication licensing factor, MCM7 component	Replication, recombination and repair
72-50273-PM	16,17	6,16E-04	1	23,46	1,86E-04	1	GO:0006270: DNA replication initiation(BP)	IPR003874: CDC45-like protein(PF02724: CDC45)			KOG2475: CDC45 (cell division cycle 45)-like protein	Replication, recombination and repair
127-61920-PM	24,52	1,64E-04	1	16,78	5,53E-04	1	GO:0003677: DNA binding(MF), GO:0006289: nucleotide-excision repair(BP)	IPR009400: REX1 DNA Repair(PF06331: REX1)			KOG3451: Uncharacterized conserved protein	Replication, recombination and repair
53-45741-PM	16,66	6,84E-06	1	9,94	7,05E-05	1	GO:0003743: translation initiation factor activity(MF), GO:0006446: regulation of translational initiation(BP)	IPR007316: Eukaryotic initiation factor 3, gamma subunit(PF04189: eIF3_gamma)			KOG1416: tRNA(1-methyladenosine) methyltransferase	Translation, ribosomal structure and biogenesis
59-51963-PM	9,46	2,72E-02	1	15,14	9,51E-03	1	GO:0003723: RNA binding(MF)	IPR001313: Pumilio/Puf RNA-binding(PF00806: PUF), IPR001313: Pumilio/Puf RNA-binding(SM00025: Pumilio), IPR001313: Pumilio/Puf RNA-binding(PSS0302: PUM_REPEATS), IPR001313: Pumilio/Puf RNA-binding(PSS0303: PUM_REP)			KOG1488: Translational repressor Pumilio/PUF3 and related RNA-binding proteins (Puf superfamily)	Translation, ribosomal structure and biogenesis
188-232108-PM	6,24	1,31E-02	1	5,12	2,44E-02	1	GO:0004808: tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylylate)-methyltransferase activity(MF), GO:0005737: cytoplasm(CC), GO:0008033: tRNA processing(BP)	methylaminomethyl-2-thiouridylylate)-methyltransferase(PF03054: RNA_Me_trans), IPR004506: tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylylate)-methyltransferase(TIGR00420: tRNA_Me_trans)	(5-methylaminomethyl-2-thiouridylylate)-methyltransferase.	IN: IN	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylylate)-methyltransferase	Translation, ribosomal structure and biogenesis
186-106188-PM	10,35	3,91E-03	1	5,66	2,42E-02	1	GO:0005509: calcium ion binding(MF)	IPR002048: Calcium-binding EF-hand(PS001018: EF_HAND)				Translation, ribosomal structure and biogenesis
82-232567-PM	41,72	3,16E-03	1	41,8	3,15E-03	1	GO:0000786: nucleosome(CC), GO:0003677: DNA binding(MF), GO:0005634: nucleus(CC), GO:0006334: nucleosome	IPR005819: Histone H5(PR00624: HISTONEH5), IPR005818: Histone H1/H5(PF00538: Linker_histone), IPR005818: Histone			KOG4012: Histone H1	Chromatin structure and dynamics
129-255601-PM	10,82	9,87E-09	1	6,98	1,81E-07	1	GO:0000786: nucleosome(CC), GO:0003677: DNA binding(MF), GO:0005634: nucleus(CC), GO:0006334: nucleosome assembly(BP)	IPR000558: Histone H2B(PD000497: sp_H2B_AGABI_P78567), IPR000558: Histone H2B(PR00621: HISTONEH2B), IPR007125: Histone core(PF00125: Histone), IPR000558: Histone H2B(SM00427: H2B), IPR007124:			KOG1744: Histone H2B	Chromatin structure and dynamics
69-238578-PM	19,14	3,14E-04	1	10,88	2,02E-03	1	GO:0003700: transcription factor activity(MF), GO:0005634: nucleus(CC), GO:0006335: regulation of transcription, DNA-dependent(BP)	IPR000976: Wilms' tumour protein(PR00049: WILMSTUMOUR)			Histone H3 (Lys4) methyltransferase complex, subunit SET1 and related methyltransferases. KOG1080: Histone H3 (Lys4)	Chromatin structure and dynamics
53-103192-PM	9,31	9,82E-04	1	10,19	6,95E-04	1	GO:0008270: zinc ion binding(MF)	type(PF01753: ZF-MYND), IPR002893: Zn-finger, MYND type(PSS0865: ZF_MYND_2), IPR002893: Zn-finger, MYND type(PS01360: ZF_MYND_1)			Predicted histone tail methylase containing SET domain	Chromatin structure and dynamics
96-237998-PM	11,13	2,00E-03	1	5,77	1,67E-02	1	GO:0005634: nucleus(CC), GO:0006270: zinc ion binding(MF), GO:0016568: chromatin modification(BP), GO:0018024: histone-lysine N-methyltransferase	IPR007728: Pre-SET(PF05033: PreSET)				Chromatin structure and dynamics
329-238935-PM	5,93	3,02E-02	1	7,4	1,66E-02	1					KOG4066: Cell growth regulatory protein CGR11	Chromatin structure and dynamics

113-103223-PM	19,85	4,62E-03	1	17,22	6,45E-03	1				Splicing coactivator SRM160/300, subunit SRM300	RNA processing and modification	
54-232813-PM	168,62	1,99E-11	1	126,22	5,00E-11	1				Splicing coactivator SRM160/300, subunit SRM300	RNA processing and modification	
141-86433-PM	8,66	9,31E-03	1	6,15	2,45E-02	1	GO:000154: rRNA modification(BP), GO:000179: rRNA (adenine-N6,N6-) dimethyltransferase activity(MF), GO:000849: rRNA methyltransferase activity(MF), GO:0006364: rRNA processing(BP), GO:0016433: rRNA (adenine) methyltransferase activity(MF), GO:0003880:	IPR001737: Ribosomal RNA adenine methylase transferase(PF00398: RnaAD), IPR001737: Ribosomal RNA adenine methylase transferase(SM00650: rADc), IPR011530: RRNA 16S rRNA dimethylase(TIGR00755: ksgA), IPR000051: SAM (and some other nucleotide) binding motif	2.1.1.-: Methyltransferases, 2.1.1.-: Methyltransferases, 2.1.1.-: Methyltransferases, 2.1.1.-: Methyltransferases, 2.1.1.-: Methyltransferases, 2.1.1.-: Methyltransferases	Androgen and estrogen metabolism: Androgen and estrogen metabolism: Aminophosphate metabolism: Purine and chlorophyll metabolism: Ubiquinone biosynthesis: His	KOG0820: Ribosomal RNA adenine dimethylase	RNA processing and modification
147-235639-PM	7,56	1,72E-02	1	5,48	4,04E-02	1				KOG1609: Protein involved in mRNA	RNA processing and modification	
101-69253-PM	6,92	1,93E-02	1	9,92	7,02E-03	1	GO:0016787: hydrolase activity(MF)	IPR004843: Metallophosphoesterase(PF00149: Metallophos), IPR004843: Metallophosphoesterase(PSS0185:			KOG4419: 5' nucleotidase	Nucleotide transport and metabolism
124-83117-PM	16,37	9,85E-07	1	11,38	5,83E-06	1	GO:0004748: ribonucleoside-diphosphate reductase activity(MF), GO:0009186: deoxyribonucleoside diphosphate metabolic process(BP)	IPR000358: Ribonucleotide reductase(PF00268: Ribonuc_red_sm), IPR000358: Ribonucleotide reductase(PS00368: RIBORED_SMALL)	Ribonucleoside diphosphate reductase, 1.17.4.1: Ribonucleoside diphosphate reductase.	metabolism: Pyrimidine metabolism, Purine metabolism: Purine metabolism	KOG1567: Ribonucleotide reductase, beta subunit	Nucleotide transport and metabolism
149-39575-PM	45,4	2,72E-04	1	24,38	1,35E-03	1	GO:0009117: nucleotide metabolic process(BP), GO:0016787: hydrolase activity(MF), GO:0046080: dUTP metabolic process(BP), GO:0004170: dUTP diphosphatase activity(MF)	Deaminase(PD004900: dea_DUT_AERPE_Q9YG32), IPR008180: DeoxyUTP pyrophosphatase(PF00692: dUTPase), IPR008181: DeoxyUTP pyrophosphatase, subfamily	3.6.1.23: dUTP pyrophosphatase.	Pyrimidine metabolism: Pyrimidine metabolism	KOG3370: dUTPase	Nucleotide transport and metabolism
134-16934-PM	17,44	2,15E-02	1	11,72	4,36E-02	1		preferring nucleoside hydrolase(PD007736: sp_Q9P6J4_SCHPO_Q9P6J4), IPR001910: Inosine/uridine-preferring nucleoside hydrolase(PF01156: I_U_nuc_hydro), IPR001910: Inosine/uridine-preferring nucleoside hydrolase(PS01247:		metabolism: Purine metabolism, Nicotinate and nicotinamide metabolism: Nicotinate and nicotinamide metabolism	KOG2938: Predicted inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	Nucleotide transport and metabolism
57-230453-PM	14,61	3,17E-03	1	13,08	4,31E-03	1	GO:0004081: bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase (asymmetrical) activity(MF)	IPR001310: Histidine triad (HIT) protein(PF01230: HIT), IPR001310: Histidine triad (HIT) protein(PS00892: HIT)	3.6.1.17: Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase (asymmetrical)	Pyrimidine metabolism: Purine metabolism: Purine metabolism	KOG3379: Diadenosine polyphosphate hydrolase and related proteins of the histidine triad (HIT) family	Nucleotide transport and metabolism
152-75631-PM	5,5	1,88E-06	1	5,79	1,28E-06	1	GO:0004748: ribonucleoside-diphosphate reductase activity(MF), GO:0005971: ribonucleoside-diphosphate reductase complex(CC), GO:0006260: DNA replication(BP)	IPR000788: Ribonucleotide reductase large subunit(PR01183: RIBORDTASEM1), IPR000788: Ribonucleotide reductase large subunit(PF00317: Ribonuc_red_lgH), IPR000788: Ribonucleotide reductase large subunit(PF02867: Ribonuc_red_lgC), IPR005144: ATP-conn(PF03477			KOG1112: Ribonucleotide reductase, alpha subunit	Nucleotide transport and metabolism
61-71199-PM	8,31	2,30E-05	1	13,83	1,65E-06	1	GO:0008703: 5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase activity(MF), GO:0009231: riboflavin biosynthetic process(BP)	IPR002734: Bacterial bifunctional deaminase-reductase, C-terminal(PF01872: RibD_C)	1.1.1.193: 5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase.	Riboflavin metabolism: Riboflavin metabolism	KOG1018: Cytosine deaminase FCY1 and related enzymes	Nucleotide transport and metabolism
315-52752-PM	19,23	1,66E-02	1	14,91	2,66E-02	1	GO:0016787: hydrolase activity(MF), GO:0008892: guanine deaminase activity(MF)	IPR006680: Amidohydrolase(PF01979: Amidohydro_1)	3.5.4.3: Guanine deaminase.	Purine metabolism: Purine metabolism	KOG3968: Atrazine chlorohydrolase/guanine deaminase, KOG3968: Atrazine chlorohydrolase	Nucleotide transport and metabolism
53-105393-PM	9,77	4,04E-02	1	16	1,52E-02	1	GO:0004115: 3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase activity(MF), GO:0006198: cAMP catabolic process(BP), GO:0004114: 3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity(MF), GO:0051342: regulation of cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity(BP)	IPR011563: Cyclic-AMP phosphodiesterase/lactamase(PD010003: sp_CPDP_VIBFI_Q56886), IPR000396: Cyclic-AMP phosphodiesterase, class-II(PR00388: PDIESTERASE2), IPR000396: Cyclic-AMP phosphodiesterase, class-II(PF02112: PDIEase_II), IPR000396: Cyclic-AMP phos	3.1.4.17: 3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase.	Purine metabolism: Purine metabolism	KOG4475: Inorganic ion transport and metabolism	Nucleotide transport and metabolism
423-108300-PM	18	1,55E-04	1	10,17	1,20E-03	1		IPR000345: Cytochrome c heme-binding site(PS00190: CYTOCHROME_C)			KOG4475: FOG: Immunoglobulin and related proteins, FOG: Immunoglobulin	Inorganic ion transport and metabolism

89-68532-PM	9,51	6,66E-03	1	15,59	1,54E-03	1	GO:0008152: metabolic process(BP), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF), GO:0000140: acylglycerone-phosphate reductase activity(MF)	IPR002198: Short-chain dehydrogenase/reductase SDR(PR00080: SDRFAMILY), IPR002347: Glucose/ribitol dehydrogenase(PR00081: GDHRDH), IPR002198: Short-chain dehydrogenase/reductase SDR(PF00000: SDRFAMILY)	1.1.1.101: Acylglycerone-phosphate reductase.	IN: IN	KOG1209: 1-Acyl dihydroxyacetone phosphate reductase and related dehydrogenases	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
170-113902-PM	7,38	4,04E-08	1	5,23	5,60E-07	1	GO:005524: ATP binding(MF), GO:0006810: transport(BP), GO:0016021: integral to membrane(CC), GO:0042626: ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances(MF), GO:0016887: ATPase activity(MF), GO:0000166: nucleotide binding(MF), GO:0017111	IPR003439: ABC transporter(PD000006: sp_Q9Z7R2_ARATH_Q9Z7R2), IPR003439: ABC transporter(PF00005: ABC_tran), IPR001140: ABC transporter, transmembrane region(PF00664: ABC_membrane), IPR003593: AAA ATPase(SM00382: AAA), IPR003439: ABC transporter(PSS0100:			KOG0055: Multidrug/phenolone exporter, ABC superfamily	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
71-52512-PM	6,4	5,41E-06	1	7,58	1,80E-06	1	GO:005524: ATP binding(MF), GO:0006810: transport(BP), GO:0016021: integral to membrane(CC), GO:0042626: ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances(MF), GO:0016887: ATPase activity(MF), GO:0000166: nucleotide binding(MF), GO:0017111	IPR003439: ABC transporter(PD000006: sp_Q43138_ASPFL_Q43138), IPR003439: ABC transporter(PF00005: ABC_tran), IPR001140: ABC transporter, transmembrane region(PF00664: ABC_membrane), IPR003593: AAA ATPase(SM00382: AAA), IPR003439: ABC transporter(PSS0100:			KOG0055: Multidrug/phenolone exporter, ABC superfamily	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
73-83897-PM	5,96	1,45E-05	1	9,76	6,75E-07	1	GO:0008152: metabolic process(BP), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF), GO:0004344: glucose dehydrogenase activity(MF), GO:0018446: pinocarveol dehydrogenase activity(MF), GO:0018447: chloral hydrate dehydrogenase activity(MF), GO:0018448: hydroxymeth	IPR002198: Short-chain dehydrogenase/reductase SDR(PR00080: SDRFAMILY), IPR002347: Glucose/ribitol dehydrogenase(PR00081: GDHRDH), IPR002198: Short-chain dehydrogenase/reductase SDR(PF00000: SDRFAMILY)	1.1.-.-: Acting on the CH-OH group of donors, 1.1.-.-: Acting on the CH-OH group of donors.	Benzoate degradation via CoA ligation: Benzoate degradation via CoA ligation, Ethylbenzene degradation, Ethylbenzene degradation	KOG1201: Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 11	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
180-50319-PM	13,13	2,24E-02	1	13,77	2,03E-02	1	GO:005524: ATP binding(MF), GO:0016887: ATPase activity(MF), GO:0000166: nucleotide binding(MF), GO:0017111: nucleoside-triphosphatase activity(MF)	IPR003439: ABC transporter(PD000006: sp_P5B1_THETN_Q8RCU0), IPR003439: ABC transporter(PF00005: ABC_tran), IPR003593: AAA ATPase(SM00382: AAA), IPR003439: ABC transporter(PSS0100: DA_BOX), IPR001687: ATP/GTP-binding site motif A (P-loop)(PSS010:			KOG0061: Transporter, ABC superfamily (Breast cancer resistance protein)	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
71-70782-PM	16,43	2,87E-07	1	21,83	7,45E-08	1		IPR007715: Coenzyme Q biosynthesis Coq4(PF05019: Coq4)			KOG3244: Protein involved in ubiquinone biosynthesis	Coenzyme transport and metabolism
71-78041-PM	6,01	1,08E-04	1	9,95	6,44E-06	1					KOG3221: Glycolipid transfer protein	Carbohydrate transport and metabolism
273-106824-PM	19,15	2,66E-05	1	24,69	1,01E-05	1	GO:005215: transporter activity(MF), GO:0006810: transport(BP), GO:0016021: integral to membrane(CC)	IPR007114: Major facilitator superfamily(PSS0850: MFS)			KOG2504: Monocarboxylate transporter	Carbohydrate transport and metabolism
174-84024-PM	30,12	1,23E-04	1	15,29	1,01E-03	1		IPR005887: Alpha-1,2-mannosidase, putative(TIGR01180: aman2_put)				Carbohydrate transport and metabolism
484-233414-PM	10,1	8,34E-04	1	16,53	1,32E-04	1	GO:0004650: polygalacturonase activity(MF), GO:0005975: carbohydrate metabolic process(BP)	IPR000743: Glycoside hydrolase, family 28(PF00295: Glyco_hydro_28), IPR006626: Parallel beta-helix repeat(SM00710: PbH1), IPR000743: Glycoside hydrolase, family 28(PS00502: POLYGALACTURONASE)	3.2.1.15: Polygalacturonase, 3.2.1.15: Polygalacturonase.	Pentose and glucuronate interconversions: Pentose and glucuronate interconversions, Starch and sucrose metabolism: Starch and sucrose metabolism, Cyanoamino acid metabolism: Cyanoamino acid metabolism, Flavonoids, stilbene and lignin		Carbohydrate transport and metabolism
72-62973-PM	12,76	6,85E-09	1	9,3	4,73E-08	1	GO:0004553: hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds(MF), GO:0005975: carbohydrate metabolic process(BP), GO:0008422: beta-glucosidase activity(MF)	IPR001764: Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal(PR00133: GLHYDLASE3), IPR001764: Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal(PF00933: Glyco_hydro_3), IPR002772: Glycoside hydrolase, family 3, C-terminal(PF01915: Glyco_hydro_3_C)	3.2.1.21: Beta-glucosidase, 3.2.1.21: Beta-glucosidase.	sucrose metabolism: Starch and sucrose metabolism, Cyanoamino acid metabolism: Cyanoamino acid metabolism, Flavonoids, stilbene and lignin		Carbohydrate transport and metabolism
186-52101-PM	6,79	4,14E-02	1	11,81	1,13E-02	1	metabolic process(BP), GO:0016758: transferase activity, transferring hexosyl groups(MF), GO:0030249: carbohydrate binding(MF), GO:0030259: lipid glycosylation(BP), GO:0004577: N-acetylglucosaminyl(diphosphodolichol of N-acetylglucosa	IPR0007235: Glycosyltransferase 28, C-terminal(PF04101: Glyco_tran_28_C)	2.4.1.141: N-acetylglucosaminyl(diphosphodolichol N-acetylglucosaminyltransferase.	N-Glycans biosynthesis: N-glycans biosynthesis	KOG3349: Predicted glycosyltransferase	Carbohydrate transport and metabolism
76-257519-PM	16,08	5,97E-06	1	23,64	1,14E-06	1	GO:0003824: catalytic activity(MF), GO:0004766: spermidine synthase activity(MF)	IPR001045: Spermine synthase(PF01564: Spermine_synth), IPR005097: Saccharopine dehydrogenase(PF03435: Saccharop_deh), IPR001045: Spermine synthase(TIGR00417: speE), IPR000051: SAM (and some other nucleotide) binding motif(PSS0193: SAM_BIND), IPR001045: Spe	2.5.1.16: Spermidine synthase, 2.5.1.16: Spermidine synthase, 2.5.1.16: Spermidine synthase.	metabolism of amino groups: Urea cycle and metabolism of amino groups, beta-Alanine metabolism: beta-Alanine metabolism, Arginine and proline metabolism: Arginine and	KOG0172: Lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase	Amino acid transport and metabolism
85-82277-PM	6,88	1,27E-02	1	13,34	1,62E-03	1	GO:0008152: metabolic process(BP), GO:0016829: lyase activity(MF)	synthetase(PD001859: sp_Q977P8_THELL_Q977P8), IPR002220: Dihydrodipicolinate synthetase(PR00146: DHPICSNTHASE), IPR002220: Dihydrodipicolinate				Amino acid transport and metabolism
295-60832-PM	53,61	6,91E-06	1	31,78	3,60E-05	1	GO:0008115: sarcosine oxidase activity(MF)	IPR000205: NAD-binding site(PSS0205: NAD_BINDING)	1.5.3.1: Sarcosine oxidase.	Glycine, serine and threonine metabolism: Glycine, serine and threonine metabolism	KOG2820: FAD-dependent oxidoreductase	Amino acid transport and metabolism

75-258445-PM	5,27	1,11E-05	1	9,84	1,77E-07	1	GO:0004608: phosphatidylethanolamine N-methyltransferase activity(MF)		2.1.1.17: Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase.	Glycine, serine and threonine metabolism: Glycine, serine and threonine metabolism	Amino acid transport and metabolism	
168-33461-PM	6,65	8,68E-05	1	5,53	2,48E-04	1	GO:0004414: homoserine O-acetyltransferase activity(MF), GO:0009086: methionine biosynthetic process(BP), GO:0005737: cytoplasm(CC), GO:0016413: O-acetyltransferase activity(MF)	IPR000073: Alpha/beta hydrolase fold(PF00561: Abhydrolase_1), IPR008220: Homoserine acetyltransferase(PHRSF000443: Homoserine acetyltransferase), IPR006296: Homoserine O-acetyltransferase(TIGR01392: homoserO_Ac_tm)	2.3.1.31: Homoserine O-acetyltransferase, 2.3.1.31: Homoserine O-acetyltransferase.	Sulfur metabolism: Sulfur metabolism, Methionine metabolism: Methionine metabolism	Amino acid transport and metabolism	
69-80416-PM	6,99	6,37E-04	1	5,9	1,40E-03	1	GO:0004497: monooxygenase activity(MF), GO:0005506: iron ion binding(MF), GO:0006118: electron transport(BP), GO:0020037: heme binding(MF), GO:0050381: unspecific monooxygenase activity(MF)	IPR001128: Cytochrome P450(PR00385: P450), IPR002401: E-class P450_group I(PR00463: EP450), IPR001128: Cytochrome P450(PF00067: p450)	1.14.14.1: Unspecific monooxygenase, e., 1.14.14.1: Unspecific monooxygenase, e., 1.14.14.1: Unspecific monooxygenase, e.	metabolism: Tryptophan metabolism, Fatty acid metabolism: Fatty acid metabolism, gamma-Hexachlorocyclohexane degradation: gamma-Hexachlorocyclohexane	KOG0157: Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies, KOG0157: Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies	Lipid transport and metabolism
91-69185-PM	8,57	6,48E-05	1	6,12	3,67E-04	1	GO:0005506: iron ion binding(MF), GO:0006118: electron transport(BP), GO:0020037: heme binding(MF), GO:0050381: unspecific monooxygenase activity(MF)	IPR000379: Esterase/lipase/thioesterase(PS50187: ESTERASE)			Lipid transport and metabolism	
66-85175-PM	20,29	1,12E-08	1	14,18	7,01E-08	1	GO:0005506: iron ion binding(MF), GO:0006118: electron transport(BP), GO:0020037: heme binding(MF), GO:0050381: unspecific monooxygenase activity(MF)	IPR000379: Esterase/lipase/thioesterase(PS50187: ESTERASE)			Lipid transport and metabolism	
62-104084-PM	10,06	2,17E-04	1	13,64	6,00E-05	1	GO:0005488: binding(MF)	IPR000568: Lipocalin-related protein and Bos/Can/Egu allergen(PS00213: LIPOCALIN)			Lipid transport and metabolism	
105-256303-PM	14,72	1,19E-07	1	10,21	8,76E-07	1	GO:0010181: FMN binding(MF), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF)	IPR008254: Flavodoxin/nitric oxide synthase(PF00258: Flavodoxin_1), IPR008254: Flavodoxin/nitric oxide synthase(PS50902: FLAVODOXIN_LIKE)			Metabolism	
80-107621-PM	6,18	1,78E-02	1	6,33	1,66E-02	1	GO:0010181: FMN binding(MF), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF)	IPR008254: Flavodoxin/nitric oxide synthase(PF00258: Flavodoxin_1), IPR008254: Flavodoxin/nitric oxide synthase(PS50902: FLAVODOXIN_LIKE)			Metabolism	
68-49240-PM	5,44	2,36E-02	1	7,87	7,64E-03	1	GO:0010181: FMN binding(MF), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF)	IPR008254: Flavodoxin/nitric oxide synthase(PF00258: Flavodoxin_1), IPR008254: Flavodoxin/nitric oxide synthase(PS50902: FLAVODOXIN_LIKE)			Metabolism	
84-71943-PM	8,86	1,68E-02	1	6,17	4,09E-02	1	GO:0010181: FMN binding(MF), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF)	IPR008254: Flavodoxin/nitric oxide synthase(PF00258: Flavodoxin_1), IPR008254: Flavodoxin/nitric oxide synthase(PS50902: FLAVODOXIN_LIKE)			Metabolism	
54-258918-PM	10,87	1,23E-02	1	8,4	2,31E-02	1	GO:0003824: catalytic activity(MF), GO:0004402: histone acetyltransferase activity(MF)	phosphohydrolase, HD subdomain(PF01966: HD), IPR003607: Metal-dependent phosphohydrolase, HD region(SM00471: HDc)	2.3.1.48: Histone acetyltransferase.	W: W	Metabolism	
382-110430-PM	10,53	2,75E-02	1	15,05	1,30E-02	1	GO:0006605: protein targeting(BP), GO:0006886: intracellular protein transport(BP), GO:0016020: membrane(CC)	IPR001901: Protein secE/secY gamma protein(PS01067: SECE_SEC61G)			Nuclear structure	
91-84148-PM	12,22	4,33E-03	1	8,33	1,27E-02	1	GO:0006605: protein targeting(BP), GO:0006886: intracellular protein transport(BP), GO:0016020: membrane(CC)	IPR001901: Protein secE/secY gamma protein(PS01067: SECE_SEC61G)			Nuclear structure	
130-82485-PM	5,69	2,46E-03	1	5,32	3,29E-03	1	GO:0006605: protein targeting(BP), GO:0006886: intracellular protein transport(BP), GO:0016020: membrane(CC)	IPR001901: Protein secE/secY gamma protein(PS01067: SECE_SEC61G)			Signal transduction mechanisms	
77-112167-PM	39,14	3,06E-07	1	19,68	4,61E-06	1	GO:0006605: protein targeting(BP), GO:0006886: intracellular protein transport(BP), GO:0016020: membrane(CC)	IPR000637: HMG-I and HMG-Y, DNA-binding(PF02178: AT_hook), IPR000637: HMG-I and HMG-Y, DNA-binding(SM00384: AT_hook)			Signal transduction mechanisms	
158-238484-PM	6,21	2,19E-07	1	5,32	7,27E-07	1	GO:0006605: protein targeting(BP), GO:0006886: intracellular protein transport(BP), GO:0016020: membrane(CC)	transporter OPT superfamily(PF03169: OPT), IPR004648: Tetrapeptide transporter, OPT1/isp4(TIGR00727: ISP4_OPT), IPR004813:			Signal transduction mechanisms	
58-83992-PM	6,45	5,23E-07	1	7,18	2,45E-07	1	GO:0006605: protein targeting(BP), GO:0006886: intracellular protein transport(BP), GO:0016020: membrane(CC)	IPR006716: ERG2 and sigma1 receptor-like protein(PF04622: ERG2_Sigma1R)			Signal transduction mechanisms	
84-84101-PM	31,85	6,64E-12	1	38,43	2,84E-12	1	GO:0042309: homothermy(BP), GO:0050825: ice binding(MF), GO:0050826: response to freezing(BP)	IPR000104: Antifreeze protein, type I(PR00308: ANTIFREEZEI)			Signal transduction mechanisms	
77-255175-PM	28,83	3,48E-02	1	48,64	1,68E-02	1	GO:0007050: cell cycle arrest(BP)	IPR0003108: Growth-arrest-specific protein 2(PF02187: GAS2), IPR0003108: Growth-arrest-specific protein 2(SM00243: GAS2)			Signal transduction mechanisms	
53-102661-PM	6,48	1,28E-05	1	5,23	5,16E-05	1	GO:0007050: cell cycle arrest(BP)	IPR0003108: Growth-arrest-specific protein 2(PF02187: GAS2), IPR0003108: Growth-arrest-specific protein 2(SM00243: GAS2)			Signal transduction mechanisms	
54-85611-PM	6,12	1,20E-05	1	5,52	2,37E-05	1	GO:0007050: cell cycle arrest(BP)	IPR010916: TonB box, N-terminal(PS00430: TONB_DEPENDENT_REC_1)			Signal transduction mechanisms	
180-104106-PM	70,19	2,77E-03	1	49,46	5,16E-03	1	GO:0007050: cell cycle arrest(BP)	IPR001680: G-protein beta WD-40 repeat(PF00400: WD40)			Signal transduction mechanisms	
81-106486-PM	5,99	2,97E-02	1	5,53	3,67E-02	1	GO:0005515: protein binding(MF)	IPR0000210: BTB/POZ(PS50097: BTB)			Signal transduction mechanisms	
56-62348-PM	27,49	4,69E-05	1	19,21	1,58E-04	1	GO:0005509: calcium ion binding(MF)	IPR002048: Calcium-binding EF-hand(PD000012: sp_074435_SCHBD_074435)			Signal transduction mechanisms	
166-256712-PM	34,27	1,33E-04	1	27,14	2,64E-04	1	GO:0005509: calcium ion binding(MF)	IPR002048: Calcium-binding EF-hand(PD000012: sp_074435_SCHBD_074435)			Defense mechanism	

Anhang

85-70333-PM	9,19	7,17E-08	1	11,35	1,94E-08	1	GO:0004672: protein kinase activity(MF), GO:0005524: ATP binding(MF), GO:0006468: protein amino acid phosphorylation(BP), GO:0004713: protein-tyrosine kinase activity(MF), GO:0004674: protein serine/threonine kinase activity(MF), GO:0004675: transmembrane	IPR000719: Protein kinase(PD000001: sp_Q9W623_XENLA_Q9W623), IPR000719: Protein kinase(PF00069: Pkinase), IPR001245: Tyrosine protein kinase(SM00219: TyrKc), IPR002290: Serine/threonine protein kinase(SM00220: S_TKc), IPR000719: Protein kinase(PSS0011: P			KOG1826: Ras GTPase activating protein RasGAP/neurofibromin	Defense mechanism
69-53882-PM	258,19	1,66E-06	1	299,73	1,18E-06	1	GO:0045551: cinnamyl-alcohol dehydrogenase activity(MF)		1.1.1.195: Cinnamyl-alcohol dehydrogenase	stilbene and lignin biosynthesis: Flavonoids, stilbene and lignin	KOG1592: Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase	Defense mechanism
365-36451-PM	149,41	2,35E-06	1	179,18	1,49E-06	1	GO:0005509: calcium ion binding(MF), GO:0006508: proteolysis(BP), GO:0008233: peptidase activity(MF)	IPR007484: Peptidase M28(PF04389: Peptidase_M28), IPR0012048: Calcium-binding EF-hand(P500018: EF_HAND)	3.4.11.10: Bacterial leucyl aminopeptidase	IN: IN	KOG2195: Transferrin receptor and related proteins containing the protease-associated (PA) domain, KOG2195: Transferrin receptor and related proteins containing the	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
117-231461-PM	11,28	1,62E-07	1	13,14	6,85E-08	1		IPR001440: TPR repeat(P50010: TPR), IPR001440: TPR repeat(SM00028: TPR), IPR001440: TPR repeat(PSS0005: TPR_REPEAT), IPR001440: TPR repeat(PSS0293: TPR_REGION)			KOG0548: Molecular chaperone STH1	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
85-255047-PM	6,42	8,94E-07	1	5,09	4,91E-06	1	GO:0006508: proteolysis(BP), GO:0008236: serine-type peptidase activity(MF), GO:0008234: cysteine-type peptidase activity(MF)	IPR008758: Peptidase S28(PF05577: Peptidase_S28)	3.4.-.-: Acting on peptide bonds (peptide hydrolases), 3.4.-.-: Acting on peptide bonds (peptide hydrolases)	Biotin metabolism: Lysine degradation: Lysine degradation	KOG2182: Hydrolytic enzymes of the alpha/beta hydrolase fold, KOG2182: Hydrolytic enzymes of the alpha/beta	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
180-15001-PM	5,76	3,93E-02	1	7,15	2,25E-02	1	GO:0006508: proteolysis(BP), GO:0008236: serine-type peptidase activity(MF), GO:0008234: cysteine-type peptidase activity(MF)	IPR008758: Peptidase S28(PF05577: Peptidase_S28), IPR000379: Esterase/lipase/thioesterase(P550187: ESTERASE)	3.4.-.-: Acting on peptide bonds (peptide hydrolases), 3.4.-.-: Acting on peptide bonds (peptide hydrolases)	Biotin metabolism: Lysine degradation: Lysine degradation	KOG2182: Hydrolytic enzymes of the alpha/beta hydrolase fold	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
66-52108-PM	9,73	1,36E-08	1	7,34	9,17E-08	1	GO:0004222: metalloendopeptidase activity(MF), GO:0006508: proteolysis(BP)	IPR001384: Peptidase M35, deuterolysin(IPR00768: DEUTEROLYSIN)				Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
55-78645-PM	6,73	5,69E-03	1	9,63	1,57E-03	1		fungalsin(IPR00999: FUNGALYSIN), IPR001842: Peptidase M36, fungalsin(PF02128: FUNGALYSIN)				Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
182-231899-PM	11,65	1,12E-03	1	5,96	1,12E-02	1		IPR006640: Proteins of unknown function SprT(SM00731: SprT)			KOG3884: SPRT-like metalloprotease	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
273-234370-PM	11,99	8,91E-04	1	14,35	4,77E-04	1		IPR003900: RepA / Rep+ protein KID(PF02524: KID)			KOG0161: Myosin class II heavy chain	Cytoskeleton
145-112035-PM	21,35	3,97E-04	1	11,84	2,47E-03	1		ANKYRIN, IPR002110: Ankyrin(PF00023: Ank), IPR002110: Ankyrin(SM00248: ANK), IPR002110: Ankyrin(PSS0088: ANK_REPEAT), IPR002110: Ankyrin(PSS0297: ANK_REPEAT)			KOG0510: Ankyrin repeat protein	Cytoskeleton
86-107203-PM	75,11	7,71E-12	1	59,89	1,82E-11	1		IPR002110: Ankyrin(PR01415: ANKYRIN)				Cytoskeleton
78-70937-PM	12,02	4,32E-03	1	11,72	4,65E-03	1					KOG4042: Dynactin subunit p27/NWS-3, involved in transport of organelles along microtubules,	cell wall
311-70088-PM	5,71	3,28E-02	1	6,94	1,94E-02	1					Phosphatidylethanolamine binding protein	cell wall
89-64227-PM	35,97	1,04E-03	1	44,53	6,28E-04	1		IPR005629: Protein of unknown function DUF338(PF03935: SKN1)				cell wall
67-112004-PM	6,26	1,31E-02	1	11,22	1,98E-03	1	GO:0016021: integral to membrane(CC)	IPR000612: Protein of unknown function UPF0057(PF01679: UPF0057)			KOG1773: Stress responsive protein	stress response
73-69593-PM	7,95	2,09E-04	1	6,56	5,30E-04	1	GO:0008152: metabolic process(BP), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF), GO:0046872: metal ion binding(MF), GO:0004022: alcohol dehydrogenase activity(MF), GO:0004023: alcohol dehydrogenase activity, metal ion-independent(MF), GO:0004024: alcohol dehydrogenase activity(MF)	IPR001670: Iron-containing alcohol dehydrogenase(PF00465: FeADH), IPR001670: Iron-containing alcohol dehydrogenase(P500060: ADH_IRON_2)	1.1.1.1: Alcohol dehydrogenase e., 1.1.1.1: Alcohol dehydrogenase e., 1.1.1.1: Alcohol dehydrogenase e., 1.1.1.1: Alcohol dehydrogenase e., 1.1.1.1: Alcohol dehydrogenase e.	steroid biosynthesis: Bile acid biosynthesis, Tyrosine metabolism: Tyrosine metabolism, Glycerolipid metabolism: Glycerolipid metabolism, Glycolysis: Gluconeogenesis: Gluconeogenesis, Fatty acid	KOG3857: Alcohol dehydrogenase class IV	stress response
176-235099-PM	7,95	2,97E-04	1	6,08	1,05E-03	1	GO:0008270: zinc ion binding(MF), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF), GO:0032440: 2-alkenal reductase activity(MF)	IPR002085: Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily(PF00107: ADH_zinc_N)			KOG1196: Predicted NAD-dependent oxidoreductase	stress response

124-12886-PM	9,31	1,77E-03	1	6,15	7,81E-03	1	GO:0004030: aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] activity(MF)	IPR002086: Aldehyde dehydrogenase(PF0171: Aldedh), IPR002086: Aldehyde dehydrogenase(PS00687: ALDEHYDE_DEHYDR_GLU)	1.2.1.5: Aldehyde dehydrogenase (NAD(P)+), 1.2.1.5: Aldehyde dehydrogenase (NAD(P)+), 1.2.1.5: Aldehyde dehydrogenase (NAD(P)+), 1.2.1.5: Aldehyde dehydrogenase (NAD(P)+)	Tyrosine metabolism: Tyrosine metabolism, Glycolysis / Gluconeogenesis: Tyrosine metabolism, Phenylalanine metabolism: Phenylalanine metabolism, Histidine metabolism:	KOG2450: Aldehyde dehydrogenase	stress response
90-85704-PM	9,45	1,95E-05	1	5,25	4,68E-04	1	GO:0031072: heat shock protein binding(MF), GO:0016787: hydrolase activity(MF)	IPR002925: Dienelactone hydrolase(PF01738: DLH), IPR001623: Heat shock protein DnaJ, N-terminal(PS00636: DNAJ_1)			Predicted hydrolase related to dienelactone hydrolase	stress response
567-256344-PM	22,66	1,53E-05	1	33,4	3,68E-06	1	GO:0004934: mating-type alpha-factor pheromone receptor activity(MF), GO:0016020: membrane(CC), GO:0004932: mating-type factor pheromone receptor activity(MF), GO:0007186: G-protein coupled receptor protein signaling pathway(BP), GO:0016021: integral m	IPR001499: Fungal pheromone STE3 GPCR(IPR00899: GPCRSTE3), IPR000481: Pheromone B alpha-1 receptor(IPR00901: PHEROMONEBAR), IPR001499: Fungal pheromone STE3 GPCR(PF02076: STE3)				mating
102-80832-PM	14,39	2,08E-04	1	11	5,73E-04	1		IPR002791: Protein of unknown function DUF89(PF01937: DUF89)			Uncharacterized conserved protein	Funktion unbekannt
171-50210-PM	5,54	3,95E-04	1	7,34	8,53E-05	1		IPR005176: Protein of unknown function DUF298(PF03556: DUF298), IPR010916: TonB box, N-terminal(PS00430)			KOG3077: Uncharacterized conserved protein	Funktion unbekannt
87-112677-PM	118,7	2,19E-06	1	163,64	9,37E-07	1						hypothetisches Protein
157-15231-PM	51,6	4,85E-04	1	59,16	3,52E-04	1						hypothetisches Protein
90-48683-PM	15,65	2,18E-04	1	17,4	1,49E-04	1						hypothetisches Protein
148-105405-PM	5,21	6,47E-03	1	8,04	1,11E-03	1						hypothetisches Protein
99-110438-PM	6,91	7,77E-03	1	8,95	3,26E-03	1						hypothetisches Protein
64-104205-PM	11,57	3,51E-08	1	15,41	6,98E-09	1						hypothetisches Protein
131-64678-PM	10,61	6,56E-03	1	5,83	3,35E-02	1						hypothetisches Protein
164-266279-PM	16,73	3,05E-07	1	17,52	2,44E-07	1						hypothetisches Protein
61-86084-PM	9,42	1,49E-04	1	9,55	1,40E-04	1						hypothetisches Protein
81-85374-PM	8,92	3,93E-07	1	10,38	1,57E-07	1						hypothetisches Protein
62-234427-PM	7,17	1,34E-02	1	8,04	9,57E-03	1						hypothetisches Protein
58-84507-PM	7,65	8,10E-08	1	7,53	9,09E-08	1					KOG2812: Uncharacterized conserved protein	hypothetisches Protein
105-103628-PM	13,53	2,82E-02	1	11,79	3,63E-02	1						hypothetisches Protein
64-103746-PM	17,21	3,66E-05	1	13,37	8,42E-05	1						hypothetisches Protein
237-103277-PM	15,36	8,00E-04	1	10,66	2,61E-03	1						hypothetisches Protein
105-84402-PM	6,93	9,75E-03	1	7,93	6,35E-03	1						hypothetisches Protein
53-112113-PM	26,9	1,84E-03	1	15,46	7,00E-03	1						hypothetisches Protein
143-111905-PM	14,19	5,01E-03	1	10,04	1,23E-02	1						hypothetisches Protein
59-85186-PM	50,23	1,02E-09	1	27,21	1,31E-08	1						hypothetisches Protein
108-106716-PM	17,11	7,31E-03	1	19,48	5,43E-03	1						hypothetisches Protein
294-112680-PM	5,71	3,56E-02	1	10,84	6,19E-03	1						hypothetisches Protein
98-49470-PM	8,1	3,61E-04	1	9,45	1,80E-04	1						hypothetisches Protein
83-104691-PM	7,36	2,47E-02	1	14,61	4,14E-03	1						hypothetisches Protein
71-85633-PM	7,15	1,88E-02	1	13,63	3,07E-03	1						hypothetisches Protein
309-106146-PM	70,4	1,13E-05	1	87,73	6,11E-06	1						hypothetisches Protein
95-39280-PM	18,03	1,83E-05	1	10,54	1,71E-04	1						hypothetisches Protein
67-234008-PM	7,73	8,71E-05	1	6,64	1,93E-04	1						hypothetisches Protein
116-102788-PM	18,26	6,58E-03	1	20,92	4,82E-03	1						hypothetisches Protein
207-10699-PM	10,46	5,90E-08	1	7,47	5,04E-07	1						hypothetisches Protein
252-236792-PM	13,01	3,57E-04	1	8,36	1,86E-03	1						hypothetisches Protein
204-104160-PM	6,38	1,17E-02	1	5,88	1,51E-02	1		IPR002818: ThJ/Pip(PF01965: DJ-1_Pip)				hypothetisches Protein
58-83864-PM	61,23	7,76E-06	1	80,18	3,54E-06	1						hypothetisches Protein
183-231457-PM	8,08	5,41E-03	1	7,61	6,58E-03	1						hypothetisches Protein
85-11822-PM	6,27	1,07E-02	1	9,11	3,06E-03	1						hypothetisches Protein
114-45487-PM	19,07	8,67E-03	1	14,55	1,54E-02	1						hypothetisches Protein
90-102307-PM	12,77	3,03E-05	1	15,9	1,16E-05	1						hypothetisches Protein
146-104265-PM	90,35	1,62E-04	1	53,01	5,46E-04	1						hypothetisches Protein
71-109956-PM	20,74	7,69E-04	1	20,25	8,24E-04	1						hypothetisches Protein
240-235838-PM	6,17	5,58E-03	1	8,48	1,68E-03	1						hypothetisches Protein
111-105517-PM	13,12	7,27E-04	1	13,28	6,98E-04	1						hypothetisches Protein
183-232589-PM	58,66	5,59E-05	1	44,97	1,15E-04	1						hypothetisches Protein
264-45589-PM	9,13	1,77E-02	1	8,91	1,89E-02	1						hypothetisches Protein
131-83144-PM	5,27	8,70E-03	1	5,75	6,25E-03	1						hypothetisches Protein
161-110026-PM	42,91	1,74E-08	1	22,97	2,29E-07	1						hypothetisches Protein
281-76955-PM	41,75	2,48E-05	1	62,25	7,45E-06	1						hypothetisches Protein
54-16505-PM	52,16	2,83E-05	1	69,02	1,28E-05	1						hypothetisches Protein
252-236632-PM	12,04	3,79E-05	1	7,58	3,23E-04	1		IPR002818: ThJ/Pip(PF01965: DJ-1_Pip)				hypothetisches Protein
178-43113-PM	18,55	2,30E-03	1	21,18	1,61E-03	1						hypothetisches Protein
97-107578-PM	13,83	2,63E-03	1	7,31	1,63E-02	1						hypothetisches Protein
63-113478-PM	26,82	1,09E-04	1	14,9	7,33E-04	1						hypothetisches Protein
99-84096-PM	18,3	5,43E-05	1	10,14	5,33E-04	1						hypothetisches Protein
273-251514-PM	18,29	8,52E-06	1	19,16	7,04E-06	1						hypothetisches Protein
180-231731-PM	18,46	1,56E-06	1	11,34	1,51E-05	1						hypothetisches Protein

„Fold“ bezieht sich auf die Veränderung der Expression des erstgenannten (unbehandelten) Stammes

Tab. AT12 Hochregulierte Gene unter verschiedenen Stressbedingungen

FEBIT-ID	12-43 (Chip1) vs W22 auf Cd (Chip4)			4-39 (Chip2) vs W22 auf Cd (Chip4)			12-43 (Chip1) vs W22 auf Opus (Chip4)			4-39 (Chip2) vs W22 auf Opus (Chip4)			12-43 (Chip1) vs 12x43 HSW(Chip1)			4-39 (Chip2) vs 12x43 HSW(Chip1)			Gene Ontology	Domain Info	EC : Definition	Pathway : Pathway-Class	KOG-Info	Funktion
	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q						
119-58836-PM	-229,03	2,36E-04	1	-123,65	7,28E-04	1	-106,28	9,63E-04	1	-57,38	3,01E-03	1	-149,9	5,11E-04	1	-80,93	1,59E-03	1						hypothetisches Protein
437-257367-PM	-31,7	1,06E-04	1	-48,45	3,00E-05	1	-19,8	4,51E-04	1	-30,27	1,22E-04	1	-115,55	2,63E-06	1	-176,58	8,68E-07	1	GO:0005525: GTP binding(MF), GO:0005874: microtubule(CC), GO:0007017: microtubule-based process(BP), GO:0004308: exo-alpha-sialidase activity(MF)	IPR000217: Tubulin(P500227: TUBULIN)	3.2.1.18: Exo-alpha-sialidase., 3.2.1.18: Exo-alpha-sialidase.	N-Glycan degradation: N-Glycan degradation, Sphingoglycolipid regulator metabolism: Sphingoglycolipid metabolism	KOG3915: Transcription regulator dachshund, contains SKI/SNO domain	Transcription
253-235821-PM	-29,51	1,54E-04	1	-55,31	2,43E-05	1	-14,42	1,38E-03	1	-27,04	2,00E-04	1	-69,09	1,30E-05	1	-129,5	2,36E-06	1					KOG0161: Myosin class II heavy chain	Cytoskeleton
65-256849-PM	-6,42	3,78E-03	1	-8,46	1,29E-03	1	-5,72	5,94E-03	1	-7,53	2,03E-03	1	-5,1	9,19E-03	1	-6,72	3,17E-03	1	IPR001810: Cyclin-like F-box(PF00646: F-box), IPR001810: Cyclin-like F-box(P550181: FBOX), IPR000595: Cyclic nucleotide-binding(P500888: CNMP_BINDING_1)				Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	
53-107158-PM	-17,42	2,35E-03	1	-19,05	1,85E-03	1	-8,66	1,52E-02	1	-9,47	1,20E-02	1	-15,15	3,43E-03	1	-16,56	2,70E-03	1					KOG1216: von Willebrand factor and related coagulation proteins, KOG1216: von Willebrand factor and related coagulation proteins	Defense mechanisms
53-59497-PM	-14,75	5,55E-04	1	-10,16	1,98E-03	1	-8,72	3,33E-03	1	-6	1,17E-02	1	-41,3	1,91E-05	1	-28,44	6,26E-05	1						hypothetisches Protein
225-111318-PM	-12,08	3,45E-03	1	-12,91	2,84E-03	1	-7,01	1,67E-02	1	-7,49	1,38E-02	1	-50,65	5,37E-05	1	-54,12	4,47E-05	1						hypothetisches Protein
73-12028-PM	-22,12	1,67E-04	1	-40,38	2,45E-05	1	-36,73	3,29E-05	1	-67,03	5,29E-06	1	-5,38	1,83E-02	1	-9,82	2,50E-03	1						hypothetisches Protein
206-233748-PM	-21,03	2,95E-03	1	-16,65	5,24E-03	1	-12,44	1,06E-02	1	-9,85	1,85E-02	1	-16,97	5,00E-03	1	-13,43	8,84E-03	1						hypothetisches Protein
56-53069-PM	-15,78	1,12E-05	1	-10,19	7,93E-05	1	-8,75	1,61E-04	1	-5,65	1,29E-03	1	-9,5	1,10E-04	1	-6,13	8,72E-04	1						hypothetisches Protein
182-109019-PM	-9,13	1,17E-02	1	-14,75	3,14E-03	1	-5,22	4,97E-02	1	-8,44	1,44E-02	1	-19,59	1,43E-03	1	-31,66	3,80E-04	1						hypothetisches Protein

„Fold“ bezieht sich auf die Veränderung der Expression des erstgenannten (unbehandelten) Stammes

Tab. AT13 Reprimierte Gene unter verschiedenen Stressbedingungen

FEBIT-ID	(12-43 (Chip1) vs W22 auf Cd (Chip4))			4-39 (Chip2) vs W22 auf Cd (Chip4)			12-43 (Chip1) vs W22 auf Opus (Chip4)			4-39 (Chip2) vs W22 auf Opus (Chip4)			12-43 (Chip1) vs 12x43 HSW(Chip1)			4-39 (Chip2) vs 12x43 HSW(Chip1)			Gene Ontology	Domain Info	EC : Definition	Pathway : Pathway-Class	KOG-Info		
	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q	Fold	pValue	Q							
423-108300-PM	9,14	1,76E-03	1	5,16	1,37E-02	1	18	1,55E-04	1	10,17	1,20E-03	1	25,38	4,71E-05	1	14,32	3,49E-04	1		IPR000345: Cytochrome c heme-binding site(PS00190: CYTOCHROME_C)				FOG: Immunoglobulin and related proteins, KOG4475:	Inorganic ion transport and metabolism
89-27513-PM	22,5	1,12E-04	1	34,9	2,64E-05	1	28,24	5,24E-05	1	43,82	1,28E-05	1	8,55	3,11E-03	1	13,27	6,76E-04	1		C2H2 type(PF00096: zf-C2H2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PSS0157: ZINC_FINGER_C2H2_2), IPR007087: Zn-finger, C2H2 type(PS00028: GO:0003676: nucleic acid binding(MF), GO:0005622: intracellular(CC), GO:0008270: zinc ion binding(MF)				KOG0562: Predicted hydrolase (HIT family)	Funktion unbekannt
55-234748-PM	8,72	8,43E-03	1	11,49	3,73E-03	1	9,85	5,90E-03	1	12,98	2,60E-03	1	7,42	1,35E-02	1	9,78	6,03E-03	1		GO:0008152: metabolic process(BP), GO:0016491: oxidoreductase activity(MF), GO:0000252: C-3 sterol dehydrogenase (C-4 sterol decarboxylase) activity(MF), GO:0000253: 3-keto sterol reductase activity(MF), GO:0004033: aldo-keto reductase activity(MF), GO:00	IPR002347: Glucose/ribitol dehydrogenase(PIR00081: GDHRDH), IPR002198: Short-chain dehydrogenase/reductase SDR(PF00106: adh_short)	NADP(+) as acceptor., 1.1.1.-: With NAD(+) or NADP(+) as acceptor., 1.1.1.-: With NAD(+) or NADP(+) as acceptor., 1.1.1.-: With NAD(+) or	one acid biosynthesis, Vitamin B6 metabolism: Vitamin B6 metabolism, Glycine, serine and threonine	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogen	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
90-102307-PM	12,91	2,88E-05	1	16,08	1,11E-05	1	12,77	3,03E-05	1	15,9	1,16E-05	1	7,22	4,20E-04	1	8,99	1,50E-04	1							hypothetisches Protein
53-103192-PM	6,66	3,58E-03	1	7,29	2,53E-03	1	9,31	9,82E-04	1	10,19	6,95E-04	1	15,75	1,33E-04	1	17,23	9,53E-05	1		IPR002893: Zn-finger, MYND type(PF01753: zf-MYND), IPR002893: Zn-finger, MYND type(PSS0865: ZF_MYND_2), IPR002893: Zn-finger, MYND type(PS01360: GO:0008270: zinc ion binding(MF)				KOG2084: Predicted histone tail methylase containing SET domain	Chromatin structure and dynamics
57-232833-PM	16,74	8,75E-04	1	14,16	1,47E-03	1	7,46	1,06E-02	1	6,31	1,74E-02	1	19,38	5,57E-04	1	16,39	9,34E-04	1						KOG3004: Meiotic chromosome segregation protein	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning

„Fold“ bezieht sich auf die Veränderung der Expression des erstgenannten (unbehandelten) Stammes

Tab. AT14 Wachstum der *T. vaccinum*-Transformanten

	A	B	C	D	E	F	G	H	M	Stabw
T1	24	22	21	24	21	22	24	22	22,50	1,31
T2	19	19	20	18	29	22	30	32	23,63	5,73
T3	30	32	30	27	26	31	25	27	28,50	2,56
T4	25	22	24	21	23	25	18	26	23,00	2,62
T5	32	33	23	29	30	27	30	31	29,38	3,16
T6	23	27	25	31	18	22	27	15	23,50	5,18
T7	18	18	21	18	30	22	32	29	23,50	5,90
T8	20	30	22	21	22	29	31	23	24,75	4,46
T9	32	29	32	31	30	33	32	31	31,25	1,28
T10	30	34	31	27	28	33	29	32	30,50	2,45
WT	20	25	20	23	26	25	32	25	24,50	3,82

Koloniedurchmesser in cm nach vierwöchigem Wachstum auf MMNB. A-H kennzeichnen die Einzelkolonie, M ist der Mittelwert und Stabw die Standardabweichung.

Tab. AT15 Analyse des Metallgehalts des Haldensickerwasser

Metall	Al (MS)	Al SD	B (MS)	B SD	Ba (MS)	Ba SD	Ca (OES)	SD Ca	Fe (MS)	Fe SD
	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
Konzentration	88845	485	< 0,4		23,6	0,6	382	4	220175	3812
Metall	K (OES)	SD K	Mg (OES)	SD Mg	Mn (OES)	SD Mn	Na (OES)	SD Na	Ni (MS)	Ni SD
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
Konzentration	3,1	0,6	283	2	54,6	0,5	27,5	0,5	8400	85
Metall	K (OES)	SD K	Mg (OES)	SD Mg	Mn (OES)	SD Mn	Na (OES)	SD Na	Ni (MS)	Ni SD
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
Konzentration	3,1	0,6	283	2	54,6	0,5	27,5	0,5	8400	85
Metall	P (OES)	SD P	S (OES)	SD S	Si (OES)	SD Si	Sr (MS)	Sr SD	Ti (MS)	Ti SD
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
Konzentration	< 0,2		1007	12	6,82	0,05	851	2	4	1
Metall	Zn (OES)	SD Zn	Li (MS)	Li SD	Sc (MS)	Sc SD	V (MS)	V SD	Cr (MS)	Cr SD
	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
Konzentration	7,6	0,4	345	3	9,2	0,3	12	1	6,7	0,4
Metall	Co (MS)	Co SD	Cu (MS)	Cu SD	As (MS)	As SD	Y (MS)	Y SD	Cd (MS)	Cd SD
	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
Konzentration	3818	17	3046	27	18	1	1046	18	174	4
Metall	Cs (MS)	Cs SD	La (MS)	La SD	Ce (MS)	Ce SD	Pr (MS)	Pr SD	Nd (MS)	Nd SD
	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
Konzentration	< 0,1		60	1	289	2	34	1	192	3
Metall	Sm (MS)	Sm SD	Eu (MS)	Eu SD	Tb (MS)	Tb SD	Gd (MS)	Gd SD	Dy (MS)	Dy SD
	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
Konzentration	65,4	0,6	19,1	0,2	20	1	125	3	128	4
Metall	Ho (MS)	Ho SD	Er (MS)	Er SD	Tm (MS)	Tm SD	Yb (MS)	Yb SD	Lu (MS)	Lu SD
	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
Konzentration	28,1	0,6	82	2	10,8	0,2	66	2	10,7	0,1
Metall	Pb (MS)	Pb SD	Th (MS)	Th SD	U (MS)	U SD	Pb (MS)	Pb SD	Th (MS)	Th SD
	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
Konzentration	13	1	6,5	0,2	160	7	13	1	6,5	0,2
Metall	U (MS)	U SD								
	µg/l	µg/l								
Konzentration	160	7								

MS = Massenspektrometrie, OES = optische Emissionsspektrometrie, SD = Standardabweichung