

TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

VIENNA
UNIVERSITY OF
TECHNOLOGY

DIPLOMARBEIT

„Silencing“ von drei G-Protein gekoppelten Rezeptoren des Biokontrollpilzes *Trichoderma atroviride* und Charakterisierung der Transformanten

ausgeführt am Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und
Technische Biowissenschaften, Forschungsbereich Gentechnologie und
angewandte Biochemie der Technischen Universität Wien

unter der Anleitung von
ao.Univ.Prof. Dr. Robert L. Mach,

durch

Marizela Delic
Neulinggasse 39/3/7
1030 Wien

Wien, August 2007

DANKSAGUNG

Einen herzlichen Dank möchte ich meiner Familie aussprechen, welche mir dieses Studium ermöglicht und mich immer unterstützt hat.

Ein großes Dankeschön an Herrn Prof. Robert Mach für die Möglichkeit, die Diplomarbeit in dieser Arbeitsgruppe zu absolvieren und genauso an Dr. Susanne Zeilinger und Dr. Kurt Brunner für die Betreuung, Ratschläge, Anregungen und Geduld.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden und Kollegen im Labor für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre bedanken.

ABSTRACT

Trichoderma species are used as biocontrol agents in agriculture against a range of plant pathogenic fungi, such as *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* or *Pythium ultimum*. The characteristics that define a biological agent such as *Trichoderma* spp., are chemotrophic growth, host-specific recognition, formation of appressoria-like structures (infection structures), production of lytic enzymes (e.g. chitinases, glucanases, proteases) and antibiotics (e.g. gliovirin, peptaibols). The cooperation of all these processes leads to growth inhibition and finally to the lysis of the host. The G-protein coupled receptors, which are involved in the signaling of external stimuli, might be important for the initial host identification. Until now three G-protein coupled receptors from *T. atroviride*, *gpr1*, *gpr2* and *gpr3*, which are members of the class V cAMP sensing receptors, were cloned and characterized.

As numerous experiments to knock-out these receptors failed, a new strategy had to be found. For this diploma thesis, silencing was the method of choice. After construction of stem-loop-stem RNA the inverted repeat of each receptor gene was ligated into the silencing vector pSILENT2 and finally transformed into the genome of the biocontrol fungus *T. atroviride* P1. As a result of a protoplast transformation, several colonies were identified as transformants with PCR by using specific primers. After silencing the genes *gpr1*, *gpr2* and *gpr3*, the decrease of gene expression was analyzed by real-time PCR in comparison to a reference gene. Finally, the identified transformants were characterized by the confrontation with pathogenic fungi *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *A. nidulans*, *R. solani* and *P. ultimum* and separate cultivation in liquid media with different carbon sources for protein analysis. During these experiments a phenotypic difference of the *gpr1* transformants to the wildtype *T. atroviride* was assessed. These transformants showed also a different behaviour to the wildtype during the confrontation experiments with pathogens.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	II
ABSTRACT	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Gattung <i>Trichoderma</i>	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Einsatz der <i>Trichoderma</i> -Arten als Biokontrollorganismen	1
1.2 Mechanismen in der Biokontrolle	2
1.2.1 Antagonismus	2
1.2.1.1 Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum	2
1.2.1.2 Antibiose	2
1.2.2 Mykoparasitismus	3
1.2.2.1 Chemotrophes Wachstum	3
1.2.2.2 Erkennung des Wirts	3
1.2.2.3 Anlagerung an den Wirt	3
1.2.2.4 Lytische Enzyme	3
1.3 Signaltransduktion in Pilzen	4
1.3.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren: Einteilung und Struktur	5
1.3.1.1 Einteilung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	5
1.3.1.1.1 Einteilung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in Pilzen	6
1.3.1.2 GPCRs: Homo- und Heterooligomerbildung	7
1.3.1.3 Regulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	7
1.3.2 GTP-bindende Proteine	8
1.3.3 Signaltransduktion in Pilzen: Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade und cAMP-Weg	9
1.4 Quantitative RT Real-Time PCR	9
1.4.1 Möglichkeiten der Detektion von Signalen	10
1.4.2 PCR-Effizienz	10
1.4.3 Quantifizierung der Real-Time PCR	11
1.5 Silencing von Genen	12
1.5.1 Silencing von Genen durch RNA-Interferenz	12
1.5.2 Vor- und Nachteile des Silencing gegenüber dem knock-out von Genen	12

2 ZIEL DER ARBEIT	14
3 MATERIALIEN UND METHODEN	15
3.1 Verwendete Organismen	15
3.1.1 Pilze	15
3.1.2 Bakterien	15
3.2 Nährmedien und Lösungen	15
3.2.1 Kartoffel-Glucose-Agar (Potatoe-Dextrose-Agar, PDA)	15
3.2.2 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	15
3.2.3 Synthetisches Medium	15
3.2.4 SOC-Medium	16
3.3 Kultivierungsbedingungen	16
3.3.1 Kultivierung von <i>T. atroviride</i> und deren Transformanten	16
3.3.2 Sporenvereinzellung	16
3.3.3 Kultivierung von <i>E. coli</i>	16
3.4 Eingesetzte Vektoren	16
3.5 Molekularbiologische Standardmethoden	17
3.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	17
3.5.2 Restriktionsverdau der DNA	18
3.5.3 Agarosegelelektrophorese für DNA-Proben	18
3.5.4 Elution der DNA aus Agarosegelen mittels QIAEX	19
3.5.5 Aufreinigung von PCR-Produkten	19
3.5.6 Ligation	19
3.5.7 Transformation von <i>E. coli</i>	19
3.5.7.1 Elektroporation	19
3.5.7.2 Hitzeschock-Transformation	20
3.5.8 Plasmid-Präparation mittels alkalischer Lyse	20
3.5.8.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA	20
3.5.8.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA	20
3.5.9 Transformation von <i>T. atroviride</i> (Protoplastentransformation)	21
3.5.10 DNA-Isolation aus <i>T. atroviride</i>	22
3.5.11 RNA-Isolation aus <i>T. atroviride</i>	23
3.5.12 Konzentrationsbestimmung von RNA	24
3.5.13 Agarosegelelektrophorese für RNA-Proben	24
3.5.14 DNase-Verdau	24
3.5.15 Herstellen einer cDNA	24
3.5.16 Real-Time PCR	25

4	ERGEBNISSE	26
4.1	Herstellung von Inverted Repeats aus DNA-Fragmenten von Rezeptor codierenden Genen von <i>T. atroviride</i> P1	26
4.1.1	Konstruktion von Inverted Repeats für das Silencing von <i>gpr1</i>	26
4.1.2	Konstruktion von Inverted Repeats für das Silencing von <i>gpr2</i>	27
4.1.3	Konstruktion von Inverted Repeats für das Silencing von <i>gpr3</i>	29
4.2	Transformation des <i>T. atroviride</i> mit dem Silencing Vektor	30
4.3	Nachweis mittels PCR	30
4.4	Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR	31
4.4.1	Der Rezeptor <i>gpr1</i>	31
4.4.2	Der Rezeptor <i>gpr2</i>	33
4.4.3	Der Rezeptor <i>gpr3</i>	34
4.5	Konfrontationsversuche auf PDA-Platten	35
4.6	Bestimmung der Biomasse in Flüssigkultur	35
5	DISKUSSION	37
6	ANHANG	40
6.1	Konfrontationsversuche auf PDA-Platten	40
6.2	Abbildungsverzeichnis	42
6.3	Literaturverzeichnis	44

1 EINLEITUNG

1.1 Die Gattung *Trichoderma*

1.1.1 Taxonomie

Vertreter der Gattung *Trichoderma* gehören zur Familie der *Hypocreaceae* (Ordnung *Hypocreales*, Abteilung *Ascomycota*) und bilden die anamorphe der teleomorphen Form der *Hypocrea* (Tulasne and Tulasne 1865). Trotz der bereits im 19. Jahrhundert erfolgten Zuordnung durch die Brüder Tulasne fiel die weitere Unterteilung dennoch schwer. Bis ins Jahr 1939 wurde angenommen, dass alle Vertreter morphologisch einer einzigen Spezies zuzuordnen sind, nämlich *Trichoderma viride* (Bisby 1939). Einige Jahrzehnte später gelang die Klassifizierung in neun verschiedene Spezies, oder besser ‚Speziesaggregate‘ (Rifai 1969), welche in Folge durch genaue morphologische Analysen in *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporium* und *Hypocranum* unterteilt wurden (Bissett 1984; Bissett 1991a; Bissett 1991b; Bissett 1991c; Bissett 1992).

Durch den großen Fortschritt in der Methodik der Molekularbiologie wird seit Anfang der Neunziger die Zuordnung neu definiert. Die Analyse bezieht sich auf bestimmte DNA-Sequenzen der Pilze, wie etwa die ITS (internal transcribed spacer) - Regionen, welche Sequenzen der ribosomalen DNA darstellen (Lieckfeldt, Samuels et al. 1999; Hermosa, Grondona et al. 2000; Wuczkowski, Druzhinina et al. 2003; Druzhinina, Kopchinskiy et al. 2005). Gleichmaßen werden auch die D1- und D2-Regionen der 28S rRNA, sowie das Gen einer Endochitinase (*ech42*), herangezogen (Lieckfeldt, Samuels et al. 1999).

1.1.2 Einsatz der *Trichoderma*-Arten als Biokontrollorganismen

Um möglichst hohe Erträge in der Landwirtschaft zu erzielen, wird das Thema Schädlingsbekämpfung immer größer geschrieben. Da vor allem in der modernen Landwirtschaft der Focus auf nur wenigen Kulturen liegt, kommt es zu einem starken ökologischen Ungleichgewicht. Häufig werden chemische Pestizide als ‚Waffe‘ eingesetzt, damit es nicht zu Schäden oder Verlusten der Ernte kommt. Dieses Übermaß an chemisch sehr komplexen Verbindungen verursacht früher oder später eine Anreicherung im Boden (Hjeljord and Tronsmo 1998; Benitez, Rincon et al. 2004). Andererseits kommt es zur Ausbildung von Resistenzen bei Schädlingen, welche dann nicht mehr auf dieses Pestizid ansprechen. Das sind Gründe, weswegen nach Alternativen zur Bekämpfung von pflanzenpathogenen Organismen gesucht wird. Dabei stehen seit kurzem auch biologische Pflanzenschutzmittel im Mittelpunkt, welche ihre Wirksamkeit oft durch die Verwendung von Biokontrollorganismen erlangen. Biokontrolle bedeutet die Reduktion der krankheitsverursachenden Aktivität von Pathogenen durch einen oder mehrere Organismen, ausgenommen den Menschen (Cook and Baker 1983).

Als Alternative zu den oft problematischen chemischen Fungiziden werden Vertreter der Gattung *Trichoderma* eingesetzt, die sich durch ein rasantes Wachstum auszeichnen, auch unter ungünstigen Bedingungen überleben können, das Abwehrsystem der Pflanze aktivieren und sie gegen pflanzenpathogene Pilze schützen (Harman, Howell et al. 2004; Brunner, Zeilinger et al. 2005). *Trichoderma* ist zum Beispiel in der Lage Schäden, welche durch *Botrytis* und *Sclerotinia* verursacht werden, zu unterdrücken, indem sie deren Sporulation und Akkumulation von Sklerotien reduzieren (Handelsman and Stabb 1996; Hjeljord and Tronsmo 1998; Harman, Howell et al. 2004; Viterbo, Harel et al. 2005), da sie einerseits mit dem Pathogenen um die Nährstoffe und Platz konkurrieren (Harman, Howell et al. 2004) und

ihn andererseits durch direkten Mykoparasitismus angreifen. All diese positiven Eigenschaften machen Pilze der Gattung *Trichoderma* zu idealen Antagonisten und bieten auch zahlreiche Angriffspunkte für eine Verbesserung der Biokontrolleigenschaft.

1.2 Mechanismen in der Biokontrolle

Durch den Einsatz von natürlichen Feinden können Pathogene und deren pflanzenschädigende Auswirkungen abgewendet werden. Diese Eigenschaft wird in der Biokontrolle ausgenutzt, welche sich durch eine Vielfalt von Mechanismen auszeichnet. Darunter wird einerseits Konkurrenz und Mykoparasitismus (direkte Wechselwirkung zwischen Pathogen und Biokontrollorganismus) verstanden, andererseits die Synthese hydrolytischer Enzyme, toxischer Metabolite und Antibiotika (Benitez, Rincon et al. 2004).

1.2.1 Antagonismus

1.2.1.1 Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum

Trichoderma-Stämme wachsen sehr schnell auf vielen verschiedenen Substraten (Grondona, Hermosa et al. 1997). In der Biokontrolle kann also die Unterdrückung von pflanzenpathogenen Mikroorganismen bewirkt werden, indem diesen die Nährstoffe entzogen werden. Hierbei spielt vor allem die Eisenaufnahme eine wichtige Rolle. Diese ist bei vielen Bakterien und Pilzen an Siderophore gebunden, welche als Liganden das Eisen an ein Protein abgeben. Dieses transportiert es dann in die Zelle (Handelsman and Stabb 1996). Da die Liganden der *Trichoderma*-Arten oft viel effizienter das Eisen binden als jene der Konkurrenten, wirkt sich das fehlende Eisen nachteilig für andere Organismen aus.

1.2.1.2 Antibiose

Biokontrolle stützt sich oft auf die Antibiose von *Trichoderma*-Stämmen. In vielen untersuchten Biokontrollsystemen wurde gezeigt, dass die Ausscheidung von einem oder mehreren toxischen Metaboliten die Unterdrückung von Pathogenen bewirkt (Handelsman and Stabb 1996).

Viele der *Trichoderma*-Spezies produzieren zusätzlich zu lytischen Enzymen Peptaibole und Gliovirin. Untersuchungen haben aber ergeben, dass eine Überexpression des Antibiotikums Gliovirin das Biokontrollpotential des Pilzes nicht steigert (Howell and Stipanovic 1983). Bei Peptaibolen wird vermutet, dass sie an der Membran des Wirts agieren, um die Membran-assoziierten Enzyme zu inhibieren, welche an der Zellwandsynthese beteiligt sind. Peptaibole könnten auch die Pflanzenresistenz gegen Pathogene unterstützen (Wiest, Grzegorski et al. 2002).

Nicht nur die Ausscheidung der Antibiotika, sondern vor allem die synergistische Wirkung mit hydrolytischen Enzymen ist ein wichtiger Faktor des antagonistischen Verhaltens (Howell 1998). Di Pietro et al. (1993) untersuchten die synergistische Wirkung einer Endochitinase mit Gliotoxin des Pilzes *T. virens* auf Konidien von *Botrytis cinerea*. Wenn jede dieser Substanzen alleine auftrat, wurde die Keimung nur wenig gehemmt, traten sie aber in Kombination auf, wurde das Wachstum des Pathogens zu 95% unterdrückt (Di Pietro, Lorito et al. 1993).

1.2.2 Mykoparasitismus

Mykoparasitismus beschreibt den direkten Angriff eines Pilzes auf einen anderen und stellt neben Antibiose und Konkurrenz (um z.B. Nährstoffe) die wichtigste antagonistische Interaktion zwischen Mikroorganismen dar (Chet 1987). Dieser Prozess setzt sich aus einer Reihe von Folgeschritten zusammen, wie etwa der Wirtserkennung, Angriff auf den Pathogenen und dessen Abtötung durch Penetration.

1.2.2.1 Chemotrophes Wachstum

Trichoderma-Arten können den Wirt aus einer Distanz heraus erkennen, um anschließend direkt auf ihn zuzuwachsen (Chet, Harman et al. 1981). Voraussetzung dafür ist ein Gradient an chemischen Substanzen wie etwa Aminosäuren und Zuckern, welche als Stimulus für den Biokontrollorganismus dienen (Chet 1990). Es konnte bisher nicht bewiesen werden, dass eine bestimmte Substanz diesen Reiz auslöst.

1.2.2.2 Erkennung des Wirts

Trichoderma weist bei Angriffen auf Wirtsorganismen eine gewisse Spezifität auf. Das lässt vermuten, dass es zwischen den Organismen eine Erkennung auf molekularer Ebene geben muss, in der Lektine eine wichtige Rolle spielen (Chet, Benhamou et al. 1998). Lektine gehören der Gruppe der Glycoproteine an, welche an der Wechselwirkung zwischen der Zelloberfläche und extrazellulärer Umgebung beteiligt sind (Barondes 1981). Zusätzlich produziert *Trichoderma* kontinuierlich kleine Mengen an Exochitinasen. Diese bewirken den Abbau der Wirtszellwand zu diffundierbaren Chitinoligomeren, welche die Expression von Endochitinasen einleiten (Harman, Howell et al. 2004).

1.2.2.3 Anlagerung an den Wirt

Nach dem Kontakt zwischen *Trichoderma* und Wirt wächst der Biokontrollpilz entlang der Hyphen des Pathogenen, windet sich um diesen („Coiling“) und bildet hakenartige, appressoriumähnliche Strukturen aus (Elad, Barak et al. 1983). Für diese Bindung ist die Wechselwirkung von Kohlenhydraten in der Zellwand von *Trichoderma* und Lektine des Wirtes essentiell (Inbar and Chet 1996; Harman, Howell et al. 2004).

1.2.2.4 Lytische Enzyme

Trichoderma-Arten sind für die Fähigkeit, die Zellwand anderer Pilze abzubauen, bekannt (Chet, Benhamou et al. 1998). Dieser Abbau ist auf die Aktivität von Chitinasen, Glukanasen und Proteasen zurückzuführen (Elad, Barak et al. 1983). An den Appressorien entstehen Löcher in der Zellwand des Wirts, durch die *Trichoderma*-Hyphen ins Lumen vordringen können (Elad, Barak et al. 1983; Harman, Howell et al. 2004).

- Chitinasen

Chitinasen werden in drei physiologische Gruppen gegliedert (Seidl, Huemer et al. 2005). Wegen ihres katalytischen Mechanismus werden -N-Acetylglucosaminidasen (NAGasen), Endo- -N-Acetylglucosaminidasen, Endochitinasen und Exochitinasen unterschieden. In dem am besten charakterisierten *Trichoderma*-Isolat (Isolat TM) besteht das Chitinasen-System aus zwei β -(1,4)-N-Acetylglucosaminidasen (102 and 73 kDa) und vier Endochitinasen (52, 42, 33, and 31 kDa) (Haran, Schickler et al. 1995; Carsolio, Benhamou et al. 1999).

Das am häufigsten untersuchte Enzym dieses Komplexes ist die 42kDa große Endochitinase Ech42, welche *in vitro* die Zellwand von *B. cinerea* hydrolysieren und die Sporenauskeimung inhibieren kann (De la Cruz, Hidalgo-Gallego et al. 1992; Lorito, Hayes et al. 1993; Schirmbock, Lorito et al. 1994; Carsolio, Benhamou et al. 1999). Das dazugehörige Gen wird während Pilz-Pilz-Interaktionen, in Anwesenheit von autoklaviertem Mycel oder kolloidalem Chitin als einzige Kohlenstoffquelle stark exprimiert. Glucose hingegen wirkt inhibierend (Carsolio, Gutierrez et al. 1994; Garcia, Lora et al. 1994). Unter den NAGasen ist Nag1 der wichtigste Vertreter. Verstärkte Transkription des dazugehörigen Gens (*nag1*) tritt erst auf, wenn der Biokontrollpilz direkten Kontakt zu *Rhizoctonia solani* hat (Zeilinger, Galhaup et al. 1999). Induktion erfolgt durch niedermolekulare Chitooligosaccharide (Mach, Peterbauer et al. 1999).

- Glukanasen

Die Sporenkeimung und das Wachstum von Pathogenen wird durch β -D-Glukanasen zusammen mit Chitinasen (Benitez, Delgado-Jarana et al. 1998; El-Katatny, Gudelj et al. 2001) inhibiert. In *Trichoderma* sp. wurden β -1,3- und β -1,6-Glukanasen identifiziert, welche Zellwandbestandteile von anderen Pilzen abbauen können. Es wurde gezeigt, dass *T. harzianum* mindestens drei verschiedene extrazelluläre β -1,6-Glukanasen produziert. Aus diesem Stamm konnte eine 78kDa große β -1,3-Endoglucanase isoliert und identifiziert werden (De la Cruz, Pintor-Toro et al. 1995).

- Proteasen

Das Gen (*pbr1*), welches für eine Proteinase kodiert, wird nur aktiviert, wenn sich im Medium mit dem Biokontrollorganismus Zellwand des Pilzes *R. solani* oder Chitin als die einzige Kohlenstoffquelle befindet. In Konfrontationsversuchen zwischen *Trichoderma* und *R. solani* wurde festgestellt, dass für die Gentranskription kein direkter Kontakt zwischen den Hyphen der zwei Pilze notwendig ist, diese tritt schon vorher auf. Inhibierung tritt bei Vorhandensein von Glucose auf (Flores, Chet et al. 1997).

1.3 Signaltransduktion in Pilzen

Signaltransduktionskaskaden sind für die Kommunikation zwischen Umweltsignalen und zellulären Mechanismen zuständig, die das Wachstum und die Differenzierung von Pilzen kontrollieren (D'Souza and Heitman 2001). Eine große Anzahl dieser transmembranen Signalübertragung wird über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) durchgeführt. GPCRs sind somit involviert in der Erkennung und Weiterleitung von Signalen. Wenn nun ein Ligand mit einem an der Zelloberfläche befindlichen, heptahelikalen Rezeptor interagiert, so wirkt diese Bindung entweder stabilisierend, oder eine Konformationsänderung des Rezeptors wird induziert. Diese wiederum aktiviert ein heterotrimeres GTP-bindendes Protein, bestehend aus α -, β -, und γ -Untereinheiten, an der inneren Zellmembran. Im inaktiven Stadium ist GDP an die G_α -Untereinheit gebunden. Nach Aktivierung wird GDP frei, GTP bindet an G_α und der G_α -GTP-Komplex dissoziiert von $G_{\beta\gamma}$ und vom Rezeptor ab. Beide Komplexe sind nun in der Lage eine Reihe von Effektoren zu aktivieren oder zu inhibieren. Einige Beispiele sind Ca^{2+} - und K^+ -Ionenkanäle, Adenylatcyclase oder die mitogen-aktivierte Protein- (MAP) Kinase (Cabrera-Vera, Vanhauwe et al. 2003). In Pilzen gibt es zwei Möglichkeiten, wie G-Protein gekoppelte Signale weitergeleitet werden können: entweder über die Adenylatzyklase cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), oder über die MAP Kinase Signalübertragungskaskade (McCudden, Hains et al. 2005).

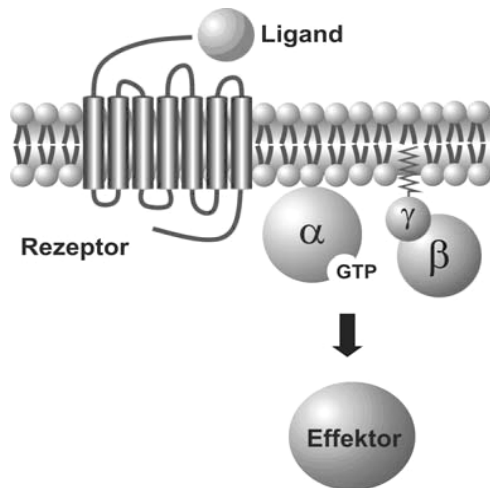


Abb. 1: Die Abbildung zeigt den Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors mit seinen sieben transmembranen Helices und den Proteinuntereinheiten α , β und γ . In der Darstellung ist der Rezeptor aktiviert, da an der G_α -Untereinheit GTP gebunden ist.

Die GTPase bewirkt an der G_α -Untereinheit die Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch G_α wieder inaktiviert wird. Die Reassoziierung mit der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit beendet alle Wechselwirkungen mit den Effektoren (McCudden, Hains et al. 2005; Sgourakis, Bagos et al. 2005).

1.3.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren: Einteilung und Struktur

1.3.1.1 Einteilung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Laut Watson und Arkininstall kann angenommen werden, dass mehr als tausend G-Protein gekoppelte Rezeptoren im humanen Genom existieren und somit eine der größten Proteinfamilien bilden (Watson and Arkininstall 1994; Schoneberg, Schultz et al. 1999). Die Untergruppe unter den GPCRs mit den meisten Vertretern weist große strukturelle Ähnlichkeit zum Lichtrezeptor Rhodopsin auf und wird oft der Klasse I zugeschrieben (Schoneberg, Schultz et al. 1999). Der Großteil aller untersuchten GPCRs ist für die Signaltransduktion über heterotrimere G-Proteine zuständig. Einige von ihnen benutzen auch Signalmoleküle, wie etwa Jak2 Kinase, Phospholipase C γ oder Proteinkinase C, um die empfangenen Reize weiterzusenden (Ji, Grossmann et al. 1998).

Aus Sequenzvergleichen von verschiedenen GPCRs lässt sich feststellen, dass mehrere Rezeptor-Familien zu unterscheiden sind, welche kaum Gemeinsamkeiten aufweisen, weder in der Sequenzabfolge noch in ihrer Länge (Bockaert and Pin 1999). Was diese aber gemeinsam haben sind sieben Transmembranhelices, die über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Loops miteinander verbunden sind (Baldwin 1993). Eine Konformationsänderung dieser Domäne ist wahrscheinlich für die Aktivität des Rezeptors verantwortlich. Am Aminoterminal, welcher sich auf der extrazellulären Seite der Membran befindet, erfolgt die Glykosylierung, am intrazellulären C-(Carboxy-)terminalen Ende findet Phosphorylierung und Palmitoylierung für Desensibilisierung und Internalisierung statt (Gether and Kobilka 1998; Ji, Grossmann et al. 1998; Lefkowitz 1998). In Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass Disulfidbrücken zwischen einer Helix und einem Loop existieren und vermutlich die Struktur des GPCRs zusätzlich stabilisieren (Karnik, Gogonea et al. 2003). Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand, die eine wichtige Rolle spielen sind Wasserstoffbrückenbindungen, ionische und hydrophobe Interaktionen (Ji, Grossmann et al. 1998).

1.3.1.1.1 Einteilung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in Pilzen

Die bislang in *Aspergillus nidulans* neun identifizierten GPCRs (GprA-I) konnten in fünf Klassen unterteilt werden (Han, Seo et al. 2004a). Lafon et al. kamen nach der Analyse der Genome von *A. nidulans*, *A. fumigatus* und *A. oryzae* zum Ergebnis, dass man die identifizierten GPCRs in neun Klassen einzuteilen sind (Lafon, Han et al. 2006).

- **Klasse I und II: Pheromonrezeptoren**

Die Klassen I und II beinhalten putative Pheromonrezeptoren, welche Sequenzähnlichkeit zu dem a-Faktor Rezeptor Ste2p bzw. dem α -Faktor Rezeptor Ste3p aus *Saccharomyces cerevisiae* aufweisen, wie etwa die Rezeptoren GprA und GprB aus *A. nidulans* (Han, Seo et al. 2004b) oder PreB und PreA aus *A. fumigatus* (Poggeler and Kuck 2001; Dyer, Paoletti et al. 2003). Ähnliche Rezeptoren wurden auch in *A. oryzae* gefunden.

- **Klasse III und V: Putative Kohlenstoff- und cAMP-Rezeptoren**

Die Klassen III und V wurden von Han et al. (2004) definiert und beinhalten putative GPCRs, welche homolog zu Gpr1p aus *S. cerevisiae* und Git3p Glucose Sensor aus *S. pombe* sind (Kraakman, Lemaire et al. 1999; Welton and Hoffman 2000). Ähnlichkeiten wurden auch zu CrlA and cAR1-4 cAMP Sensoren aus *Dictyostelium discoideum* festgestellt (Hereld and Devreotes 1992; Raisley, Zhang et al. 2004). In direktem Vergleich mit den Rezeptoren der Klassen I, II und IV und deren Homologen aus Hefe, Gpr1p und Git3p, können kaum Gemeinsamkeiten mit den GPCRs der Klasse III festgestellt werden. Es ist außerdem unklar geblieben, ob die Rezeptoren der Klasse III an der Erkennung von Kohlenstoffquellen direkt beteiligt sind, so wie etwa Gpr1p und Git3p.

Galagan et al. (2003) stellten die Hypothese auf, dass die Rezeptoren der Klasse V aus *Neurospora crassa* an der Erkennung von cAMP beteiligt sein sollen. Diese sollen außerdem mit den cAR2 und cAR4 cAMP Rezeptoren aus *D. discoideum* verwandt sein (Hereld and Devreotes 1992; Raisley, Zhang et al. 2004).

Obwohl die Vermutung nahe liegt, dass die Rezeptoren dieser beiden Klassen gleichen Ursprungs sind, weisen sie strukturelle Unterschiede auf. Während Klasse III Rezeptoren zwischen ihrem amino- und carboxyterminalen Bereich sieben gleichmäßig verteilte Membran-durchspannende Domänen aufweisen, haben Klasse V Rezeptoren, durch einen besonders langen cytoplasmatischen Loop getrennt, fünf bzw. zwei transmembrane Segmente (Lafon, Han et al. 2006).

Vertreter dieser Rezeptoren-Klassen wurden auch in *Magnaporthe grisea*, *Fusarium graminearum* und *N. crassa* gefunden.

- **Klasse IV: Stickstoffsensoren**

Die Klasse IV beinhaltet GPCRs, welche Ähnlichkeit zum Stm1p Rezeptor aus *S. pombe* aufweisen. Dieser besteht aus sieben Membran-durchspannenden Domänen und ist zusammen mit der Gpa2p G α -Untereinheit in *S. pombe* an der Erkennung von Stickstoffmangel beteiligt (Chung, Won et al. 2001).

Neben den von Han et al. (2004) beschriebenen Klasse IV Rezeptoren GprF und GprG wurde noch eine dritte Gruppe in *A. nidulans* entdeckt und beschrieben, nämlich GprJ (Lafon, Han et al. 2006). In *A. fumigatus* und *A. oryzae* konnten die Rezeptoren dieser Klasse ebenfalls in drei Gruppen unterteilt werden, wobei der Rezeptor GprG als typisch für den Genus *Aspergillus* zu betrachten ist.

- **Klasse VI: Eine neue Klasse der GPCRs mit einer RGS-Domäne**

Die GPCRs dieser Klasse weisen eine RGS-Domäne im cytoplasmatischen Teil des Proteins abwärts der Membran-durchspannenden Region auf. Pilze, wie etwa *A. nidulans*, *A.*

fumigatus, *A. oryzae*, *N. crassa* und *F. graminearum*, zeichnen sich durch den Besitz eines Rezeptors der Klasse VI, in *M. grisea* konnten zwei nachgewiesen werden (Lafon, Han et al. 2006).

Das Protein AtRGS1, welches Ähnlichkeiten zu den Rezeptoren dieser Klasse aufweist, wurde in *Arabidopsis thaliana* gefunden und scheint die Gpa1 G α -Untereinheit negativ zu regulieren und ist mit einer Zellproliferation in Verbindung zu bringen (Chen, Willard et al. 2003).

- Klasse VII und VIII: Mögliche neue Klassen an GPCRs

In *M. grisea* wurden zwei neue Klassen an GPCRs entdeckt (Kulkarni, Thon et al. 2005). Analoge zu Klasse VII Rezeptoren wurden in *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, sowie in *N. crassa* und *F. graminearum* gefunden (Lafon, Han et al. 2006).

Klasse VIII beinhaltet Rezeptoren aus *M. grisea*, welche homolog zum Steroid-Rezeptor mPR sind. Diese putativen GPCRs weisen eine mPR_dom Domäne auf (Kulkarni, Thon et al. 2005) und wurden auch in *Aspergillus* sp. gefunden.

- Klasse IX: Opsine

Zu dieser Klasse zählen die NOP-1 und ORP-1 Proteine aus *N. crassa* (Borkovich, Alex et al. 2004). Sie weisen Ähnlichkeit zu bakteriellen Opsinen auf, die aus sieben Membrandurchspannenden Domänen bestehen, mit denen sie das Retinal binden und als Ionenkanäle oder Lichtsensoren dienen (Bieszke, Braun et al. 1999). Ein homologes Protein zu NOP-1 wurde in *Aspergillus* sp. und in *M. grisea* entdeckt, *F. graminearum* besitzt zwei solche Rezeptoren (Lafon, Han et al. 2006).

1.3.1.2 GPCRs: Homo- und Heterooligomerbildung

Lange Zeit wurde angenommen, dass ein einziger Ligand einen Rezeptor bindet, wodurch es zu einer Konformationsänderung im Rezeptor kommt. Das wiederum induziert die Aktivierung eines G-Proteins oder eines Effektors. Obwohl die Auffassung, dass ein monomeres GPCR ein heterotrimeres G-Protein aktiviert, große Akzeptanz findet, konnte nachgewiesen werden, dass viele GPCRs (Skrabanek, Murcia et al. 2007), aber auch nicht-GPCR Rezeptor-Familien, wie etwa die RTKs und die Wachstumshormonrezeptor-Familie (Bockaert and Pin 1999; Bouvier 2001; Milligan 2001), Homo- und Heterooligomere für die Signalübertragung bilden. Dieses Phänomen soll auch eine Rolle in der Biogenese, Aktivierung und Funktion von Rezeptoren haben.

Die Heterooligomerisation zwischen verschiedenen Untereinheiten von GPCRs könnte unter Umständen einige Aspekte der Cross-talk-Regulation zwischen unterschiedlichen Signaltransduktionssystemen erklären (Hur and Kim 2002). Ein gutes Beispiel dafür ist die Assoziation zwischen den Untereinheiten κ und δ zweier funktionsfähiger Opioidrezeptoren, welche dann als Heterodimer andere Liganden binden können als in ihrem monomeren Zustand (Jordan and Devi 1999).

Homooligomerisation hingegen beschränkt sich auf die Kommunikation zwischen identischen Proteinen. Diese wurde zum Beispiel beim Gpr4 Rezeptor von *Cryptococcus neoformans* beobachtet (Xue, Bahn et al. 2006).

1.3.1.3 Regulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Extensive Studien an verschiedenen GPCRs haben ergeben, dass die funktionelle Aktivität vieler GPCRs über einen sehr komplexen Mechanismus reguliert wird (Carman and Benovic 1998; Ferguson and Caron 1998; Krupnick and Benovic 1998; Lefkowitz 1998). Darunter

sind Reaktionen wie die Phosphorylierung der Rezeptoren durch spezielle Kinasenfamilien zu verstehen.

- **Protein Kinase Phosphorylierung**

Durch intrazelluläre Kinasen erfolgt die Phosphorylierung von Rezeptoren, welche durch eine kovalente Modifizierung das Abkoppeln vom heterotrimeren G-Protein bewirken. Die Familie dieser Kinasen weist sieben Mitglieder auf, welche eine zentrale katalytische, eine Amino-terminale und eine Carboxy-terminale Domäne aufweisen. Der Amino-terminale Bereich ist für die Erkennung des Substrats zuständig. Der C-Terminus befindet sich in der Plasmamembran und erkennt die Kinase (Ferguson and Caron 1998).

- **Herunterregulation**

Die Herunterregulation wird durch Agonisten induziert und tritt mehrere Stunden nach der Exposition mit dem Liganden auf. Die Folge dieser Aktion ist, dass die Zahl der Rezeptoren verringert wird.

Die Desensibilisierung der Rezeptoren hat das Ziel, die Zelle vor einer Überstimulation der GPCRs zu bewahren. Dieser Mechanismus muss aber auch umkehrbar sein, sonst geht die Funktion der Rezeptoren verloren und diese können auf äußere Reize nicht mehr reagieren. Diese Wiederaktivierung der GPCRs wird als Resensibilisierung bezeichnet. Der Mechanismus wurde bis heute nicht vollständig geklärt. Dieser Prozess ist deutlich langwieriger als die Desensibilisierung und erfolgt auch mit einer geringeren Effizienz (Ferguson 2001).

1.3.2 GTP-bindende Proteine

Heterotrimere G-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Erkennung und Weiterleitung von extrazellulären Stimuli. Sie bestehen aus einer α -Untereinheit, welche GTP bindet und hydrolysiert, und den locker gebundenen β - und γ -Untereinheiten (Turner and Borkovich 1993). In Pilzen können vier Wirkungsklassen der G_α -Untereinheiten unterschieden werden, nämlich: G_s , G_i , G_q und G_{12} . Sie haben einerseits sehr ähnliche Aminosäuresequenzen, andererseits erfüllen sie aber unterschiedliche Aufgaben. Während die Stimulation der G_s -Untereinheit zur Aktivierung der Adenylylzyklase führt, bewirkt die Stimulation der G_i -Untereinheit deren Inhibierung. Eine angeregte G_q -Untereinheit aktiviert die Phospholipase C (PLC) und die G_{12} -Untereinheit ist in der Regulation von kleinen GTP-bindenden Proteinen involviert (Hur and Kim 2002).

Für die Klassifizierung von GTP-bindenden Proteinen können viele verschiedene Faktoren herangezogen werden. Eine Möglichkeit ist die Einteilung nach der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz. Auch die Struktur des Liganden kann herangezogen werden. Eine wichtige Methode der Klassifizierung basiert auf den Eigenschaften von GPCRs. Wenn Rezeptoren einen Liganden binden, können sie in der Regel eine Reihe von G-Proteinen aktivieren. Nicht nur die α -Untereinheit, sondern auch die β - und γ -Untereinheiten können regulatorische Funktion übernehmen, indem sie an Effektormoleküle binden und so ihre Aktivität steuern. Sie sind in der Signaltransduktion durch Interaktion mit vielen Proteinen, wie etwa GPCRs, GTPasen, Adenylylzyklase und Proteinen des MAPK-Signalwegs, involviert (Hur and Kim 2002). Durch Experimente, in denen die Gene der G_α - und G_β -Untereinheit ein- bzw. ausgeschaltet wurden, konnte festgestellt werden, dass heterotrimere G-Proteine in Funktionalitäten eines Pilzes, wie etwa der Sporulation, Pathogenität oder Produktion von Sekundärmetaboliten, involviert sind.

Zwei Gene, welche für G_α -Untereinheiten kodieren, konnten aus *T. atroviride* isoliert und charakterisiert werden. Das korrespondierende Protein Tga1 zeigt die größte Ähnlichkeit zur

Untereinheit $G_{\alpha i}$. Durch Versuche konnten Beweise für die Wichtigkeit der G_{α} -Untereinheit für das Coiling erbracht werden. Antisense-Mutanten dieses Proteins hingegen zeichnen sich in Experimenten durch Hypersporulation und vermindertes Coiling um die Hyphe der Wirts aus (Rocha-Ramirez, Omero et al. 2002). *tga1* negative knock-out Mutanten können in direkter Konfrontation *R. solani*, *B. cinerea* und *S. sclerotiorum* nicht überwachsen, produzieren aber kontinuierlich Sporen, unabhängig davon, ob sie Licht ausgesetzt sind oder nicht. Sie weisen außerdem niedrigere Chitinase-Aktivität auf und produzieren weniger *ech42*- und *nag1*-Transkripte (Reithner, Brunner et al. 2005).

Die zweite untersuchte G_{α} -Untereinheit ist Tga3. *Atga3* Mutanten zeigten verändertes vegetatives Wachstum, wodurch die Vermutung aufkommt, dass das Gen dieses Proteins für das Wachstum des Pilzes eine Rolle spielt. Im Vergleich zum Wildtyp konnten bei Konfrontationsversuchen mit Pathogenen keine Mykoparasitismus-assoziierten Abläufe, wie etwa Virulenz, festgestellt werden (Zeilinger, Reithner et al. 2005).

Mukherjee et al. haben 2003 zwei G_{α} -Untereinheiten des Pilzes *Trichoderma virens* untersucht, indem sie loss-of-funktion Mutanten von *tgaA* und *tgaB* erzeugten und miteinander verglichen. Während *tgaA* der $G_{\alpha i}$ -Klasse zugeordnet wird, gehört die *tgaB*-Untereinheit der *gna2*-Klasse von *N. crassa* an. In Konfrontationsversuchen konnten beide Mutanten sowie der Wildtyp das Mycel von *R. solani* überwachsen und lysieren, aber die *tgaA*-Mutanten zeigten reduzierte Fähigkeit *S. rolfsii* zu kolonisieren.

1.3.3 Signaltransduktion in Pilzen: Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade und cAMP-Weg

In eukaryontischen Zellen stellt die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade das Schlüsselement in der Weiterleitung der Signale von der Zelloberfläche bis zum Zellkern dar (Banuett 1998). Dabei steht die Aktivierung durch Phosphorylierung von drei Enzymen im Mittelpunkt: die MAP Kinase (MAPK), die durch die MAP Kinase Kinase (MAPKK) stimuliert wird, welche wiederum von der MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) phosphoryliert wird (Seger and Krebs 1995; Robinson and Cobb 1997). Diese Art von Signaltransduktion in filamentösen Pilzen ist in deren Sporulation, Sporenkeimung, Pathogenität und Wachstum involviert (Lengeler, Davidson et al. 2000; Xu 2000).

cAMP wird in eukaryontischen Zellen oft als Antwort auf extrazelluläre Stimuli produziert. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel ist von der relativen Aktivität des biosynthetischen Enzyms Adenylylzyklase und der abbauenden Phosphodiesterasen abhängig (D'Souza and Heitman 2001). Das am häufigsten untersuchte Ziel von cAMP ist die cAMP-abhängige Protein Kinase (PKA), welche die physiologischen Auswirkungen durch cAMP in Pilzen und anderen multizellulären Eukaryonten weiterleitet (Taylor, Buechler et al. 1990). Es hat sich gezeigt, dass der cAMP-Weg wichtig für die sexuelle Entwicklung, Differenzierung und Virulenz ist (Lengeler, Davidson et al. 2000; D'Souza and Heitman 2001).

1.4 Quantitative RT Real-Time PCR

Die Fluoreszenz-basierende Real-Time reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wird für die Detektion von mRNA eingesetzt (Bustin 2000). Dazu ist es notwendig, dass die RNA in cDNA umgeschrieben wird, denn RNA ist deutlich instabiler als DNA. Mit dieser Methode können RNAs verschiedener Herkunft untersucht und miteinander verglichen werden. Die RT Real-Time PCR ist hoch sensitiv und erlaubt die Quantifizierung kleinster Veränderungen in der Expression von Genen (Pfaffl 2001). Die Reaktionsbedingungen, unter

denen die Synthese durchgeführt wird, sind essentiell für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus der RT-PCR.

1.4.1 Möglichkeiten der Detektion von Signalen

- SYBR Green:

Der in der Real Time PCR am häufigsten eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff ist SYBR Green, ein asymmetrischer Cyanid-Farbstoff, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Die Affinität ist hierbei um ein Hundertfaches höher als bei anderen interkalierenden Fluorophoren, wie zum Beispiel Ethidiumbromid. Die Fluoreszenz wird bei einer Wellenlänge von 480nm erfasst.

- Hybridisation probes:

Bei dieser Methode werden zwei verschiedene Oligonukleotide verwendet: Der Donor hat am 3'-Ende einen Reporter-Fluorophor, der Akzeptor am 5'-Ende einen Akzeptor-Fluorophor. Während der Annealing-Phase des Primers lagern sich die beiden Oligonukleotide an der einzelsträngigen DNA an und die Anregungsenergie wird vom Donor zum Akzeptor übertragen.

- Hydrolysis probes:

Die *Taq*Man-Sonden haben am 5'-Ende ein Reporter-Fluorophor und am 3'-Ende einen Quencher, sodass intakte Oligonukleotide kein Signal aussenden. Während der Elongationsphase werden die an einzelsträngiger DNA angelagerten Sonden durch die Endonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase abgebaut, wodurch der Reporter vom Quencher getrennt wird und nach Anregung Fluoreszenzstrahlung aussenden kann.

- Molecular beacons:

Bei den Molecular beacons sind etwa 10 bis 15 Nukleotide komplementär, sodass diese Teile der Sonde einen Doppelstrang ausbilden. Am 5'-Ende befindet sich ein Reporter, am 3'-Ende ein Quencher. Während der Annealing-Phase kann der ausgebildete Loop der Sonde an die DNA binden, wodurch sich der Molecular beacon öffnet und der Reporter frei wird.

- Scorpion primers:

Scorpion primer haben eine ähnliche Struktur und Funktion wie Molecular beacons, dienen aber bei der PCR auch zusätzlich als Primer.

Die Reaktionen werden charakterisiert durch den PCR-Zyklus, an dem die Amplifikation erstmals signifikant den Hintergrundwert erhebt. Dieser Wert wird als ‚Threshold Cycle‘ (C_t) bezeichnet (Wong and Medrano 2005).

In dieser Arbeit wurde für die Real-Time PCR nur SYBR Green verwendet.

1.4.2 PCR-Effizienz

Die PCR-Kinetik kann in vier Abschnitte geteilt werden: lineare Anfangsphase, exponentielle Zunahmephase, lineare Zunahmephase und Plateau-Phase. In der ersten Phase können kaum Signale detektiert werden aufgrund der Background-Fluoreszenz. Das erste Signal, welches registriert wird, leitet die zweite, nichtlineare Phase ein, welche für die Berechnung der Effizienz letztendlich herangezogen wird. Diese geht in die lineare Phase über, welche durch

das Ausschöpfen der Reaktion in der Plateu-Phase endet, in der kaum noch Produktbildung erfolgt.

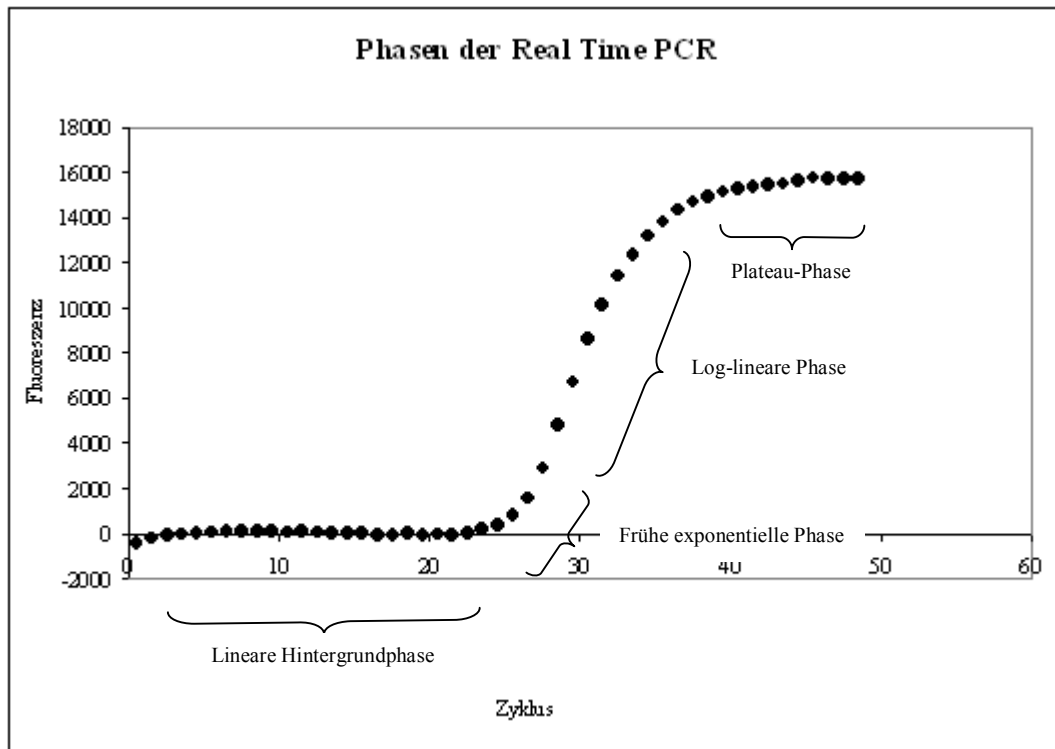


Abb. 2: Das Diagramm zeigt die vier Phasen der Real Time PCR.

Die ideale Effizienz einer PCR mit dem Wert 1 wird erreicht, wenn während der Amplifikation in der exponentiellen Phase die PCR-Konzentration des Produkts während jedes Zyklus verdoppelt wird (Gibson, Heid et al. 1996). Da dies nur selten erreicht werden kann, ist das Berechnen der tatsächlichen Effizienz mittels eines mathematischen Modells unausweichlich. Dieses wird durch die folgende Formel vereinfacht dargestellt:

$$\text{Effizienz} = \left[10^{\frac{1}{\text{Steigung}}} - 1 \right]$$

Die Werte, welche für die Berechnung der Steigung (Regression) notwendig sind, werden aus der frühen exponentiellen Phase entnommen und log-transformiert.

1.4.3 Quantifizierung der Real-Time PCR

Mit einem mathematischen Modell nach Pfaffl ist die relative Quantifizierung eines Zielgens im Vergleich zu einem Referenzgen möglich. Dabei wird berücksichtigt, dass das Ziel- und das Referenzgen keine idealen Effizienzen aufweisen, welche stark von einander abweichen können.

Die relative Expressionsrate eines Zielgens wird, basierend auf Effizienz und Threshold Cycle einer unbekannt Probe gegen eine Referenz, bestimmt (Pfaffl 2001).

$$\text{relative Transkriptionsrate} = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{\Delta Ct_{\text{Zielgen}}(\text{Bezugsprobe}-\text{Probe})}}{E_{\text{Referenz}}^{\Delta Ct_{\text{Referenz}}(\text{Bezugsprobe}-\text{Probe})}}$$

E beschreibt die ermittelte tatsächliche Effizienz der Amplifikation des Zielgens und des Referenzgens. ΔCt ist die Differenz der aus dem Versuch ermittelten Threshold-Zyklen der Bezugssprobe und der Messprobe für beide, das Ziel- und das Referenzgen.

1.5 Silencing von Genen

1.5.1 Silencing von Genen durch RNA-Interferenz

Das Silencing hat das Ziel die Expression bestimmter Gene zu unterdrücken. Dazu werden RNA-Konstrukte benötigt, welche die Rate der Transkription, die Stabilität der mRNA oder die Translation der mRNA zu Proteinen reduzieren (Tomari and Zamore 2005). Um dieses Ziel zu erreichen, wird doppelsträngige RNA (dsRNA) benötigt. Diese kann z.B. durch bidirektionale Transkription, Erzeugung von Inverted Repeats oder Hairpins konstruiert werden. Einmal in der Zelle transkribiert, wird die dsRNA durch Dicer, einer Nuklease der RNase III Familie, erkannt und in 21 bis 26bp kleine interferierende RNA-Stücke (siRNA) zerschnitten. Diese können nun als Einzelstränge in ein Ribonukleoprotein-Komplex (RISC – ‚RNA induced silencing complex‘) eingebaut und an ein komplementäres Stück der Ziel-mRNA angebracht werden (Yamada, Ikeda et al. 2007). Die Folge des Prozesses ist, dass die komplementäre Ziel-mRNA durch Dicer abgebaut wird, wodurch es nicht zur Translation kommt.

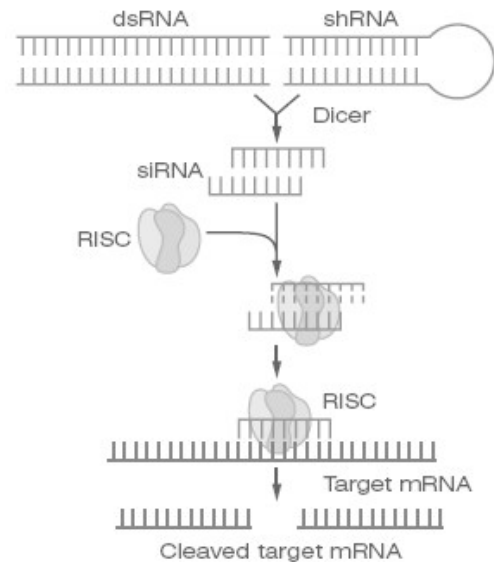


Abb. 3: In der Darstellung ist der Prozess des Silencing dargestellt. Zunächst wird die doppelsträngige RNA von Dicer-Proteinen erkannt und zerschnitten, um dann als RISC Komplex an die komplementäre Ziel-mRNA anzudocken. Die Ziel-mRNA wird abgebaut und dadurch die Proteinsynthese unterbunden.

1.5.2 Vor- und Nachteile des Silencing gegenüber dem knock-out von Genen

Die meisten Pilze haben multizelluläre Hyphen, welche nach Transformation mehrere genetisch unterschiedliche Kerne enthalten können, sind also heterokaryontisch. Diese Tatsache macht es schwer, ein Gen gezielt durch knock-out auszuschalten. Da das RNA

EINLEITUNG

Silencing Lokus-unabhängig ist, können Gene herunterreguliert werden, ohne genau zu wissen, wo das Zielgen im Genom positioniert ist.

Das RNA Silencing kann außerdem für die Analyse von letalen Genen herangezogen werden, da es meistens eine Herunterregulation der Genexpression bewirkt, aber kein vollständiges Verschwinden der mRNA. Unvollständiges Silencing mit reduzierter Expressionsrate könnte Aufschluss über unerwartete Funktionen von essentiellen Genen in fundamentalen biologischen Prozessen bringen (Nakayashiki, Hanada et al. 2005).

Die durch Silencing bewirkte Herunterregulierung von Genen kann aber auch als ein großer Nachteil dieser Methode bewertet werden, denn das unvollständige Ausschalten von Genen kann das Interpretieren von Ergebnissen deutlich erschweren. Oft konnte auch beobachtet werden, dass sich Mutanten, welche durch knock-out und Silencing erzeugt wurden, phänotypisch stark unterscheiden (Bai, Ramos et al. 2003).

2 ZIEL DER ARBEIT

Pflanzenkrankheiten spielen eine direkte Rolle in der Zerstörung von natürlichen Ressourcen in der Landwirtschaft (Benitez, Rincon et al. 2004). Für den größten Teil des Schadens sind hauptsächlich pflanzenpathogene Pilze, wie etwa *R. solani*, *B. cinerea* oder *F. graminearum*, zu verantworten. Da aber chemische Pestizide für die Umwelt große Probleme bereiten, gewinnen Versuche zur Verbesserung der Biokontrollaktivität des Pilzes *T. atroviride* immer mehr an Bedeutung, denn dieser wird aufgrund seiner mykoparasitären Eigenschaften als Biokontrollorganismus eingestuft (Hjeljord and Tronsmo 1998).

Über G-Protein gekoppelte Rezeptoren können Reize aus der Umgebung der Zelle aufgenommen und an den Zellkern im Inneren der Zelle weitergeleitet werden. Das Wahrnehmen der Gegenwart eines Wirts könnte in einigen Signaltransduktionswegen verankert sein, mit der Folge, dass Gene, welche für den Mykoparasitismus essentiell sind, exprimiert würden (Reithner, Schuhmacher et al. 2007). Das würde bedeuten, dass auch die Rezeptoren, welche diese Signale übermitteln, an diesen Prozessen beteiligt sind. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits demonstriert, dass die G_α -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen der Pilze *T. atroviride* und *T. virens* eine wichtige Rolle im Antagonismus mit Pflanzenpathogenen spielen (Rocha-Ramirez, Omero et al. 2002; Mukherjee, Latha et al. 2004; Reithner, Brunner et al. 2005; Zeilinger, Reithner et al. 2005).

Drei Rezeptoren aus *T. atroviride* konnten bereits kloniert und mittels Real Time PCR untersucht werden (Domnanich 2006). Das Ausschalten dieser Gene durch knock-out führte zu keinem positiven Ergebnis, sodass die Strategie geändert werden musste. Die Idee stützte sich darauf, dass die Gene durch Silencing so gut wie möglich herunterreguliert werden sollten, ohne dass das ganze Gen auf mühsame Weise ausgeschnitten werden musste. Das primäre Ziel war also die Konstruktion von Stem-Loop-Stem-RNA, die nach Einbringen in das Genom eine Reihe von Mechanismen im Pilz auslösen sollte, welche allesamt zum Silencing des Zielgens führen würden. Dieses Phänomen ist seit 1992 bekannt und wurde als Quelling in *Neurospora crassa* zum ersten Mal beschrieben (Romano and Macino 1992). In anderen Pilzen wie *A. nidulans*, *M. oryzae*, *N. crassa*, und *S. pombe* wurden in das Silencing-Phänomen involvierte RNA Silencing-Proteinkomponenten, wie etwa Dicer, gefunden (Cogoni and Macino 1999; Volpe, Kidner et al. 2002; Catalanotto, Pallotta et al. 2004; Kadotani, Nakayashiki et al. 2004; Hammond and Keller 2005). Nach dem Silencing sollte zunächst mittels PCR bestätigt werden, dass es sich bei den nach der Transformation erhaltenen Stämmen tatsächlich um Transformanten der drei G-Protein gekoppelten Rezeptoren handelte. Dazu sollten spezifische Primer gewählt werden, welche nur zu Teilen der eingebrachten DNA komplementär sein würden. Nach der Identifizierung bestand die Aufgabe mittels Real Time PCR herauszufinden, wie hoch die Restexpression dieser drei Gene in den Transformanten war, was auch zeigen sollte, wie gut die gewählte Strategie funktionierte.

Als Abschluss sollte noch die Charakterisierung des Phänotyps der Transformanten erfolgen. Einerseits sollten die Unterschiede zum Wildtypstamm P1 ermittelt werden, andererseits war es auch wichtig zu ermitteln inwiefern das Biokontrollverhalten der Pilze durch das Silencing beeinträchtigt wurde. Das sollte durch Konfrontation mit Pathogenen festgestellt werden.

Eine andere Art die Pilze zu charakterisieren sollte über die Biomassebestimmung aus Flüssigkultur erfolgen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Verwendete Organismen

3.1.1 Pilze

Das Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Forschungsbereich Gentechnologie und angewandte Biochemie, der Technischen Universität Wien stellte den im Rahmen der Diplomarbeit verwendeten Pilzstamm *Trichoderma atroviride* P1 (*Trichoderma harzianum* P1, ATCC 74058) aus seiner Stammsammlung zur Verfügung.

A. nidulans, *B. cinerea*, *P. ultimum*, *R. solani* und *S. sclerotiorum* wurden Pilze in Konfrontationsversuchen auf Platten eingesetzt.

3.1.2 Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmiden (z.B. nach der Protoplastentransformation) wurde das Bakterium *Escherichia coli* Stamm JM 109 verwendet.

3.2 Nährmedien und Lösungen

Nährmedien, welche Agar-Agar enthielten, wurden vor dem Gießen auf 50°C temperiert. Für eine Petrischale mit einem Durchmesser von 8.5cm wurden etwa 20mL, für eine 4.4cm Petrischale etwa 4mL Medium benötigt.

Falls nicht anders angegeben, stammen die Chemikalien von Merck (Darmstadt, Deutschland).

3.2.1 Kartoffel-Glucose-Agar (Potatoe-Dextrose-Agar, PDA)

39g/L der Fertigmischung wurden eingewogen, in destilliertem Wasser gelöst, autoklaviert und auf 50°C abgekühlt.

3.2.2 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

Das LB-Medium gibt es in fester und in flüssiger Form. Es beinhaltet 10g/L Pepton, 5g/L Hefeextrakt und 10g/L NaCl. Für Platten fügt man noch 1,5% Agar-Agar hinzu. Nach Zugabe von destilliertem Wasser wurde das Medium autoklaviert und anschließend entweder temperiert (fest) oder auf Raumtemperatur abgekühlt (flüssig).

3.2.3 Synthetisches Medium

2g/l KH_2PO_4 , 1.4g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3g/l MgSO_4 , and 1g/l Pepton wurden eingewogen, in destilliertes Wasser aufgenommen und autoklaviert. Die Spurenelemente wurden als 100fache

(Endkonzentration 0.3g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0028g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0032g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) bzw. 1000fache (Endkonzentration 0.3g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Lösung hergestellt und ebenfalls autoklaviert. Dann wurde die entsprechende Kohlenstoffquelle hinzugefügt.

3.2.4 SOC-Medium

20g Trypton
5g Hefeextrakt
0,5g NaCl
10mL 0,25M KCl
5mL 2M MgCl_2
20mL 1M Glucose

Alle Komponenten wurden vereint und auf 1000mL mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach dem Einstellen des pH-Wertes mit NaOH auf 7,0 wurde das Medium autoklaviert.

Für die Selektion von Ampicillin-resistenten Transformanten wurde 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ einer 1000x konzentrierten Ampicillinlösung (100mg/mL in 50% Ethanol) zum autoklavierten und abgekühlten Nährmedium hinzugefügt.

3.3 Kultivierungsbedingungen

3.3.1 Kultivierung von *T. atroviride* und deren Transformanten

Die Pilze wurden generell in Petrischalen mit Kartoffel-Glucose-Agar bei 28°C gezüchtet. Da die Transformanten eine Hygromycin-Resistenz besitzen, wurden als Selektionskriterium 100ppm/mL (23 $\mu\text{L}/\text{mL}$) Hygromycin zum Nährmedium hinzugefügt. Die bewachsenen Platten wurden nach Versiegeln mit Parafilm bei 4°C gelagert.

3.3.2 Sporenvereinzelnung

Die Sporen wurden mit ca. 1ml einer NaCl-Tween-Lösung von einer bewachsenen Platte abgenommen, durch Glaswolle durchfiltriert (um das Mycel abzutrennen) und auf Kartoffel-Glucose-Agar mit Hygromycin und 1% Triton mittels der Dreizehnstrich-Methode vereinzelt.

3.3.3 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E.coli* auf Platten erfolgte auf LB_{amp} -Medium über Nacht bei 37°C. In Flüssigkultur wurde das Bakterium in LB_{amp} -Flüssigmedium bei 37°C geschüttelt.

Falls eine Blau-Weiß-Selektion möglich war, wurden je 40 μL IPTG und X-Gal mit einer Drigalsky-Spatel auf der Platte gleichmäßig verteilt.

3.4 Eingesetzte Vektoren

Für die Vermehrung des mittels PCR konstruierten Inverted Repeats wurde der pGEM-T Vektor (Promega) verwendet.

Für das Silencing selbst wurde das Konstrukt in den Vektor pSILENT2 (Domnanich 2006) über die *Hind*III-Schnittstelle zwischen Promotor und Terminator eingebracht und auch in dieser Form in das Genom des Pilzes integriert.

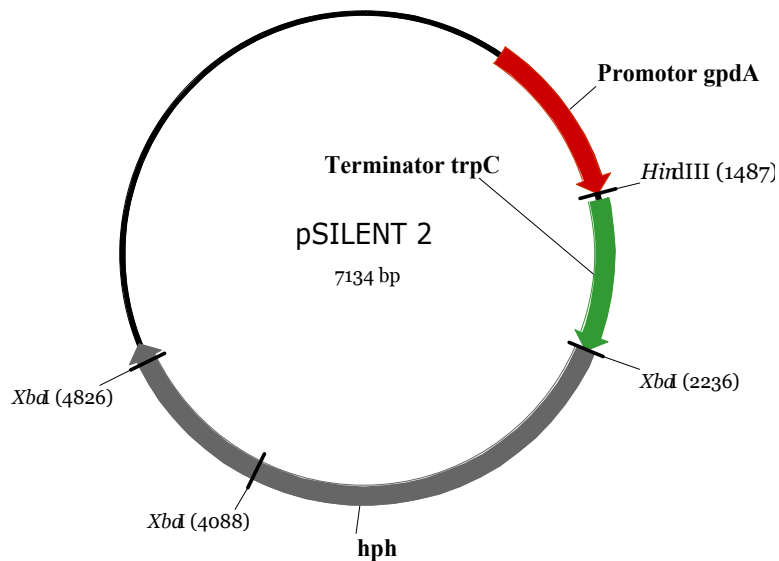


Abb. 4: In der Abbildung ist der Vektor pSILENT2 dargestellt, bestehend aus dem Promotor *gpdA*, dem Terminator *trpC* (beide isoliert aus *Aspergillus nidulans*) und dem Hygromycin-resistenz-Gen *hph*, welches auch als Selektions-kriterium nach der Transformation des Pilzes *T. atroviride* genutzt wurde.

3.5 Molekularbiologische Standardmethoden

3.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Folgende Komponenten wurden in einem 0.2mL Eppendortgefäß auf Eis zusammenpipettiert:

- 2µL Templat-DNA (wenn notwendig verdünnen)
- 2.5µL 10x Mg²⁺-freier Puffer (KCl bzw. (NH₄)₂SO₄)
- 2.5µL 25mM MgCl₂
- 0.5µL forward Primer (1:10 verdünnt)
- 0.5µL reverse Primer (1:10 verdünnt)
- 0.5µL 10mM Nucleotidmix
- 0.5µL *Taq*-Polymerase
- 16µL sb

- 25µL

Der Puffer, das MgCl₂ und die *Taq*-Polymerase stammen von der Firma Fermentas.

Die PCR-Reaktionen wurden stets im iCyclerTM (Biorad) durchgeführt, um möglichst ähnliche Bedingungen zu schaffen. Das Programm wurde mit einem ‚hot start‘ begonnen, welcher der Denaturierungstemperatur von 95°C entsprach.

Das PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

Erste Denaturierung der DNA	95°C	3 Minuten	} 30 bis 37 Zyklen
Denaturierung der DNA	95°C	30 Sekunden	
Anlagerung der Primer	T _m -5°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	1kb/Minute	
Finale Elongation	72°C	7 Minuten	

Die Anlagerungstemperatur für die Primer lässt sich aus deren Sequenz bestimmen und sollte 5°C unterhalb der Schmelztemperatur T_m liegen. Die Schmelztemperatur kann aus der Länge der Primer und dem GC-Gehalt bestimmt werden. Folgende Formel kann dazu herangezogen werden:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \left[\log_{10}(I+) + 0.41(\%G + C) - \left(\frac{600}{L} \right) - 0.63(\%FA) \right]$$

I+ Konzentration monovalenter Kationen [mM]

L Länge der Primer [bp]

FA Foramidkonzentration [%]

Für den Fall, dass die so ermittelte Anlagerungstemperatur nicht zum gewünschten Ergebnis führte, bestand die Möglichkeit eine Gradienten-PCR durchzuführen. Hierbei konnten mehrere Temperaturen gleichzeitig getestet werden.

3.5.2 Restriktionsverdau der DNA

Für den Verdau der DNA wurden Restriktionsendonucleasen benötigt. Mit diesem Experiment ließ sich einerseits überprüfen, ob das gewünschte Insert im Vektor enthalten war, andererseits konnten Restriktionsenzyme als Vorbereitung für die Konstruktion von Inverted Repeats herangezogen werden, denn mit diesen ließ sich das gewünschte Stück DNA präzise herausschneiden.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

1-8µL Templat-DNA

2µL 10x Restriktionspuffer (Promega oder Fermentas)

1µL Restriktionsenzym (Promega oder Fermentas)

mit sb auf 20µL auffüllen

Der Ansatz wurde (für die meisten Enzyme geltend) bei 37°C für mindestens zwei Stunden inkubiert. Für einen vollständigen Verdau empfahl es sich den Verdau über Nacht anzusetzen. Bei größeren Mengen an DNA konnte nach etwa einer Stunde noch 1µL Restriktionsenzym hinzugefügt werden.

3.5.3 Agarosegelelektrophorese für DNA-Proben

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0.8-2% (w/v) Gele benötigt. Agarose wurde in einem Kolben eingewogen und in 1x TAE-Puffer suspendiert. Nach dem Aufschmelzen in der Mikrowelle wurde die Lösung auf 50°C im Wasserbad temperiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1µg/mL). Gegossen wurde das Gel in einen Gelgießstand, in dem sich schon ein Kamm für die Taschen befand. Nach dem es auspolymerisiert war, wurde das Gel in eine mit Laufpuffer (1x TAE-Puffer) gefüllte Laufkamer gelegt. Die DNA-Proben wurden mit 6x Loading Dye versetzt und in die Taschen pipettiert. Für die Zuordnung der Banden war es notwendig einen Längenstandard (für diese Zwecke 1kb Ladder von Fermentas) mitlaufen zu lassen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 80V und einer Stromstärke von maximal 200mA durchgeführt.

TAE-Puffer (50x):	Tris	242g/L
	Eisessig	57.1mL
	0.5M EDTA	100mL
	pH 8.0 mit HCl	
	mit destilliertem Wasser auf 1L auffüllen	

Loading Dye (6x):	Ficoll 400	15% (w/v)
	Xylencyanol und Bromphenolblau	0.25% (w/v)
	EDTA	60mM
	pH 8.0	

Ethidiumbromid-Vorratslösung: 10mg/mL (254mM) Ethidiumbromid, gelöst in destilliertem Wasser

3.5.4 Elution der DNA aus Agarosegelen mittels QIAEX

Das DNA-Fragment mit der gewünschten Größe wird mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAEX II Gel Extraktionskit von der Firma QIAGEN (Valencia, USA) aus dem Gel isoliert. Die Durchführung erfolgte laut Protokoll des Herstellers.

3.5.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach der PCR wurden die Produkte mittels Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) von Primern, der Polymerase und den Salzen befreit und auf diese Weise für weitere Reaktionen vorbereitet.

3.5.6 Ligation

Der Ligationsmix, bestehend aus 1µL Vektor, 6µL Insert und 7µL Solution I (DNA Ligation Kit Ver.2.1, Takara), wurde in einem 0.2mL Eppendorfgefäß vereinigt und für mindestens 30 Minuten bei 16°C inkubiert.

3.5.7 Transformation von *E. coli*

3.5.7.1 Elektroporation

Diese Methode wurde vor allem für die Reamplifikation von bereits gereinigten Plasmiden verwendet, da nur geringe Mengen an Probe notwendig waren.

Für die Transformation wurde ein Aliquot (30 µL) kompetenter *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Ein µL einer 1:1000 verdünnten DNA-Probe wurde hinzugefügt und für wenige Minuten inkubiert. Nach dem Transferieren der Zellen in eine Küvette wurde die Transformation durch einen elektrischen Impuls ausgelöst. Die transformierten Zellen wurden in 1mL SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Danach wurden diese auf einer LB_{amp}-Platte mit einer Drigalsky-Spatel ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.5.7.2 Hitzeschock-Transformation

Diese Methode kann eingesetzt werden, um Plasmide direkt nach der Ligation in *E. coli* Zellen zu transformieren. Dazu muss die Ligase durch zehnmütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert werden.

Die kompetenten Zellen (50 µL) wurden nach dem Auftauen auf Eis mit 3 bis 5 µL Ligationsansatz versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock, der für 30 Sekunden bei 42°C durchgeführt wurde, wurden die Zellen für fünf Minuten auf Eis gestellt. Dann erfolgte die Zugabe von 125 µL SOC-Medium und eine einstündige Inkubation bei 37°C. Die Zellen wurden anschließend wie nach der Elektroporation behandelt.

3.5.8 Plasmid-Präparation mittels alkalischer Lyse

3.5.8.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA zu vermehren, musste diese in das Bakterium *E. coli* mit Hilfe der Elektroporation oder der Hitzeschock-Transformation eingeschleust werden. Das Zellmaterial wurde auf LB_{amp}-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C aufbewahrt. Nach Picken einer Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher wurden die Zellen in 2mL flüssigem LB_{amp}-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Isolation der DNA:

Ein 2mL Eppendorf-Gefäß wurde mit der Schüttelkultur befüllt und 3 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zell-Pellet mit 100µL P1-Puffer versetzt, um die Zellen zu resuspendieren. Nach der Zugabe von 200µL P2-Puffer (Lysepuffer) wurde das Eppendorf-Gefäß mehrmals umgedreht und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Sodann wurden 200µL P3-Puffer (Neutralisierungspuffer) hinzugefügt. Nach erneutem Inkubieren auf Eis für 5 Minuten wurde 10 Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppi transferiert, ohne etwas vom weißen Niederschlag mitzunehmen. Zur Fällung der DNA wurde die Lösung mit zweifachem Volumen von 96%igem Ethanol versetzt und kurz auf Eis gestellt. Nach zwanzigminütigem Zentrifugieren bei 13000rpm wurde der Überstand vorsichtig mit einer Kapillare abgesaugt und das Pellet mit 200 µL 70%igem Ethanol gewaschen. Der Alkohol wurde vollständig entfernt und das Pellet einige Minuten in der SpeedVac (SC 110, Savant) getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde die DNA in 20 bis 50 µL TE-Puffer bei 50°C gelöst und anschließend bei -20°C eingefroren.

3.5.8.2 Midi-Präparation der Plasmid-DNA

Für diesen Versuch war es notwendig 100mL LB_{amp}-Flüssigmedium mit einer Kolonie anzupflanzen und etwa 20 Stunden bei 37°C zu schütteln. Nach dem Überführen der Kultur in zwei 50mL Zentrifugenröhrchen wurde 10 Minuten lang bei 8000rpm (Zentrifuge 3K30, Sigma, Rotor 19776-H) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die zwei Pellets nacheinander in 4mL Lösung P1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 4mL Lösung P2 wurde das Gefäß für 5 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden 4mL Lösung P3 hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten auf Eis wurde 25 Minuten bei 10 000rpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine Säule (Tip 100, QIAGEN) mit 5mL QBT Puffer äquilibriert. Auf die so vorbereitete Säule wurde der Überstand aufgetragen. Die gebundene DNA wurde zweimal mit 5mL QC Puffer gewaschen und anschließend mit 5mL QF Puffer aus der Säule eluiert. Jeder mL des Eluats wurde separat in einem 2mL Eppendorf-Gefäß aufgefangen und mit 0.7x Volumen Isopropanol versetzt. Für die Fällung der DNA wurden

MATERIALIEN UND METHODEN

die Lösungen für 20 Minuten bei -20°C inkubiert und anschließend 30 Minuten lang bei 15 300rpm und 4°C (Zentrifuge 3K30, Sigma, Rotor 19776-H, Sigma) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Kapillare abgesaugt und das Pellet mit $500\mu\text{L}$ 96%igem Ethanol gewaschen. Nach 15minütigem Zentrifugieren bei 15 300rpm und 4°C wurde der Überstand erneut abgesaugt und die Pellets in der SpeedVac getrocknet. Diese wurden in insgesamt $90\mu\text{L}$ sb gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Alle gentechnisch veränderten Organismen und Materialien, welche mit diesen in Berührung kamen, wurden autoklaviert und ordnungsgemäß entsorgt.

Benötigte Lösungen:

Puffer P1 (Resuspendierungspuffer):

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	3.03g/L (25mM)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	3.72g/L (10mM)
Glucose	9.91g/L (50mM)

mit HCl auf pH 8.0 stellen und $100\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A dazugeben
Aufbewahren bei 4°C

Puffer P2 (Lysepuffer):

NaOH	8g/L (200mM)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	1g/L

Aufbewahren bei Raumtemperatur

Puffer P3 (Neutralisierungspuffer):

Kaliumacetat	294.42g/L (3M)
Eisessig	11.5% (v/v) (2M)

Aufbewahren bei 4°C , pH 4.8

QBT Puffer (Äquilibrierpuffer):

NaCl	750mM
MOPS	50mM, pH 7.0
Isopropanol	15% (v/v)
Triton X-1000	15% (v/v)

QC Puffer (Waschpuffer):

NaCl	1.0M
MOPS	50mM, pH 7.0
Isopropanol	15% (v/v)

QF Puffer (Elutionspuffer):

NaCl	1.25M
Tris-HCl	50mM, pH 8.5
Isopropanol	15% (v/v)

3.5.9 Transformation von *T. atroviride* (Protoplastentransformation)

Von einer sporulierenden Platte des Wildtyps *T. atroviride* wurden die Sporen abgenommen. Dazu werden etwa 2mL NaCl-Tween-Lösung benötigt. Das mitgenommene Mycel wurde mit Hilfe der Glaswolle von den Sporen abgetrennt. Nach dem Auszählen wurden pro PDA-Cellophan-Platte 10^8 Sporen ausgestrichen (für eine Transformation waren mindestens sechs Platten notwendig). Zum Auskeimen der Sporen wurden die Platten über Nacht bei 28°C inkubiert. 75mg Novozym 234 wurden in 15mL Lösung A unter Rühren gelöst und

MATERIALIEN UND METHODEN

anschließend mit einem 0,45µL Filter in eine Petrischale pipettiert. Das Cellophan wurde von der PDA-Platte mit einer sterilen Pinzette abgenommen und in der Lösung so lange geschwenkt, bis sich das Mycel abgelöst hatte (mit jeder Platte wiederholt). Nach dem Zerkleinern des Mycels wurde für zwei bis drei Stunden bei 28°C inkubiert, dabei öfter mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze die Lösung langsam auf- und abgesaugt. Gelegentlich bot sich auch an das Stadium der Abschnürung der Protoplasten unter dem Mikroskop zu beobachten und rechtzeitig abzurechen. Nun war es wichtig mit vorgekühlten Utensilien auf Eis zu arbeiten. Mit einem auf -20°C vorgekühlten Trichter mit Glaswolle wurden die Protoplasten vom Restmycel abgetrennt und mit einigen mL Lösung A nachgewaschen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und die Protoplasten in 4mL Lösung B resuspendiert. Erneut wurde zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach dem Aufnehmen der Protoplasten in 200 bis 500µL Lösung B wurden diese gezählt (10⁸ Protoplasten/mL notwendig).

Auf Eis wurden anschließend vereinigt:

- 200µL Protoplastensuspension
- 10µL DNA
- 50µL PEG Puffer

Nach 20 Minuten im Eisbad wurden weitere 2mL PEG Puffer hinzugefügt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4mL Lösung B. Der Transformationsansatz wurde auf sechs Epprouvetten verteilt und mit einigen mL PDA-Medium (enthält 1M Sorbitol und wurde auf 48°C temperiert) versetzt. Die Mischung wurde auf PDA-Hygromycin-Platten gegossen und nach dem Erstarren bei 28°C inkubiert.

Lösung A (50mL):

KH₂PO₄ 0.68g
Sorbit 10.93g
pH=5,6 mit verdünnter KOH

Lösung B (50mL):

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 0.061g
CaCl₂ 0.368g
Sorbit 9.109g
pH=7,5 mit verdünnter HCl

PEG-Puffer (50mL):

Polyethylenglykol 6000, in heißem destilliertem Wasser lösen 12.5g
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 0.061g
CaCl₂ 0.368g
pH=7,5 mit verdünnter HCl

NaCl-Tween-Lösung:

NaCl 0.9%
Tween 0.1%

3.5.10 DNA-Isolation aus *T. atroviride*

Nach dem Anzichten der Pilze auf Cellophan-PDA-Platten wurde das Mycel in flüssigem N₂ zermörsert und in ein 2ml Eppendorf-Gefäß übergeführt. 700µl CTAB-Lösung (mit 2% Mercaptoethanol) wurden dazupipettiert und 30 Minuten auf 60°C temperiert. Anschließend

erfolgte die Zugabe von 450µl Phenol und 450µl Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1). Die Lösung wurde gut gemischt und 15 Minuten zentrifugiert. Dann wurde die Oberphase abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Diese wurde mit weiteren 400µl Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) gewaschen und erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Die Oberphase wurde nochmals abgenommen und in einem neuen Eppendorf-Gefäß mit 0.7x Volumen Isopropanol die DNA gefällt. Nach einer kurzen Wartezeit wurde 20 Minuten zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit einer Kapillare abgesaugt und das Pellet mit 500µl 96% Ethanol gewaschen. Nach dreiminütigem Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit abgesaugt, das Pellet in der SpeedVac getrocknet und die DNA in 50 bis 100µl TE-Puffer gelöst. Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

Cetylmethylammoniumbromid-Lösung (CTAB):

NaCl	1,4M
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	0,1M
Ethylendiamintetraessigsäure	0,02M
Cetylmethylammoniumbromid	2%

Nach dem Einstellen des pH-Wertes mit HCl auf 8,0 wird die Lösung autoklaviert und anschließend mit 2% Mercaptoethanol versetzt.

3.5.11 RNA-Isolation aus *T. atroviride*

Alle Materialien, wie Pipettenspitzen und Eppendorf-Gefäße, sowie Lösungen, welche mit der RNA in Kontakt kommen sollten, mussten vorher mit einer 0.1% DEPC(Diethylpyrocarbonat)-Lösung behandelt werden, um die enthaltenen RNasen zu zerstören. In dieser Lösung wurden Spitzen und Eppendorf-Gefäße über Nacht inkubiert und anschließend für etwa eine Stunde autoklaviert, um das DEPC zu zerstören. Um genügend RNA isolieren zu können war es notwendig, vier bis fünf Tage vorher je fünf PDA-Cellophan-Platten pro Pilz anzuzüchten.

In 2mL Eppendorf-Gefäßen wurde 700µl Chirgwin-Lösung und 6µl Mercaptoethanol vorgelegt und auf Eis gestellt. Von den angesetzten Platten wurde das junge Mycel vom Rand abgenommen und unter flüssigen Stickstoff fein vermahlen. Nach dem Überführen des Pulvers in die bereitgestellten Eppendorf-Gefäße wurde die Suspension kräftig am Vibrationschüttler (Vortex Genie 2, Scientific Industries) gemischt und anschließend wieder auf Eis gestellt. Nach einander wurden 70µl 2M Natriumacetat (pH 4.0), 700µl Phenol (pH 4.0) und 200µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt. Nach Mischen am Vibrationschüttler wurde für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 13 000rpm und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge 3K30, Sigma, Rotor 12154, Sigma). Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert. Nach Zugabe von 0.7x Volumen Isopropanol wurde für mindestens eine Stunde bei -20°C die RNA gefällt. Nach dieser Wartezeit wurde 20 Minuten bei 4°C und 13 000rpm zentrifugiert, der Überstand mit einer Kapillare abgesaugt und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Die RNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 100µl DEPC-sb bei 50°C gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Chirgwin-Lösung:

Guanidinium-Thiocyanat	474g/L (4M)
Natriumcitrat	7.35g/L (25mM, pH 7)
Sarcosyl	5g/L (0.5%)

3.5.12 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die RNA-Konzentration wurde mit dem Qubit™ Fluorometer (invitrogen™) nach Anleitung des Herstellers bestimmt.

3.5.13 Agarosegelelektrophorese für RNA-Proben

Für 100mL Gel wurden 1.2g Agarosegel in einen Kolben eingewogen, mit 72mL DEPC-sb und 10mL 10x MOPS versetzt und aufgeschmolzen. Nach dem Abkühlen auf 50°C in einem Wasserbad wurden 18mL 37% Formaldehyd hinzugefügt und das Gel in den Gießstand gegossen. Dieses wurde etwa eine Stunde stehen gelassen, um auszupolymerisieren.

In der Zwischenzeit wurden die Proben mit der entsprechenden Menge Denaturant versetzt und für 30 Minuten auf 65°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden sie in Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde bei 80V und 250mA durchgeführt.

10x MOPS Puffer:

3-(N-Morpholino)propansulfonat (MOPS)	52g
EDTA	1.9g
DEPC-sb	500mL

Einstellen des pH-Wertes auf 7.0 mit NaOH
In der Dunkelheit bei 4°C lagern

Denaturant:

Formaldehyd (36%)	4µl
Foramid	10µl
10x MOPS	2µl
DEPC-Ethidiumbromid	2µl
	18µl

3.5.14 DNase-Verdau

Die RNA-Lösung musste so verdünnt werden, dass die Konzentration letztendlich 1 µg/µL betrug. Anschließend wurden 3µL von dieser Verdünnung in einem Eppendorf-Gefäß mit 3µL 10x Puffer, 21µL RNase-freiem Wasser (behandelt mit DEPC) und 3µL DNase I versetzt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden 3µL 25mM EDTA dazupipettiert und der Ansatz 10 Minuten lang auf 65°C erwärmt.

3.5.15 Herstellen einer cDNA

Um die RNA in cDNA umzuschreiben wurde ein Kit der Firma Fermentas (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, #K1631, Fermentas, Burlington, Kanada) verwendet. Es war wichtig den Versuch mit DEPC-behandelten Utensilien und Lösungen (wie z.B. das Wasser) durchzuführen, sowie den Ansatz auf Eis zu pipettieren, damit die empfindliche RNA nicht zerstört wurde.

Von der DNase-verdauten RNA-Lösung wurden 10µL in ein Eppendorf-Gefäß überführt, welche dann mit je 1µl Oligo-(dT)₁₈-Primer und Random-Hexamer-Primer versetzt wurden. Der Ansatz wurde anschließend bei 70 °C für 5 Minuten inkubiert und dann abgekühlt.

MATERIALIEN UND METHODEN

Darauffolgend wurden 4µL Reaktionspuffer, 1µL RiboLock Ribonuclease-Inhibitor und 2µL 10mM dNTP dazupipettiert und der Ansatz auf 25°C für 5 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1µL Aid H Minus M-MuLV Reverser Transkriptase. Nach weiteren 10 Minuten bei 25°C wurde für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch zehnmütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt. Die so erhaltenen cDNA-Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

3.5.16 Real-Time PCR

Um Kontaminationen zu vermeiden wurden Filterspitzen (Multiguard Barrier Tips, Sorenson Bio Science Inc., USA) und RNase-freies Wasser verwendet.

Die zuvor synthetisierte cDNA wurde 1:10 verdünnt. Um sämtliche Fehler zu minimieren (z.B. Pipettierfehler), setzte man für jede Probe Triplets an. Hierbei wurden das Ziel- und das Referenzgen in einem Lauf gemessen.

Folgender Ansatz wurde verwendet:

	Menge	Vorratskonzentration	Endkonzentration
Forward Primer	0.4µL	6.25pmol/µL	0.1pmol/µL
Reverse Primer	0.4µL	6.25pmol/µL	0.1pmol/µL
DEPC behandeltes sb	9.2µL		
IQ SYBER Green ® Supermix	12.5µL		
cDNA	<u>2.5µL</u>		
Gesamtvolumen	25µL		

Der Ansatz (beinhaltet alle Komponenten außer der cDNA) wurde für die benötigte Anzahl an Proben und Blindwerten mit 15% Überschuss pipettiert. Die Lösung wurde mit 10% Überschuss in Eppendorfgläser überführt (75.25µL für ein Triplett) und mit cDNA bzw. sb für die Blindwerte (ebenfalls mit 10% Überschuss) versetzt und gut am Vibrationschüttler gemischt. Je 25µL wurden in eine mit Wells ausgestattete, 96 Vertiefungen umfassende Platte pipettiert und mit einer Klebefolie abgedeckt. Die Real-Time PCR wurde im iCycler IQ™ (Biorad) durchgeführt.

Folgendes Programm wurde durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95°C	90 sec	} 51 Zyklen
Denaturierung	95°C	20 sec	
Primeranlagerung	60°C	20 sec	
Elongation	72°C	30 sec	

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung von Inverted Repeats aus DNA-Fragmenten von Rezeptor codierenden Genen von *T. atroviride* P1

Inverted Repeats bestehen aus zwei identischen Sequenzen, die in gegenläufiger Richtung zu einander stehen. Für RNAi Techniken wird meistens ein 300 bis 500bp langes Fragment, und nicht das ganze Gen verwendet.

Zur Verfügung standen kurze DNA-Fragmente der Rezeptoren *gpr1*, *gpr2* und *gpr3*, welche von Marion Pucher (Pucher 2006) in den Vektor pGEM-T eingebracht wurden (unveröffentlichte Arbeit). Diese wurden so konstruiert, dass sie eine *XbaI*- und eine *HindIII*-Schnittstelle am Anfang und am Ende jeder Sequenz besaßen. Die Schnittstellen wurden in Folge genutzt, um aus den Fragmenten Inverted Repeats zu erzeugen. Dazu war es notwendig, zunächst die Ziel-DNA herauszuschneiden und anschließend zu ligieren. Nach Vermehren des Stücks mit spezifischen Primern über PCR wurde es in den pGEM-T Vektor eingebracht und im *E. coli* vermehrt, um es über *HindIII*-Schnittstellen an beiden Enden des Fragments in den Silencing-Vektor pSILENT2 zu ligieren.

4.1.1 Konstruktion von Inverted Repeats für das Silencing von *gpr1*

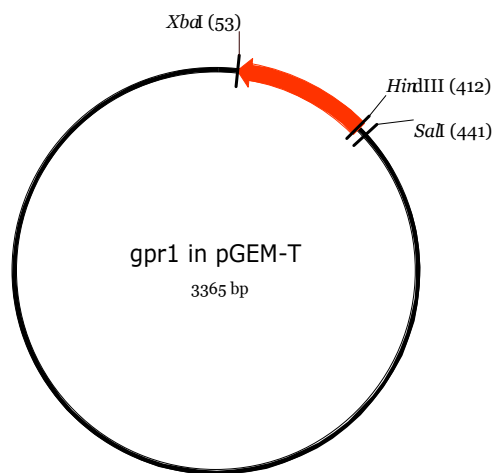


Abb. 5: Die Darstellung zeigt den ursprünglichen Vektor, aus dem das Insert für die Selbstligation ausgeschnitten wurde

Der oben erwähnte pGEM-T Vektor mit dem *gpr1*-Fragment (359bp) wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym *SalI* geschnitten. Nach dem Auffüllen der Enden mit dNTPs und Klenow-Fragment (Fermentas) wurde das Insert schließlich mit *XbaI* herausgeschnitten, sodass auf der *SalI*-Seite ‚blunt ends‘ und auf der *XbaI*-Seite ‚sticky ends‘ vorlagen. Auf diese Weise konnte gewährleistet werden, dass zwei gleiche DNA-Fragmente hauptsächlich über deren *XbaI*-Schnittstellen ligiert werden konnten. Da die *HindIII*-Schnittstellen unversehrt waren, konnte nun das ligierte DNA-Stück über diese mit spezifischen Primern vermehrt werden. Durch die beschriebene Ligation befand sich auf beiden Enden je eine *HindIII*-Schnittstelle, sodass nur ein einziger Primer für die PCR benötigt wurde.

Primer: 5'- AAG CTT CCC ATA TCA ATC GAC GAG GTC ACC -3'
 Amplikonlänge: 718bp

ERGEBNISSE

PCR-Programm:	Erste DNA-Denaturierung	94°C	3 min.	}	38 Zyklen
	DNA-Denaturierung	94°C	30 sec.		
	Primer-Anlagerung	59.5°C	30 sec.		
	Elongation	72°C	60 sec.		
	Finale Elongation	72°C	5 min.		

Ob die Ligation und die PCR funktioniert haben wurde mittels Gelelektrophorese untersucht.

Das DNA-Fragment mit der richtigen Größe (es gab mehrere Banden aufgrund unspezifischer Bindung des Primers) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und nach dem Aufreinigen in den pGEM-T Vektor kloniert. Dieser wurde sodann im *E. coli* vermehrt. Es war notwendig mehrere Kolonien gleichzeitig zu picken, denn nur sehr wenige von ihnen enthielten den Vektor mit dem Inverted Repeat. Nach der Isolation der DNA wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym *HindIII* geschnitten, sodass das Inverted Repeat wieder isoliert werden konnte. Der Silencing Vektor pSILENT2 wurde ebenfalls mit *HindIII* geschnitten. In Folge wurden die Enden mit CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Fermentas) dephosphoryliert, womit die Religation des Vektors vermieden werden sollte. Im Anschluss wurde das Inverted Repeat in den pSILENT2 eingebracht und ebenfalls im *E. coli* vermehrt. Wieder war es notwendig mehrere Kolonien (etwa zwanzig) per Zufallsprinzip auszuwählen, um wenigstens eine dabei zu haben, die den richtigen Vektor enthielt. Zur Kontrolle wurde der Vektor nach der DNA-Isolation mit *HindIII* und mit *XbaI* geschnitten, was den eindeutigen Beweis für das Vorhandensein der DNA-Sequenz im Vektor erbrachte.

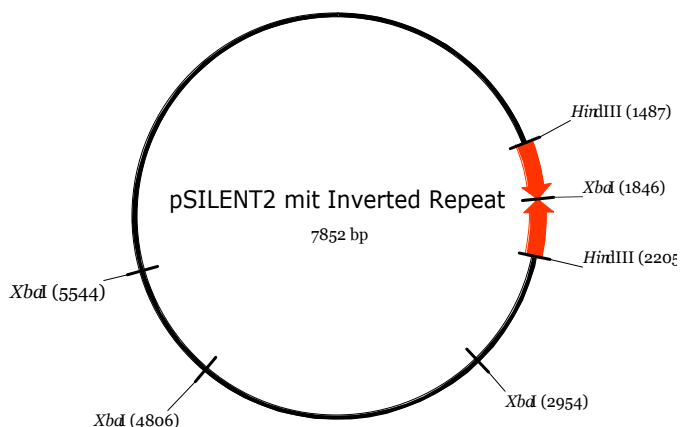
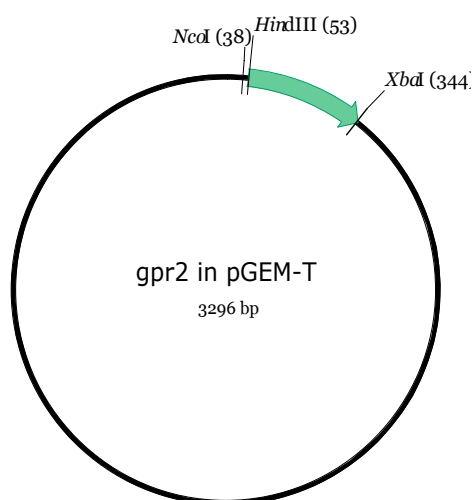


Abb. 6: Darstellung des konstruierten Vektors für das Silencing von *gpr1* mit allen *XbaI*- und *HindIII*-Schnittstellen.

4.1.2 Konstruktion von Inverted Repeats für das Silencing von *gpr2*



Aufgrund der Lage der DNA-Sequenz von *gpr2* im pGEM-T Vektor wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *NcoI* herausgeschnitten, sodass sich die *HindIII*-Schnittstelle unversehrt in unmittelbarer Nähe der *NcoI*-Schnittstelle befand. Diese war nun wichtig, da wieder die Tatsache genutzt wurde, dass durch die Ligation zweier Fragmente ein Inverted Repeat geschaffen wurde, welcher nun am 5' und am 3' Ende dieselbe Primerbindungsstelle enthielt.

Folgender Primer wurde für die PCR verwendet:
 5'- AAG CTT CAC TTT CTT CAT CTA TAT TCG
 AGC TGG -3'
 Amlikonlänge: 582bp

Abb. 7: Darstellung der Lage der *gpr2*-Sequenz im pGEM-T Vektor.

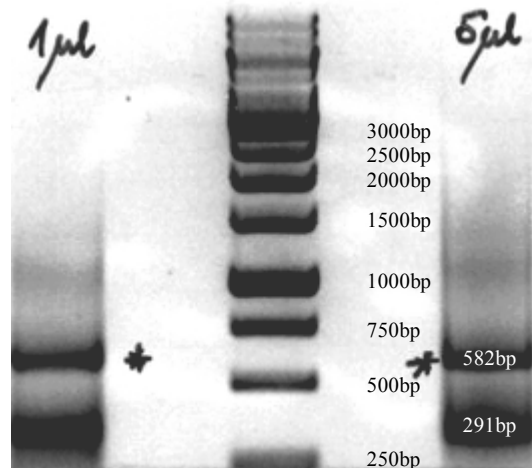
ERGEBNISSE

Wie bei *gpr1* auch entsprachen die ersten sechs Basen der *HindIII*-Schnittstelle.

Das PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

Erste DNA-Denaturierung	94°C	3 min.	}	35 Zyklen
DNA-Denaturierung	94°C	30 sec.		
Primer-Anlagerung	58.5°C	30 sec.		
Elongation	72°C	60 sec.		
Finale Elongation	72°C	5 min.		

Abb. 8: Die Abbildung zeigt das Gel nach der Elektrophorese der PCR-Produkte. Die PCR wurde mit zwei unterschiedlichen Mengen des Ligationsansatzes durchgeführt. Zu erkennen sind zwei unterschiedlich große Banden, eine 291bp und die andere 582bp groß. Beim größeren DNA-Fragment handelt es sich um den Inverted Repeat des *gpr2*. Die untere Bande ist das nicht ligierte Fragment, welches nur halb so groß ist.



Das größere DNA-Fragment wurde in Folge aus dem obigen Gel ausgeschnitten, eluiert und mit dem Restriktionsenzym *XbaI* verdaut, wodurch es laut Theorie in zwei gleich große Stücke geschnitten werden sollte.

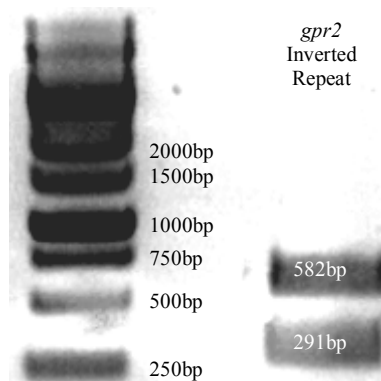
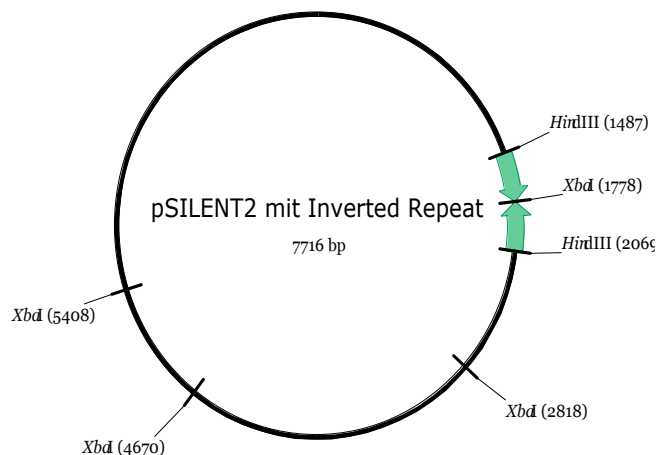


Abb. 9: Auf dem Bild ist das Ergebnis eines unvollständigen Restriktionsverdaus mit *XbaI* zu sehen. Da das kleinere Fragment auftaucht ist somit bewiesen, dass es sich um das oben über Ligation und PCR konstruierte Fragment tatsächlich um das Inverted Repeat von *gpr2* handelt.

Das Konstrukt des *gpr2* wurde auf die gleiche Weise vermehrt, wie bei *gpr1* beschrieben. Ebenso wurde nach der Ligation des DNA-Fragments in den Vektor pSILENT2 durch Restriktionsverdau mit *XbaI* und *HindIII* nachgewiesen, dass das gewünschte Insert im Silencing Vektor enthalten war.

Abb. 10: Die Abbildung zeigt das Konstrukt im Vektor pSILENT2.



ERGEBNISSE

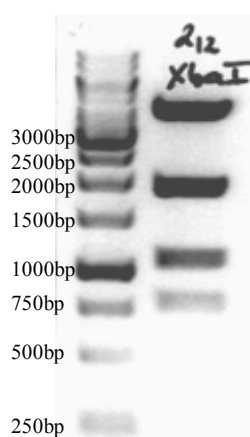
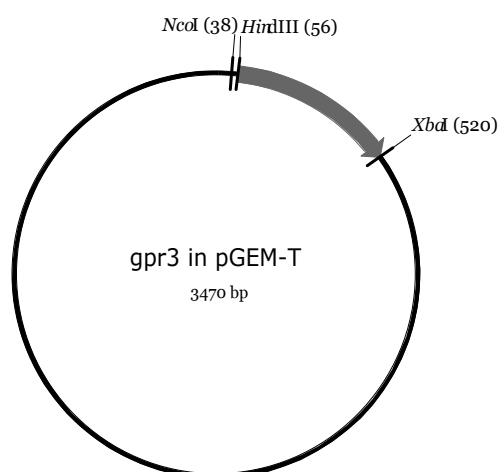


Abb. 11: In der Abbildung ist der Vektor pSILENT2 mit dem Inverted Repeat von *gpr2* nach dem Restriktionsverdau mit *XbaI* zu sehen. Durch die vier Schnittstellen im Vektor entstehen die vier charakteristischen Banden. Beim Vektor ohne Inverted Repeat wären nur drei Banden sichtbar, da die Schnittstelle im Insert selbst fehlt.

4.1.3 Konstruktion von Inverted Repeats für das Silencing von *gpr3*

Die Konstruktion des Inverted Repeats aus dem DNA-Fragment von *gpr3* erfolgte auf ähnliche Weise wie bei *gpr2* beschrieben. Enzyme für das Herausschneiden aus dem pGEM-T Vektor waren ebenfalls *NcoI* und *XbaI*.



Nach der Ligation wurde folgendes PCR-Programm durchgeführt:

Erste DNA-Denaturierung	94°C	3 min.
DNA-Denaturierung	94°C	30 sec.
Primer-Anlagerung	55.5°C	30 sec.
Elongation	72°C	60 sec.
Finale Elongation	72°C	5 min.

Das Programm durchlief 35 Zyklen.

Abb. 12: In der Abbildung ist der pGEM-T Vektor mit der ausgewählten Sequenz des Rezeptors *gpr3* dargestellt.

Primer:

5'- AAG CTT GGA TCT ACT GCC TAA TTT GTT ACG -3'

Amplikonlänge: 928bp

Durch das Auftreten von mehreren unspezifischen Banden war die Menge des gesuchten DNA-Fragments relativ gering, sodass die PCR nach dem Ausschneiden und Eluieren der Bande aus dem Agarosegel so lange wiederholt werden musste, bis genügend Insert für die Ligation in pGEM-T vorhanden war. Im Anschluss wurde genauso verfahren wie oben bereits beschrieben.

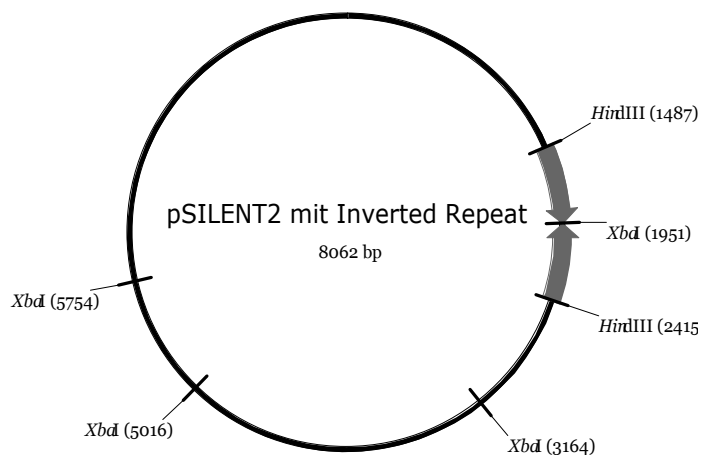


Abb. 13: Die Darstellung zeigt den fertigen Vektor für das Silencing.

4.2 Transformation des *T. atroviride* mit dem Silencing Vektor

Die drei konstruierten Vektoren wurden mittels Protoplastentransformation in den Wildtyp *T. atroviride* P1 eingebracht. Nach wenigen Tagen wurden:

- 12 Stämme potentieller *gpr1*-Transformanten
- 17 Stämme potentieller *gpr2*-Transformanten
- 6 Stämme potentieller *gpr3*-Transformanten isoliert.

Für die Nachweisreaktionen mittels PCR bzw. Real Time PCR wurden sechs *gpr1*- und *gpr2*-Transformanten, sowie fünf *gpr3*-Transformanten ausgesucht. Diese trugen die Bezeichnungen:

- *gpr1_sil*: 1/2, 1/4, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9
- *gpr2_sil*: 2/2, 2/4, 2/5, 2/11, 2/15, 2/17
- *gpr3_sil*: 3/1, 3/3, 3/4, 3/5, 3/6

4.3 Nachweis mittels PCR

Die durch den pSILENT2 Vektor eingebrachten Promotor- und Terminatorregionen wurden genutzt, um über diese das Vorhandensein des Inserts im Genom der Pilze nachzuweisen, denn dieses befand sich genau dazwischen. Somit konnten die gleichen Primer für alle drei Transformantentypen eingesetzt werden.

Verwendete Primer:

prom123fw: 5' – AAT GTG AAG CCA GGG GTG TAT AGC – 3'

term123rev: 5' – GTC TCC CGA AAA TGA AAA TAG TGC – 3'

Amplikonlängen:

- *gpr1_sil*: 1538bp
- *gpr2_sil*: 1402bp
- *gpr3_sil*: 1748bp

Das PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

Erste DNA-Denaturierung	94°C	3 min.
DNA-Denaturierung	94°C	30 sec.
Primer-Anlagerung	60.8°C	30 sec.
Elongation	72°C	90 sec.
Finale Elongation	72°C	5 min.

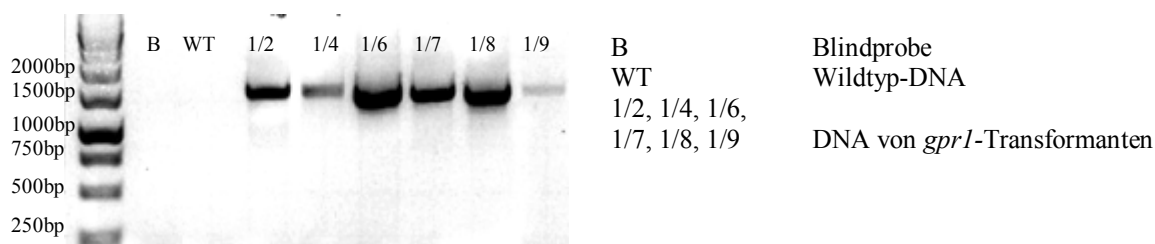


Abb. 14: Das Bild zeigt das Ergebnis der PCR mit den oben angeführten für die Transformanten spezifischen Primern. Wie deutlich zu sehen ist, tritt bei der Blindprobe (No Template Control) und beim Wildtypstamm P1 keine Bande auf, bei den Transformanten aber schon. Das bedeutet, dass die Integration des Silencing Vektors in das Genom von P1 bei allen sechs für diesen Rezeptor ausgewählten Transformanten erfolgreich war.

Bei allen Transformanten, die für die Identifizierung ausgesucht wurden, konnte ein Amplikon mit der für jeden Rezeptor richtigen Länge mittels PCR nachgewiesen werden. Das bedeutete, dass zumindest eine Integration des konstruierten Vektors mittels ‚cross-over‘ stattgefunden hat. Ob aber das Konstrukt tatsächlich einen Einfluss auf die Expressionsrate der Rezeptoren hatte, musste mittels quantitativer Real-Time PCR nachgewiesen werden.

4.4 Expressionsanalyse mittels Real-Time PCR

Nachdem mittels PCR nachgewiesen wurde, dass der konstruierte Vektor tatsächlich ins Genom des Pilzes *T. atroviride* P1 integriert war, blieb nur noch zu bestimmen, wie hoch die Silencingrate der einzelnen Transformanten war. Dieser Nachweis wurde mit der Real-Time PCR durchgeführt. Dabei wurde SYBR Green verwendet, dessen Fluoreszenz während der PCR ab einer bestimmten Konzentration gemessen werden konnte.

4.4.1 Der Rezeptor *gpr1*

Für die Expressionsanalyse mittels Real Time PCR war es zunächst notwendig alle Transformanten für die RNA-Isolation auf Platten mit PDA-Medium anzuzüchten. Schon während dieser Phase fiel auf, dass sich die Transformanten des Rezeptors *gpr1* morphologisch vom Wildtyp unterschieden. Während zwei von den sechs ausgesuchten Stämmen (1/4, 1/9) wie der Wildtypstamm ein flauschiges Luftmycel bildeten, wuchsen die anderen vier (1/2, 1/6, 1/7, 1/8) in den Agar hinein, sodass kaum Luftmycel zu sehen war. Dies ließ vermuten, dass der Locus für die Integration des Vektors einen Einfluss auf die Expression haben könnte, was aber noch zu beweisen war.

Die nachfolgenden Bilder verdeutlichen, wie groß der Unterschied der einzelnen Transformantenstämme tatsächlich war. Alle Transformanten waren zum Zeitpunkt der Bildaufnahme sechs Tage alt. Zudem wurde jede von ihnen auf einer PDA-Platte bei 28°C gezüchtet. Die phänotypischen Unterschiede könnten also nicht auf unterschiedliche Bedingungen bei der Kultivierung zurückgeführt werden.

Die sechs ausgewählten Transformantenstämme sahen folgendermaßen aus:



Abb. 15: Transformante 1/2



Abb. 16: Transformante 1/4



Abb. 17: Transformante 1/6

ERGEBNISSE



Abb. 18: Transformante 1/7



Abb. 19: Transformante 1/8



Abb. 20: Transformante 1/9

Vier dieser Transformanten, welche die höchste Silencingrate aufwiesen, wurden auch bei 22°C auf PDA-Platten gezüchtet:



Abb. 21: Transformante
1/2



Abb. 22:
Transformante 1/6



Abb. 23: Transformante
1/7



Abb. 24: Transformante
1/8

Für die Real Time PCR des *gpr1* wurden folgende Primer verwendet:
 tgpcr1RTforward: 5'- TTG ATC CAG ACC TTC ATG CCA GC - 3'
 tcpcr1RTreverse: 5'- CAT AAA AGG CCG CGA CAC GAA - 3'

Und dieses PCR-Programm wurde verwendet:

Erste DNA-Denaturierung	95°C	90 sec..	}	50 Zyklen
DNA-Denaturierung	95°C	20 sec.		
Primer-Anlagerung	60°C	20 sec.		
Elongation	72°C	30 sec.		

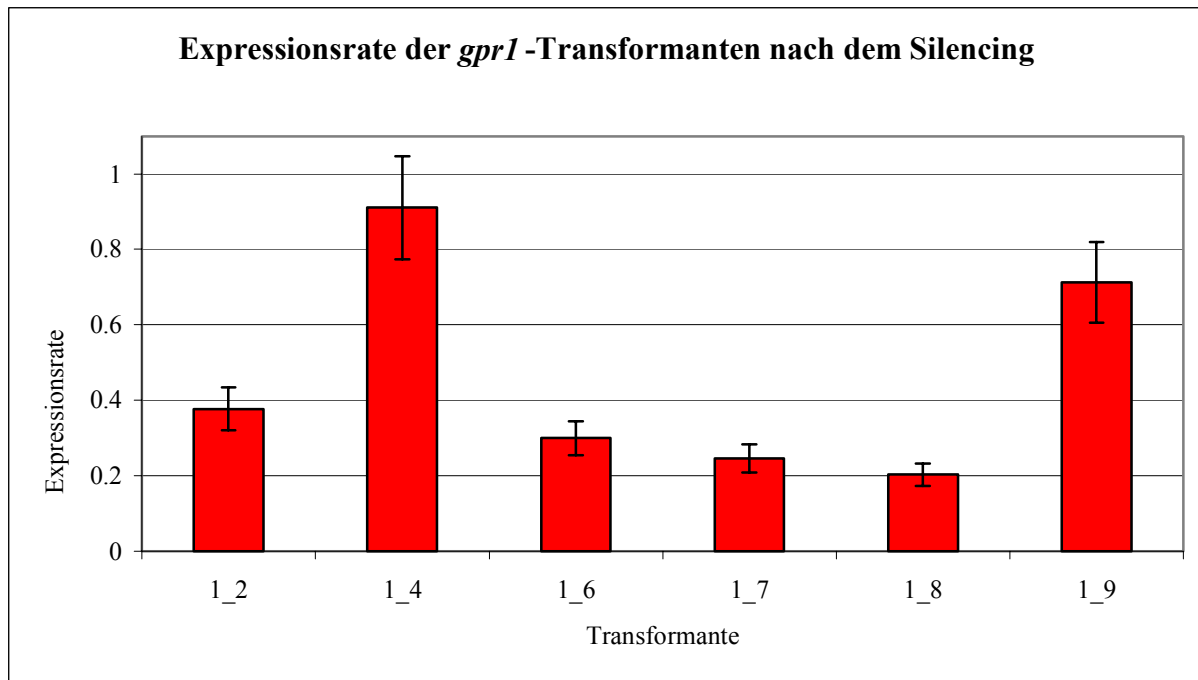


Abb. 25: Die Abbildung zeigt die aus der Real Time PCR erhaltenen Ergebnisse, dargestellt als Expressionsrate in Bezug auf den Wildtypstamm P1 = 1. Wie deutlich zu sehen ist verhalten sich die sechs Transformanten gleichen Typs völlig unterschiedlich.

Die obige Darstellung der Ergebnisse aus der Real-Time PCR bekräftigte die Vermutung, dass der Ort im Genom des Pilzes, an dem das Inverted Repeat integriert wurde, einen Einfluss darauf haben könnte, wie gut das Zielgen tatsächlich gesilenced wurde. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen den obigen Ergebnissen und dem Verhalten der Transformanten beim Kultivieren festgestellt werden. Denn jene Stämme, welche in den Agar hineinwuchsen und kaum Luftmycel bildeten (1/2, 1/6, 1/7, 1/8) wiesen auch eine deutlich niedrigere Expressionsrate auf. Bei diesen Transformanten war das Silencing also deutlich erfolgreicher als bei den Stämmen 1/4 und 1/9.

4.4.2 Der Rezeptor *gpr2*

Nach dem gleichen Prinzip wie zuvor beschrieben und mit dem gleichen Real Time PCR Programm wurden auch die Transformanten des Rezeptors *gpr2* untersucht.

Primer hierfür waren:

Trez94int2F: 5'- CTG CCC TCG TGT ACA TCT TCC – 3'

Trez94int2R: 5'- GCC TTC AGA TGA GTG AAA GTC G – 3'

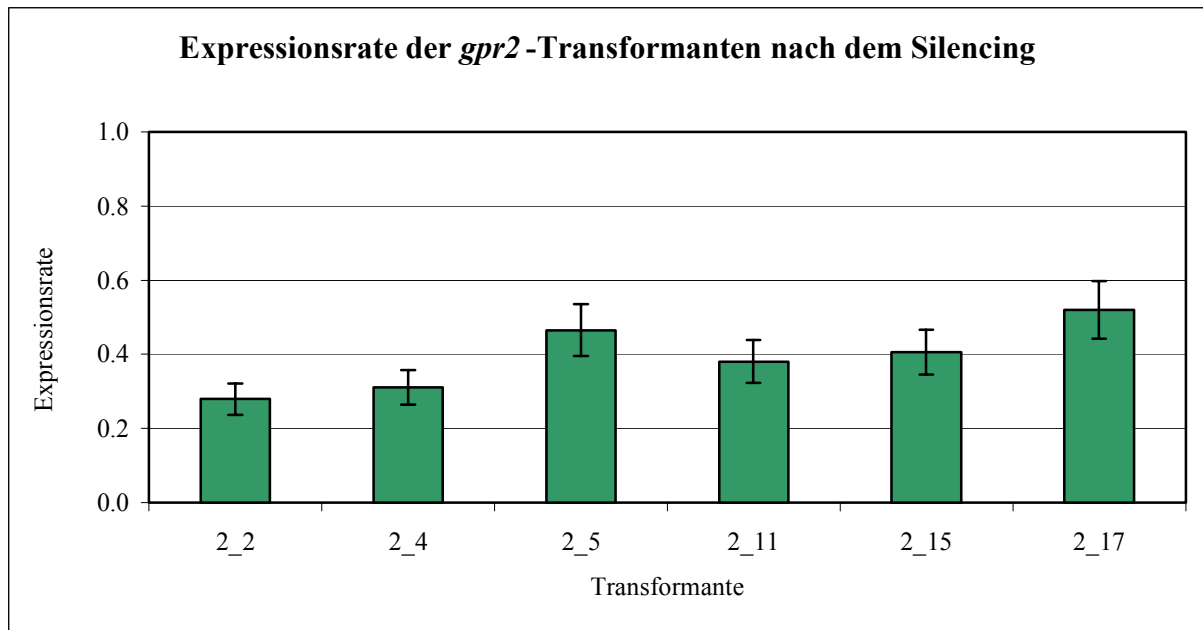


Abb. 26: Die Abbildung zeigt das Expressionsverhalten der Pilze nach dem Silencing des Rezeptors *gpr2*. Die Transformanten weisen untereinander keine großen Unterschiede auf.

Die Real-Time PCR der Transformanten, bei denen das Gen *gpr2* gesilenced war, wiesen untereinander relativ ähnliche Expressionsraten auf. Auch rein phänotypisch betrachtet war zwischen den Stämmen kein Unterschied zu sehen, denn alle wuchsen auf PDA-Medium gut an und bildeten ein ähnliches Mycel wie der Wildtyp.

4.4.3 Der Rezeptor *gpr3*

Der Phänotyp der Transformanten der Rezeptors *gpr3* glich dem des Pilzes *T.atroviride* P1. Mittels PCR wurde bereits nachgewiesen, dass sich das Silencing-Konstrukt im Genom der fünf ausgesuchten Stämme befand. Mit der Real-Time PCR war nun noch zu untersuchen, wie hoch die Restexpression dieser Transformanten war. Verwendet wurde das gleiche PCR-Programm, wie bei den zuvor beschriebenen Versuchen.

Primer:

neutgpcr3RTforw: 5'- GCC AGC ATT GGA ACC ATC ATC G – 3'

neutgpcr3RTreve: 5'- CCC AAC ACC AGA TCG TAG CTC CA – 3'

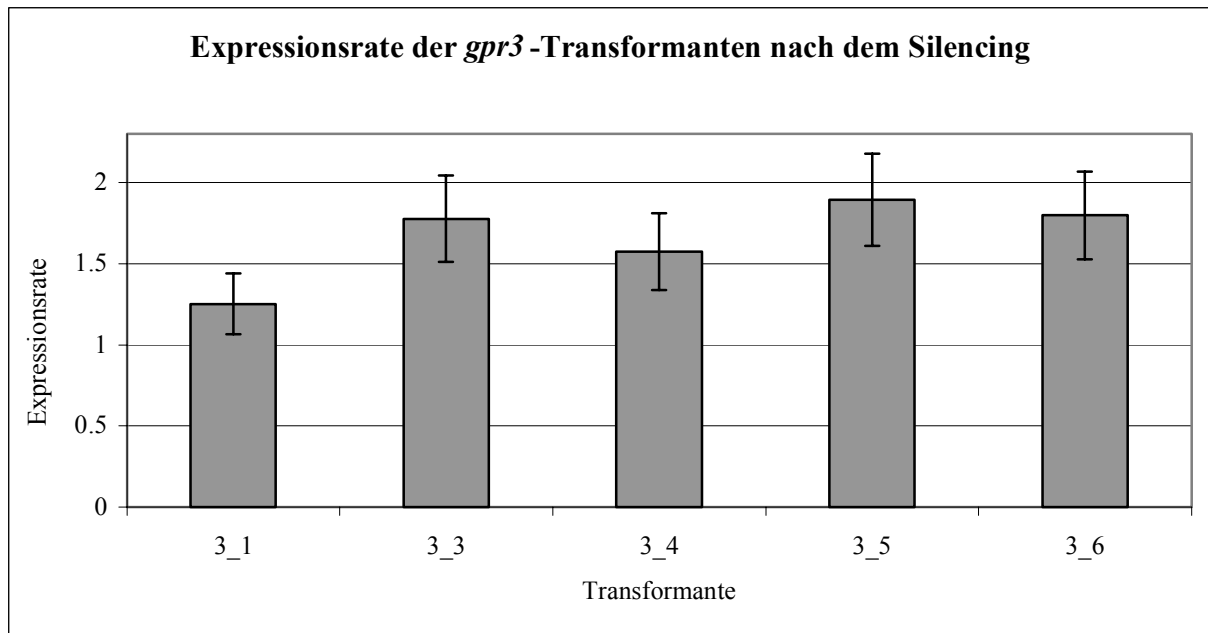


Abb. 27: In der Abbildung sind die Expressionsraten der Transformanten von *gpr3* zu sehen. Bei allen Stämmen liegen die Werte deutlich über 1.

Der obigen Darstellung nach lagen die Expressionsraten nach dem Silencing des Rezeptors *gpr3* deutlich über 100%. Das Ergebnis widersprach dem Ziel dieser Methode, denn nach dem Silencing sollten die Transformanten entweder niedrigere oder gleich hohe Expressionsraten aufweisen.

4.5 Konfrontationsversuche auf PDA-Platten

Nach dem Silencing wurden Transformanten (mit der höchsten Silencingrate) aller drei Rezeptoren sowie der Wildtypstamm P1 auf Platten mit den Pathogenen *B. cinerea*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *A. nidulans* und *P. ultimum* konfrontiert. Transformanten von *gpr2* und *gpr3* zeigten im Vergleich zu P1 keine Unterschiede, weder in der Wachstumsgeschwindigkeit noch im Verhalten gegenüber dem Pathogenen.

4.6 Bestimmung der Biomasse in Flüssigkultur

Für diesen Versuch wurden je zwei *gpr1*- und *gpr2*-Transformanten, zwei *gpr3*-Transformanten sowie der Wildtyp P1 herangezogen. Die Anzucht von 10^7 Sporen erfolgte in 150ml synthetischem Medium, welches 2% Glycerin als Kohlenstoffquelle beinhaltete. Nach 36 Stunden Vorkultivation bei 28°C wurde das gebildete Mycel abfiltriert und auf fünf Kolben aufgeteilt. Diese beinhalteten 50ml synthetisches Medium und 1% Glucose, Glycerin, N-Acetylglucosamin, kolloidales Chitin oder keine Kohlenstoffquelle. Nach sofortigem Ziehen einer Probe von 5ml (als Referenz zum Zeitpunkt 0) aus jedem Kolben wurde für 48h bei 28°C inkubiert. Im Anschluss wurden wieder aus jedem Kolben 5ml entnommen.

Vor der Messung musste das Mycel der gezogenen Proben aufgeschlossen werden. Dazu wurden in einem Eppendorf-Gefäß Glaskugeln mit 1ml 0.1N Natronlauge überschichtet, das abfiltrierte Myzel hinzugefügt und in der Fastprep Apparatur das Mycel aufgeschlossen. Nach drei Stunden bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert, um die festen Bestandteile vom Überstand abzutrennen. Die Lösung wurde laut Vorschrift des verwendeten „Bio-Rad protein

ERGEBNISSE

assay' (Bio-Rad) behandelt und mit dem Photometer bei 595nm die Proteinkonzentration bestimmt.

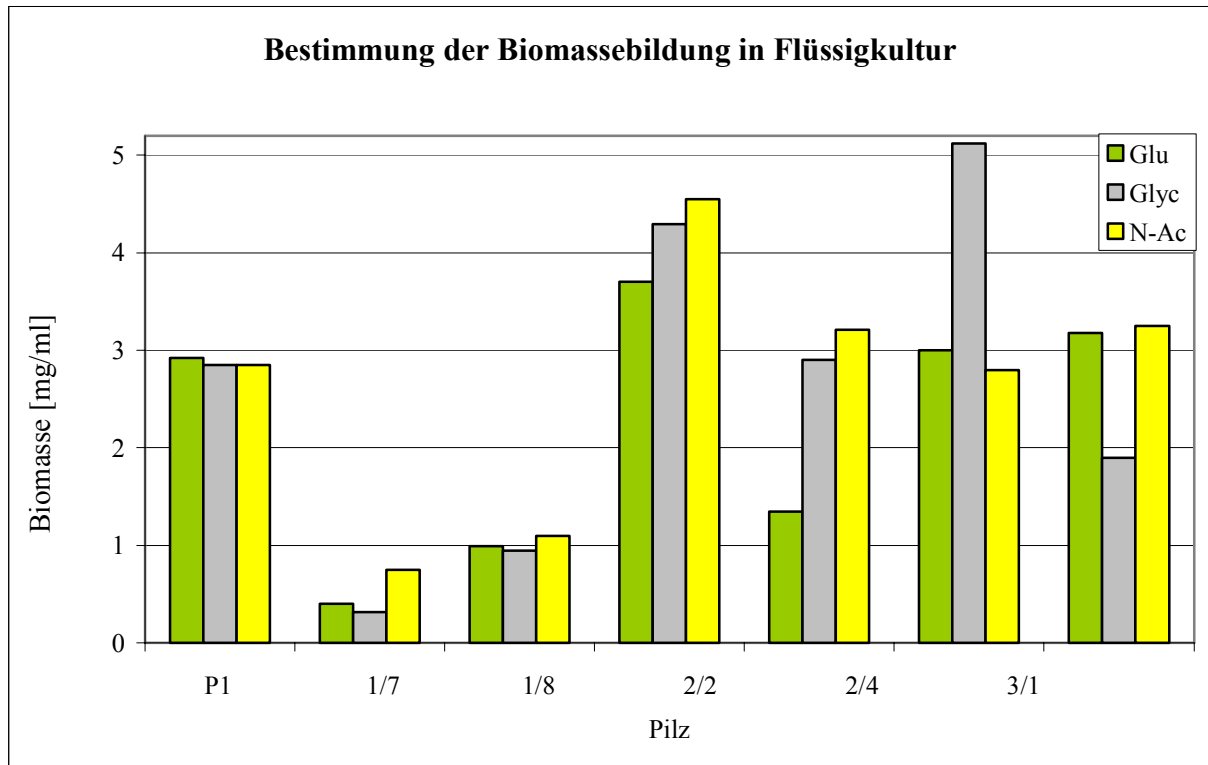


Abb. 28: In der Abbildung sind die Ergebnisse der Biomassebestimmung nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen dargestellt. Die Transformanten des *gpr1* produzieren offensichtlich weniger Biomasse als die anderen untersuchten Pilzstämme.

Die Auswertung der gemessenen Daten ergab, dass alle Transformanten der Rezeptoren *gpr2* und *gpr3* sowie der Wildtyp P1 sehr gut auf Glucose, Glycerin und N-Acetylglucosamin wuchsen. In synthetischem Medium mit Chitin oder ohne Kohlenstoffquelle konnte ein Abbau der Biomasse registriert werden.

Die Transformanten von *gpr1* wuchsen auf allen Kohlenstoffquellen, bzw. auch ohne Kohlenstoffquelle, aber deutlich langsamer als die anderen Transformanten oder der Wildtyp. Sie zeichneten sich außerdem dadurch aus, dass sie im flüssigen Medium rein weiße Pellets bildeten, welche sich deutlich von den Mycelklumpen anderer Stämme unterschieden.

5 DISKUSSION

Eine große Anzahl von Pilzen, die der Gattung *Trichoderma* angehören, können als Mykoparasiten wirken und werden kommerziell als Biokontrollorganismen gegen pflanzenpathogene Pilze, wie *R. solani*, *B. cinerea*, *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum* und *Pythium* spp., eingesetzt (Chet 1987, Chet et al. 1998, Harman und Björkman 1998). Was für gewöhnlich unter Biokontrolle verstanden wird ist eine Kombination verschiedener Mechanismen, wie die Formation infektiöser Strukturen (Coiling), Produktion hydrolytischer Enzyme, Sekretion antifungaler Metabolite und Induktion der Abwehrantwort in Pflanzen, welche allesamt synergistisch zusammenwirken (Harman et al. 2004, Howell 2003). Es wird vermutet, dass die Erkennung und der Angriff des Wirts durch Abbauprodukte der Wirtszellwand ausgelöst wird. In Pilzen kann die Signalübertragung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren erfolgen, welche in der Zellmembran verankert sind. Diese leiten externe Reize aus der Umgebung der Zelle über eine komplexe Signaltransduktionskaskade in den Zellkern, wo sie eine Reihe von Genen positiv oder negativ beeinflussen können. Da diese ‚Vermittler‘ eine Reihe von wichtigen Reaktionen für das mykoparasitäre Verhalten des Pilzes *T. atroviride* einleiten können, ist es besonders wichtig die Rezeptoren genau zu untersuchen und deren Funktion aufzuklären. Das könnte auch der Stammverbesserung als Basis für eine effizientere Biokontrolle von Nutzen sein.

Versuche mit dem Ziel, die klonierten Rezeptoren des *T. atroviride* durch Knock-out auszuschalten, blieben ohne Erfolg. Diese Tatsache machte es notwendig die Strategie neu zu überdenken und eine andere Methode zu wählen. Die Idee stützte sich auf die Konstruktion von doppelsträngiger RNA, welche in Form von Inverted Repeats in das Genom des Wildtyps eingebracht werden sollte. In Vorversuchen wurden bereits zwei identische Sequenzen von Teilen der Rezeptorgene in zwei pGEM-T Vektoren so eingebracht, dass deren Basenabfolge in entgegengesetzte Richtung zeigte. Diese Vektoren wurden dann mit zwei gleichen Restriktionsenzymen verdaut, mit dem Ziel die zwei eingebrachten Inserts zusammen zu ligieren, so dass in einem neuen Vektor Inverted Repeats aus den ursprünglichen zwei Vektoren kreiert werden. Unabhängig von der Wahl der zwei Restriktionsenzyme war es unmöglich, nach der Ligation das Produkt so in *E. coli* zu transformieren, sodass die Sequenz erhalten blieb. Schon in den frühen 90er Jahren haben Sinden et al. eine Reihe von Versuchen mit Inverted Repeats unterschiedlicher Länge durchgeführt, um dem Problem des Klonierens von diesen Sequenzen in das Bakterium *E. coli* auf den Grund zu gehen (Sinden et al. 1991). Die Untersuchungen zeigten, dass es praktisch unmöglich war, Inverted Repeats mit einer Länge größer als 150bp unversehrt in plasmidischer DNA des *E. coli* beizubehalten. Die Instabilität von solchen Sequenzen ist das Resultat von inter- und intramolekularer Rekombination einerseits und der Ausbildung von kreuzartigen Strukturen andererseits. Die letztere Struktur, welche in supercoiled DNA hohe Stabilität aufweist, kann durch Transkription und Replikation wieder in die lineare Form konvertiert werden mit dem Verlust der transkriptionellen Information der kreuzartigen Struktur (Sinden et al. 1991).

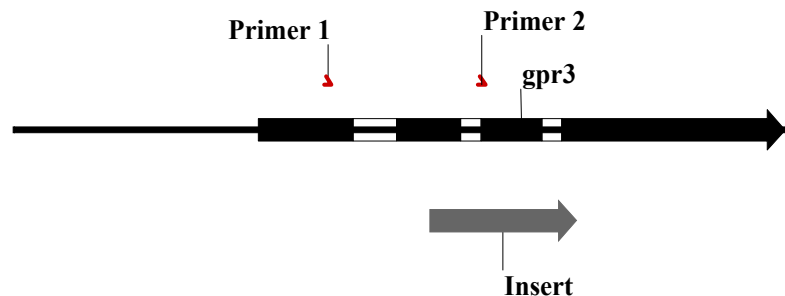
Durch die gescheiterten Versuche zu Anfang war es notwendig die Strategie neu zu überdenken und einen anderen Ansatzpunkt zu finden. Dabei blieb das Ziel das gleiche, nämlich das Konstruieren von doppelsträngiger RNA. Letztendlich wurde entschieden, diesem Vorhaben über eine PCR-Strategie nachzugehen, die auch bei allen drei Rezeptoren erfolgreich war. Nach dem Einbringen der Inverted Repeats in den für das Silencing konstruierten Vektor pSILENT2 konnte mittels der RNAi Technik das Fragment nach dem Einbringen in das Genom des Wildtyps die Expression beeinflussen. Da der Pilz *T. atroviride* Heterokaryen ausbilden kann, war es besonders wichtig durch mehrmalige Sporenvereinzellung der erhaltenen Stämme potentielle Transformanten aufzufinden. Diese Methode führte zu sehr vielen positiven Transformanten, aus denen willkürlich einige für die

DISKUSSION

Identifizierung und Charakterisierung ausgewählt wurden. Der eindeutige Nachweis, dass es sich bei den Stämmen um Transformanten der drei Rezeptoren handelte, wurde mit Hilfe von spezifischen Primern über die PCR erbracht, wobei alle ausgesuchten Stämme tatsächlich das eingebrachte Konstrukt enthielten. Desweiteren wurde das Real-Time Monitoring für die Bestimmung der Expression der drei Zielgene ausgesucht. Dieses zeigte, dass das Silencing der Rezeptoren *gpr1* und *gpr2* gut funktionierte, bei *gpr3* wurde nicht das gewünschte Ergebnis erhalten.

Das Ergebnis der Real-Time PCR besagte, dass der Rezeptor *gpr3* nach dem Silencing höher exprimiert sein sollte als davor. Aufgrund der allgemein geringen Expression dieses Gens könnte es sein, dass die gewählte Methode mit dem SYBR Green in diesem Fall nicht sensibel genug war, um die tatsächlichen Werte aufzunehmen. Andererseits ist es möglich, dass der Rezeptor einer Feedback-Regulation unterliegt, was durch die Analyse der mRNA nicht festzustellen ist. Hier müsste man auf das Protein zurückgreifen und mit spezifischen Antikörpern dieses untersuchen.

Abb. 29: Die Abbildung zeigt die Lage des Rezeptors *gpr3* im Genom, sowie das als Insert ausgesuchte DNA-Fragment und die Position der zwei Primer, welche in der Real Time PCR Einsatz fanden.



Wie aus dem obigen Bild zu entnehmen ist, umfasst das ausgewählte Insert, aus dem das Inverted Repeat konstruiert wurde, das Gen des *gpr3* und dessen Umgebung. Denn genau diese Stelle ist der Anfang für das Zerschneiden der RNA, das in 3'-Richtung fortgesetzt wird. Deswegen war es wichtig herauszufinden, welcher Bereich der RNA tatsächlich mit den Primern in der Real-Time PCR vermessen wurde. Sollten beide Primer ‚vor‘ dieser Signalsequenz liegen, würde die mRNA sozusagen eine kurze Zeit langunversehrt zur Verfügung stehen, denn nur das nachfolgende Stück unterlag der RNAi-Technik. In diesem Versuch ist das aber nicht der Fall, da einer der Primer (Primer 2) deutlich innerhalb der verdauten RNA positioniert ist. Das kann also als Grund für die unerwarteten Ergebnisse nicht in Betracht gezogen werden.

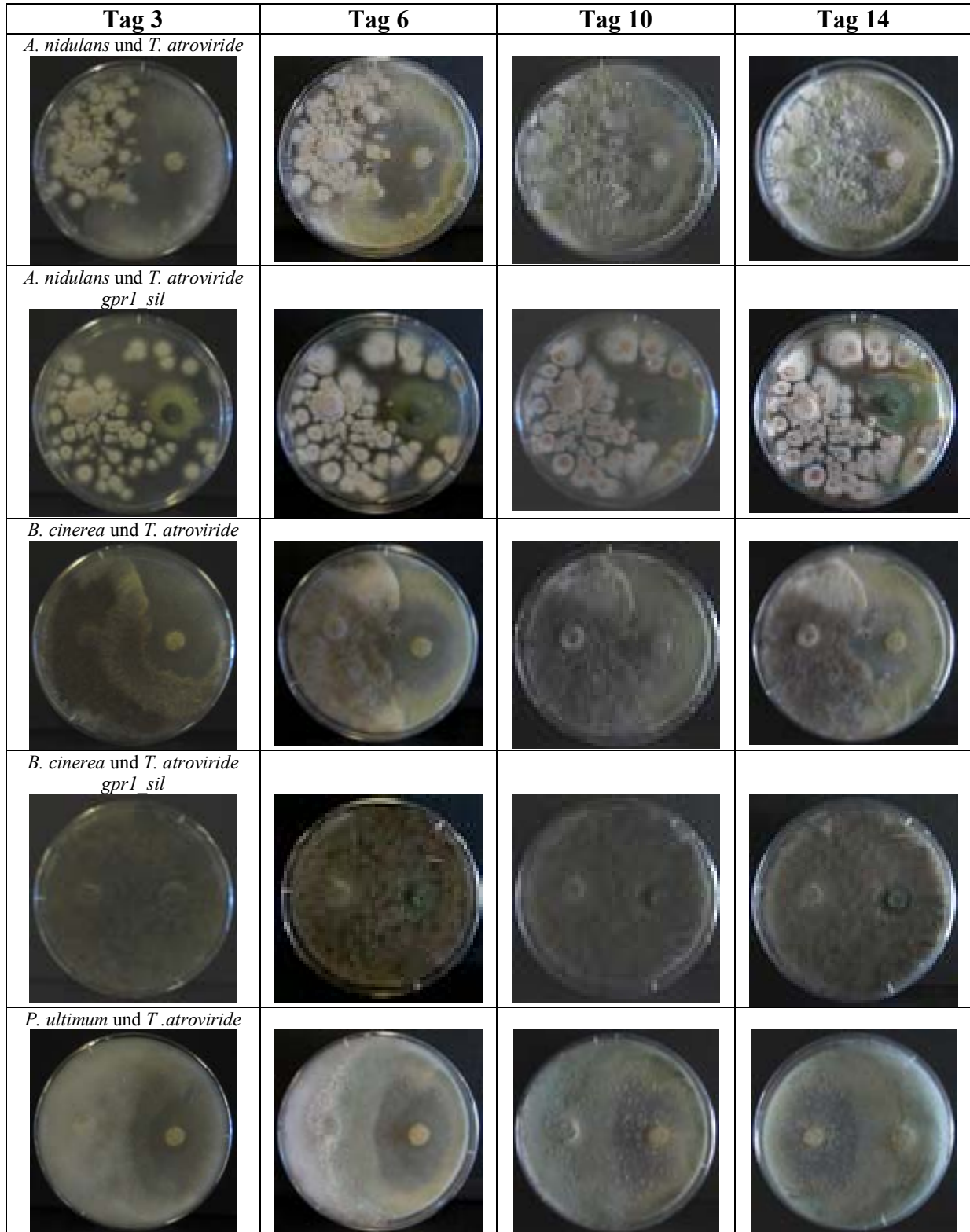
Die Charakterisierung der Transformanten erfolgte auf zwei Ebenen: durch Antagonistenversuche und durch Biomassebestimmung aus Flüssigkultur. Aus der Konfrontation mit den Pathogenen auf Platten ging hervor, dass sich die Transformanten des *gpr1* zwar bis zu einem gewissen Grad gegen den anderen Pilz wehren konnten, die Fähigkeit diesen zu überwachsen haben sie aber verloren. *P. ultimum* konnte die Transformante sogar nach 6 bis 10 Tagen überwachsen (Bilder siehe Anhang). Die Transformanten der anderen zwei Rezeptoren zeigten keine Unterschiede zum Wildtyp. Für die Biomassebestimmung wurden zunächst alle Transformanten sowie der Wildtyp auf PDA-Platten kultiviert, um frische Sporen zu erhalten. Dabei wurde wieder das Phänomen beobachtet, dass Transformanten des *gpr1* mit niedrigster Restexpression deutlich langsamer wuchsen als der Wildtyp und kaum Luftmycel bildeten. Die Sporen waren zwar vorhanden, hatten aber keine Färbung, im Gegensatz zu den Transformanten von *gpr2* und *gpr3* oder dem Wildtyp. Das erinnerte sehr stark an der Wachstumsverhalten der *Atga3*-Mutante, bei der sich um eine Transformante einer G_{α} -Untereinheit der Untergruppe III handelt (Zeilinger et al. 2004). Bei der Kultivierung der *gpr1*-Transformanten auf PDA-Platten konnte Interessantes beobachtet werden. Die vier

DISKUSSION

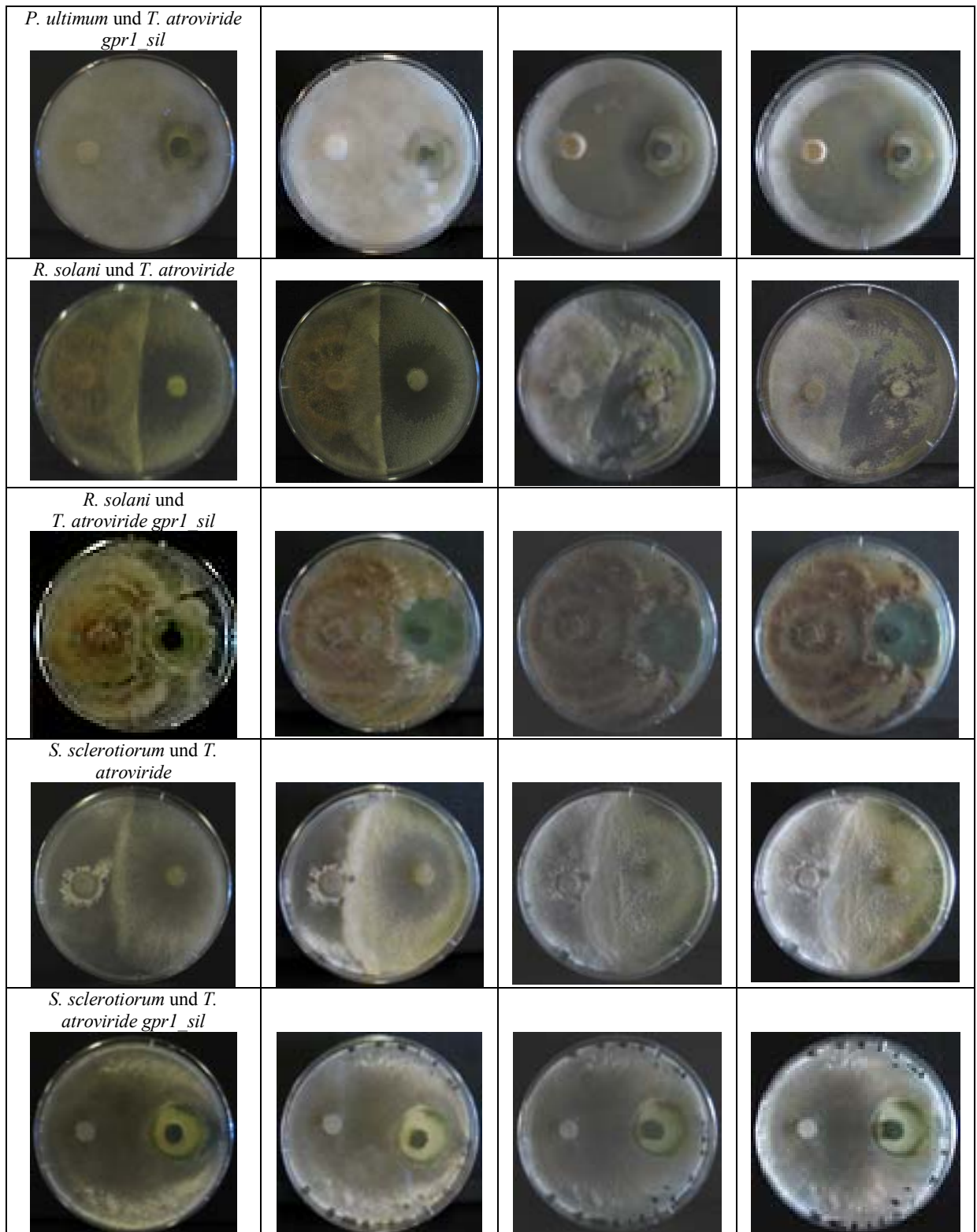
Transformanten mit der niedrigsten Rest-Expressionsrate (1/2, 1/6, 1/7, 1/8) wuchsen bei 22°C deutlich schneller als bei 28°C und bildeten sogar nach kurzer Zeit grüne Sporen. Bei der Kultivierung in Flüssigkultur konnte Ähnliches beobachtet werden. Während die Transformanten der Rezeptoren *gpr2* und *gpr3* genauso schnell und mit einer ähnlichen Mycelstruktur wie der Wildtypstamm wuchsen, war das Mycel von *gpr1* rein weiß und pelletartig, und natürlich in deutlich geringeren Mengen vorhanden, was sich auch in der Biobestimmung widerspiegelte. Die Transformanten des Rezeptors *gpr1* hatten nach zwei Tagen Kultivierung auf Glucose, Glycerin und N-Acetylglucosamin nur ein Drittel der Biomasse des Wildtyps oder der Transformanten der Rezeptoren *gpr2* und *gpr3*.

6 ANHANG

6.1 Konfrontationsversuche auf PDA-Platten



ANHANG



6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Abbildung zeigt den Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors mit seinen sieben transmembranen Helices und den Protein-untereinheiten α , β und γ . In der Darstellung ist der Rezeptor aktiviert, da an der G_α -Untereinheit GTP gebunden ist.

Abb. 2: Das Diagramm zeigt die vier Phasen der Real Time PCR.

Abb. 3: In der Darstellung ist der Prozess des Silencing dargestellt. Zunächst wird die doppelsträngige RNA von Dicer-Proteinen erkannt und zerschnitten, um dann als RISC Komplex an die komplementäre Ziel-mRNA anzudocken. Die Ziel-mRNA wird abgebaut und dadurch die Proteinsynthese unterbunden.

Abb. 4: In der Abbildung ist der Vektor pSILENT2 dargestellt, bestehend aus dem Promotor *gpdA*, dem Terminator *trpC* (beide isoliert aus *Aspergillus nidulans*) und dem Hygromycin-resistenz-Gen *hph*, welches auch als Selektions-kriterium nach der Transformation des Pilzes *T. atroviride* genutzt wurde.

Abb. 5: Die Darstellung zeigt den ursprünglichen Vektor, aus dem das Insert für die Selbstligation ausgeschnitten wurde.

Abb. 6: Darstellung des konstruierten Vektors für das Silencing von *gpr1* mit allen *XbaI*- und *HindIII*-Schnittstellen.

Abb. 7: Darstellung der Lage der *gpr2*-Sequenz im pGEM-T Vektor.

Abb. 8: Die Abbildung zeigt das Gel nach der Elektrophorese der PCR-Produkte. Die PCR wurde mit zwei unterschiedlichen Mengen des Ligationsansatzes durchgeführt. Zu erkennen sind zwei unterschiedlich große Banden, eine 291bp und die andere 582bp groß. Beim größeren DNA-Fragment handelt es sich um den Inverted Repeat des *gpr2*. Die untere Bande ist das nicht ligierte Fragment, welches nur halb so groß ist.

Abb. 9: Auf dem Bild ist das Ergebnis eines unvollständigen Restriktionsverdaus mit *XbaI* zu sehen. Da das kleinere Fragment auftaucht ist somit bewiesen, dass es sich um das oben über Ligation und PCR konstruierte Fragment tatsächlich um das Inverted Repeat von *gpr2* handelt.

Abb. 10: Die Abbildung zeigt das Konstrukt im Vektor pSILENT2.

Abb. 11: In der Abbildung ist der Vektor pSILENT2 mit dem Inverted Repeat von *gpr2* nach dem Restriktionsverdau mit *XbaI* zu sehen. Durch die vier Schnittstellen im Vektor entstehen die vier charakteristischen Banden. Beim Vektor ohne Inverted Repeat wären nur drei Banden sichtbar, da die Schnittstelle im Insert selbst fehlt.

Abb. 12: In der Abbildung ist der pGEM-T Vektor mit der ausgewählten Sequenz des Rezeptors *gpr3* dargestellt.

Abb. 13: Die Darstellung zeigt den fertigen Vektor für das Silencing.

Abb. 14: Das Bild zeigt das Ergebnis der PCR mit den oben angeführten für die Transformanten spezifischen Primern. Wie deutlich zu sehen ist, tritt bei der Blindprobe (No Template Control) und beim Wildtypstamm P1 keine Bande auf, bei den Transformanten aber schon. Das bedeutet, dass die Integration des Silencing Vektors in das Genom von P1 bei allen sechs für diesen Rezeptor ausgewählten Transformanten erfolgreich war.

Abb. 15: Transformante 1/2

Abb. 16: Transformante 1/4

Abb. 17: Transformante 1/6

Abb. 18: Transformante 1/7

Abb. 19: Transformante 1/8

Abb. 20: Transformante 1/9

Abb. 21: Transformante 1/2

Abb. 22: Transformante 1/6

Abb. 23: Transformante 1/7

Abb. 24: Transformante 1/8

Abb. 25: Die Abbildung zeigt die aus der Real Time PCR erhaltenen Ergebnisse, dargestellt als Expressionsrate in Bezug auf den Wildtypstamm P1 = 1. Wie deutlich zu sehen ist verhalten sich die sechs Transformanten gleichen Typs völlig unterschiedlich.

Abb. 26: Die Abbildung zeigt das Expressionsverhalten der Pilze nach dem Silencing des Rezeptors *gpr2*. Die Transformanten weisen untereinander keine großen Unterschiede auf.

Abb. 27: In der Abbildung sind die Expressionsraten der Transformanten von *gpr3* zu sehen. Bei allen Stämmen liegen die Werte deutlich über 1.

Abb. 28: In der Abbildung sind die Ergebnisse der Biomassebestimmung nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen dargestellt. Die Transformanten des *gpr1* produzieren offensichtlich weniger Biomasse als die anderen untersuchten Pilzstämmen.

Abb. 29: Die Abbildung zeigt die Lage des Rezeptors *gpr3* im Genom, sowie das als Insert ausgesuchte DNA-Fragment und die Position der zwei Primer, welche in der Real Time PCR Einsatz fanden.

6.3 Literaturverzeichnis

- Bai, J., R. L. Ramos, et al. (2003). "RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex." Nat Neurosci **6**(12): 1277-83.
- Baldwin, J. M. (1993). "The probable arrangement of the helices in G-protein coupled receptors." Embo J **12**(4): 1693-703.
- Banuett, F. (1998). "Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 249-74.
- Barondes, S. H. (1981). "Lectins: their multiple endogenous cellular functions." Annu Rev Biochem **50**: 207-31.
- Benitez, T., J. Delgado-Jarana, et al. (1998). *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. v. R. S. In: Pandalai SG (ed) Recent research developments in microbiology, Trivandrum: 129-150.
- Benitez, T., A. M. Rincon, et al. (2004). "Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains." Int Microbiol **7**(4): 249-60.
- Bennett, J. W. and M. Klich (2003). "Mycotoxins." Clin Microbiol Rev **16**(3): 497-516.
- Bieszke, J. A., E. L. Braun, et al. (1999). "The nop-1 gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 8034-9.
- Bisby, G. R. (1939). "*Trichoderma viride* Pers.ex Fr. and notes on *Hypocrea*." Trans. Br. Mycol. Soc. **23**: 149-168.
- Bissett, J. (1991a). "A revision of the genus *Trichoderma*: II. Infrageneric classification." Can. J. Bot. **69**: 2357-2372.
- Bissett, J. (1991b). "A revision of the genus *Trichoderma*: III. Section *Pachybasium*." Can. J. Bot. **69**: 2373-2417.
- Bissett, J. (1991c). "A revision of the genus *Trichoderma*: IV. Additional notes on section *Longibrachiatum* " Can. J. Bot. **69**: 2418-2420.
- Bissett, J. (1984). "A revision on the genus *Trichoderma*: I. Section *Longibrachiatum*, new section." Can. J. Bot. **62**: 924-931.
- Bissett, J. (1992). "*Trichoderma atroviride*." Can. J. Bot. **70**: 639-641.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G-protein coupled receptors: an evolutionary success." Embo J **18**(7): 1723-9.
- Borkovich, K. A., L. A. Alex, et al. (2004). "Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism." Microbiol Mol Biol Rev **68**(1): 1-108.

- Bouvier, M. (2001). "Oligomerization of G-protein coupled transmitter receptors." Nat Rev Neurosci **2**(4): 274-86.
- Brunner, K., M. Montero, et al. (2003). "Expression of the *ech42* (endochitinase) gene of *Trichoderma atroviride* under carbon starvation is antagonized via a BrlA-like cis-acting element." FEMS Microbiol Lett **218**(2): 259-64.
- Brunner, K., S. Zeilinger, et al. (2005). "Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance." Appl Environ Microbiol **71**(7): 3959-65.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-93.
- Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." J Mol Endocrinol **29**(1): 23-39.
- Bustin, S. A., V. Benes, et al. (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." J Mol Endocrinol **34**(3): 597-601.
- Cabrera-Vera, T. M., J. Vanhauwe, et al. (2003). "Insights into G-protein structure, function, and regulation." Endocr Rev **24**(6): 765-81.
- Cardoza, R. E., M. R. Hermosa, et al. (2007). "Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity." Fungal Genet Biol **44**(4): 269-83.
- Cardoza, R. E., J. A. Vizcaino, et al. (2006). "Cloning and characterization of the *erg1* gene of *Trichoderma harzianum*: effect of the *erg1* silencing on ergosterol biosynthesis and resistance to terbinafine." Fungal Genet Biol **43**(3): 164-78.
- Carman, C. V. and J. L. Benovic (1998). "G-protein coupled receptors: turn-ons and turn-offs." Curr Opin Neurobiol **8**(3): 335-44.
- Carsolio, C., N. Benhamou, et al. (1999). "Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism." Appl Environ Microbiol **65**(3): 929-35.
- Carsolio, C., A. Gutierrez, et al. (1994). "Characterization of *ech42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10903-7.
- Catalanotto, C., M. Pallotta, et al. (2004). "Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*." Mol Cell Biol **24**(6): 2536-45.
- Chen, J. G., F. S. Willard, et al. (2003). "A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation." Science **301**(5640): 1728-31.

- Cherkasova, V. A., R. McCully, et al. (2003). "A novel functional link between MAP kinase cascades and the Ras/cAMP pathway that regulates survival." Curr Biol **13**(14): 1220-6.
- Chet, I. (1987). "*Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi." (New York, N.Y., Wiley & Sons): 137-156.
- Chet, I. (1990). Mycoparasitism - recognition, physiology and ecology. New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases R. R. Baker and P. E. Dunn. New York, Alan Liss: 725-733.
- Chet, I., N. Benhamou, et al. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. Trichoderma & Gliocladium. G. E. Harman and C. P. Kubicek. London, Taylor & Francis Ltd. **2**: 153-172.
- Chet, I., G. E. Harman, et al. (1981). "*Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* ssp." Microb Ecol **7**: 29-38.
- Chet, I. and J. Inbar (1994). "Biological control of fungal pathogens." Appl Biochem Biotechnol **48**(1): 37-43.
- Chung, K. S., M. Won, et al. (2001). "Isolation of a novel gene from *Schizosaccharomyces pombe*: *stm1+* encoding a seven-transmembrane loop protein that may couple with the heterotrimeric G_α 2 protein, Gpa2." J Biol Chem **276**(43): 40190-201.
- Cogoni, C. and G. Macino (1999). "Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase." Nature **399**(6732): 166-9.
- Cook, M. T. and K. F. Baker (1983). "The nature and practice of biological control of plant pathogens." American Phytopathological Society: St. Paul, MN: 539 pp.
- de Jong, J. F., H. J. Deelstra, et al. (2006). "RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*." Appl Environ Microbiol **72**(2): 1267-9.
- De la Cruz, J., J. A. Pintor-Toro, et al. (1995). "A novel endo-β-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*." J Bacteriol **177**(23): 6937-45.
- De la Cruz, L., A. Hidalgo-Gallego, et al. (1992). "Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*." Eur. J. Biochem. **206**: 859–867.
- Di Pietro, A., M. Lorito, et al. (1993). "Endochitinases from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergetic antifungal activity in combination with gliotoxin." Phytopathology **83**: 308-313.
- Domnanich, P. (2006). Klonierung und Charakterisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren in *Trichoderma atroviride*. Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Forschungsbereich Gentechnologie und angewandte Biochemie. Wien, Technische Universität Wien.

- Druzhinina, I. S., A. G. Kopchinskiy, et al. (2005). "An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*." Fungal Genet Biol **42**(10): 813-28.
- D'Souza, C. A. and J. Heitman (2001). "Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence." FEMS Microbiol Rev **25**(3): 349-64.
- Dyer, P. S., M. Paoletti, et al. (2003). "Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*." Microbiology **149**(Pt 9): 2301-3.
- Elad, Y., R. Barak, et al. (1983). "Possible role of lectins in mycoparasitism." J Bacteriol **154**(3): 1431-5.
- El-Katatny, M. H., M. Gudelj, et al. (2001). "Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*." Appl Microbiol Biotechnol **56**(1-2): 137-43.
- Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G-protein coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." Pharmacol Rev **53**(1): 1-24.
- Ferguson, S. S. and M. G. Caron (1998). "G-protein coupled receptor adaptation mechanisms." Semin Cell Dev Biol **9**(2): 119-27.
- Flores, A., I. Chet, et al. (1997). "Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*." Curr Genet **31**(1): 30-7.
- Garcia, I., J. M. Lora, et al. (1994). "Cloning and characterization of a chitinase (*chit42*) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*." Curr Genet **27**(1): 83-9.
- Gether, U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G-protein coupled receptors." Endocr Rev **21**(1): 90-113.
- Gether, U. and B. K. Kobilka (1998). "G-protein coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation." J Biol Chem **273**(29): 17979-82.
- Gibson, U. E., C. A. Heid, et al. (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." Genome Res **6**(10): 995-1001.
- Gotoh, I., M. Adachi, et al. (2001). "Identification and characterization of a novel MAP kinase kinase kinase, MLTK." J Biol Chem **276**(6): 4276-86.
- Grondona, I., R. Hermosa, et al. (1997). "Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens." Appl Environ Microbiol **63**(8): 3189-98.
- Gutkind, J. S. (1998). "The pathways connecting G-protein coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades." J Biol Chem **273**(4): 1839-42.
- Hall, R. A., R. T. Premont, et al. (1999). "Heptahelical receptor signaling: beyond the G-protein paradigm." J Cell Biol **145**(5): 927-32.

- Hammond, T. M. and N. P. Keller (2005). "RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerases." Genetics **169**(2): 607-17.
- Han, K. H., J. A. Seo, et al. (2004a). "A putative G-protein coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*." Mol. Microbiol. **51**: 1333–1345.
- Han, K. H., J. A. Seo, et al. (2004b). "Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (G_{α}) signalling." Mol. Microbiol. **53**: 529–540.
- Handelsman, J. and E. V. Stabb (1996). "Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens." Plant Cell **8**(10): 1855-1869.
- Haran, S., H. Schickler, et al. (1995). "New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*." Mycol. Res. **99**: 441–446.
- Harman, G. E., C. R. Howell, et al. (2004). "Trichoderma species--opportunistic, avirulent plant symbionts." Nat Rev Microbiol **2**(1): 43-56.
- Henry, C., I. Mouyna, et al. (2007). "Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*." Curr Genet **51**(4): 277-84.
- Henry, C., I. Mouyna, et al. (2007). "Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*." Curr Genet **51**(4): 277-84.
- Hereld, D. and P. N. Devreotes (1992). "The cAMP receptor family of *Dictyostelium*." Int Rev Cytol **137B**: 35-47.
- Hermosa, M. R., I. Grondona, et al. (2000). "Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp." Appl Environ Microbiol **66**(5): 1890-8.
- Hjeljord, L. and A. Tronsmo (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. Trichoderma & Gliocladium. G. E. Harman and C. P. Kubicek. London, Taylor & Francis Ltd. **2**: 131-154.
- Howell, C. R. (1998). "Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts." Plant Disease **87**(1): 4-10.
- Howell, C. R. and R. D. Stipanovic (1983). "Gliovirin, a new metabolic from *Gliocladium virens* and its role in the biological control of *Pythium ultimum*." Can. J. Microbiol. **29**: 321-324.
- Hur, E. M. and K. T. Kim (2002). "G-protein coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity." Cell Signal **14**(5): 397-405.
- Inbar, J. and I. Chet (1992). "Biomimics of fungal cell-cell recognition by use of lectin-coated nylon fibers." J Bacteriol **174**(3): 1055-9.

- Inbar, J. and I. Chet (1996). "The role of lectins in recognition and adhesion of the mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host." Adv Exp Med Biol **408**: 229-31.
- Jain, S., K. Akiyama, et al. (2003). "The G-protein β subunit FGB1 regulates development and pathogenicity in *Fusarium oxysporum*." Curr Genet **43**(2): 79-86.
- Jain, S., K. Akiyama, et al. (2002). "Targeted disruption of a G-protein β subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*." Curr Genet **41**(6): 407-13.
- Jain, S., K. Akiyama, et al. (2005). "Signaling via the G protein α subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*." FEMS Microbiol Lett **243**(1): 165-72.
- Ji, T. H., M. Grossmann, et al. (1998). "G-protein coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions." J Biol Chem **273**(28): 17299-302.
- Johnson, G. L., H. G. Dohlman, et al. (2005). "MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression." Curr Opin Chem Biol **9**(3): 325-31.
- Jordan, B. A. and L. A. Devi (1999). "G-protein coupled receptor heterodimerization modulates receptor function." Nature **399**(6737): 697-700.
- Kadotani, N., H. Nakayashiki, et al. (2004). "One of the two Dicer-like proteins in the filamentous fungi *Magnaporthe oryzae* genome is responsible for hairpin RNA-triggered RNA silencing and related small interfering RNA accumulation." J Biol Chem **279**(43): 44467-74.
- Karnik, S. S., C. Gogonea, et al. (2003). "Activation of G-protein coupled receptors: a common molecular mechanism." Trends Endocrinol Metab **14**(9): 431-7.
- Kays, A. M., P. S. Rowley, et al. (2000). "Regulation of conidiation and adenylyl cyclase levels by the G α protein GNA-3 in *Neurospora crassa*." Mol Cell Biol **20**(20): 7693-705.
- Kobilka, B. K. (2007). "G-protein coupled receptor structure and activation." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 794-807.
- Kraakman, L., K. Lemaire, et al. (1999). "A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, *Gpr1*, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose." Mol Microbiol **32**(5): 1002-12.
- Kratochwill, K. (2005). Development of TaqMan probe based quantitative real-time PCR assays for biocontrol related genes of *Trichoderma atroviride* and construction of a deletion vector for a gene encoding for the xylanase regulator 1 (Xyr1) of *Fusarium graminearum*. Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Forschungsbereich Gentechnologie und angewandte Biochemie. Wien, Technische Universität Wien.
- Kristiansen, K. (2004). "Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein coupled receptors: molecular modeling and

- mutagenesis approaches to receptor structure and function." Pharmacol Ther **103**(1): 21-80.
- Krupnick, J. G. and J. L. Benovic (1998). "The role of receptor kinases and arrestins in G-protein coupled receptor regulation." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 289-319.
- Kulkarni, R. D., M. R. Thon, et al. (2005). "Novel G-protein coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*." Genome Biol **6**(3): R24.
- Kullnig, C., R. L. Mach, et al. (2000). "Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact." Appl Environ Microbiol **66**(5): 2232-4.
- Lafon, A., K. H. Han, et al. (2006). "G-protein and cAMP-mediated signaling in aspergilli: a genomic perspective." Fungal Genet Biol **43**(7): 490-502.
- Lee, S. P., B. F. O'Dowd, et al. (2003). "Homo- and hetero-oligomerization of G-protein coupled receptors." Life Sci **74**(2-3): 173-80.
- Lefkowitz, R. J. (1998). "G-protein coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and β -arrestins in receptor signaling and desensitization." J Biol Chem **273**(30): 18677-80.
- Lengeler, K. B., R. C. Davidson, et al. (2000). "Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 746-85.
- Li, L. and K. A. Borkovich (2006). "GPR-4 is a predicted G-protein coupled receptor required for carbon source-dependent asexual growth and development in *Neurospora crassa*." Eukaryot Cell **5**(8): 1287-300.
- Lieckfeldt, E., Y. Cavnac, et al. (2000). "Endochitinase gene-based phylogenetic analysis of *Trichoderma*." Microbiol Res **155**(1): 7-15.
- Lieckfeldt, E., G. J. Samuels, et al. (1999). "A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species?" Appl Environ Microbiol **65**(6): 2418-28.
- Lin, C. T., W. H. Lin, et al. (2001). "Inverted repeats as genetic elements for promoting DNA inverted duplication: implications in gene amplification." Nucleic Acids Res **29**(17): 3529-38.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lorenz, M. C. (2002). "Genomic approaches to fungal pathogenicity." Curr Opin Microbiol **5**(4): 372-8.
- Lorito, M., C. K. Hayes, et al. (1993). "Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA." Curr Genet **24**(4): 349-56.

- Lorito, M., C. K. Hayes, et al. (1994). "Potential of genes and gene products from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the development of biological pesticides." Mol Biotechnol **2**(3): 209-17.
- Lorito, M., S. L. Woo, et al. (1998). "Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 7860-5.
- Lu, Z., R. Tombolini, et al. (2004). "In vivo study of trichoderma-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems." Appl Environ Microbiol **70**(5): 3073-81.
- Lutz, M. P., G. Feichtinger, et al. (2003). "Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1." Appl Environ Microbiol **69**(6): 3077-84.
- Mach, R. L., C. K. Peterbauer, et al. (1999). "Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals." Appl Environ Microbiol **65**(5): 1858-63.
- McCudden, C. R., M. D. Hains, et al. (2005). "G-protein signaling: back to the future." Cell Mol Life Sci **62**(5): 551-77.
- Mendoza-Mendoza, A., M. J. Pozo, et al. (2003). "Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15965-70.
- Milligan, G. (2001). "Oligomerization of G-protein coupled receptors." J Cell Sci **114**: 1265-1271.
- Mouyna, I., C. Henry, et al. (2004). "Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*." FEMS Microbiol Lett **237**(2): 317-24.
- Mukherjee, P. K., J. Latha, et al. (2004). "Role of two G-protein α subunits, TgaA and TgaB, in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*." Appl Environ Microbiol **70**(1): 542-9.
- Muller, P., G. Weinzierl, et al. (2003). "Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade." Eukaryot Cell **2**(6): 1187-99.
- Nakayashiki, H. (2005). "RNA silencing in fungi: mechanisms and applications." FEBS Lett **579**(26): 5950-7.
- Nakayashiki, H., S. Hanada, et al. (2005). "RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi." Fungal Genet Biol **42**(4): 275-83.
- Olmedo-Monfil, V., A. Mendoza-Mendoza, et al. (2002). "Multiple environmental signals determine the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene *prb1* in *Trichoderma atroviride*." Mol Genet Genomics **267**(6): 703-12.

- Park, P. S., S. Filipek, et al. (2004). "Oligomerization of G-protein coupled receptors: past, present, and future." Biochemistry **43**(50): 15643-56.
- Pearson, G., F. Robinson, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-83.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pitcher, J. A., E. S. Payne, et al. (1995). "The G-protein coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8343-7.
- Poggeler, S. and U. Kuck (2001). "Identification of transcriptionally expressed pheromone receptor genes in filamentous ascomycetes." Gene **280**(1-2): 9-17.
- Pucher, M. (2006). Evaluierung von Referenzgenen von *Trichoderma atroviride* für Real-Time PCR basierende Transkriptionsanalysen und deren Anwendung für die mRNA Quantifizierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und technische Biowissenschaften, Forschungsbereich Gentechnologie und angewandte Biochemie. Wien, Technische Universität Wien.
- Raisley, B., M. Zhang, et al. (2004). "A cAMP receptor-like G-protein coupled receptor with roles in growth regulation and development." Dev Biol **265**(2): 433-45.
- Reithner, B., K. Brunner, et al. (2005). "The G-protein α subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites." Fungal Genet Biol **42**(9): 749-60.
- Reithner, B., R. Schuhmacher, et al. (2007). "Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection." Fungal Genet Biol.
- Rifai, M. A. (1969). "A revision of the genus *Trichoderma*." Mycol. Pap. **116**: 1-56.
- Rine, J. (1999). "On the mechanism of silencing in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8309-11.
- Robinson, M. J. and M. H. Cobb (1997). "Mitogen-activated protein kinase pathways." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 180-6.
- Rocha-Ramirez, V., C. Omero, et al. (2002). "*Trichoderma atroviride* G-protein α subunit gene *tgal* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation." Eukaryot Cell **1**(4): 594-605.
- Romano, N. and G. Macino (1992). "Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences." Mol Microbiol **6**(22): 3343-53.

- Salgado, P. S., M. R. Koivunen, et al. (2006). "The structure of an RNAi polymerase links RNA silencing and transcription." PLoS Biol **4**(12): e434.
- Schirmbock, M., M. Lorito, et al. (1994). "Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi." Appl Environ Microbiol **60**(12): 4364-70.
- Schmittgen, T. D. (2001). "Real-time quantitative PCR." Methods **25**(4): 383-5.
- Schoneberg, T., G. Schultz, et al. (1999). "Structural basis of G-protein coupled receptor function." Mol Cell Endocrinol **151**(1-2): 181-93.
- Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." Faseb J **9**(9): 726-35.
- Seidl, V., B. Huemer, et al. (2005). "A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases." Febs J **272**(22): 5923-39.
- Sgourakis, N. G., P. G. Bagos, et al. (2005). "A method for the prediction of GPCRs coupling specificity to G-proteins using refined profile Hidden Markov Models." BMC Bioinformatics **6**: 104.
- Sinden, R. R., G. X. Zheng, et al. (1991). "On the deletion of inverted repeated DNA in *Escherichia coli*: effects of length, thermal stability, and cruciform formation in vivo." Genetics **129**(4): 991-1005.
- Skern, R., P. Frost, et al. (2005). "Relative transcript quantification by quantitative PCR: roughly right or precisely wrong?" BMC Mol Biol **6**(1): 10.
- Skrabanek, L., M. Murcia, et al. (2007). "Requirements and ontology for a G-protein coupled receptor oligomerization knowledge base." BMC Bioinformatics **8**: 177.
- Slupska, M. M., J. H. Chiang, et al. (2000). "Genes involved in the determination of the rate of inversions at short inverted repeats." Genes Cells **5**(6): 425-37.
- Stahlberg, A., M. Kubista, et al. (2004b). "Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis." Clinical Chemistry **50**: 1678–1680.
- Tag, A., J. Hicks, et al. (2000). "G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites." Mol Microbiol **38**(3): 658-65.
- Taylor, S. S., J. A. Buechler, et al. (1990). "cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes." Annu. Rev. Biochem. **59**: 971-1005.
- Terrillon, S. and M. Bouvier (2004). "Roles of G-protein coupled receptor dimerization." EMBO Rep **5**(1): 30-4.
- Tichopad, A., M. Dilger, et al. (2003). "Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up." Nucleic Acids Res **31**(20): e122.

- Tomari, Y. and P. D. Zamore (2005). "Perspective: machines for RNAi." Genes Dev **19**(5): 517-29.
- Tsao, P. I. and M. von Zastrow (2000). "Type-specific sorting of G protein coupled receptors after endocytosis." J Biol Chem **275**(15): 11130-40.
- Tulasne, L. R. and C. Tulasne (1865). "Selecta fungorum carpologia." **3**: 27-35.
- Turner, G. E. and K. A. Borkovich (1993). "Identification of a G-protein α subunit from *Neurospora crassa* that is a member of the G_i family." J Biol Chem **268**(20): 14805-11.
- Viterbo, A., M. Harel, et al. (2005). "*Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance." Appl Environ Microbiol **71**(10): 6241-6.
- Viterbo, A., M. Montero, et al. (2002). "Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203)." Curr Genet **42**(2): 114-22.
- Viterbo, A., O. Ramot, et al. (2002). "Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens." Antonie Van Leeuwenhoek **81**(1-4): 549-56.
- Volpe, T. A., C. Kidner, et al. (2002). "Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi." Science **297**(5588): 1833-7.
- von Zastrow, M. (2003). "Mechanisms regulating membrane trafficking of G-protein coupled receptors in the endocytic pathway." Life Sci **74**(2-3): 217-24.
- Watson, S. and S. Arkininstall (1994). The G-Protein linked Receptor Facts Book. A. S. Watson S., editors. London, Academic Press: 1-291.
- Welton, R. M. and C. S. Hoffman (2000). "Glucose monitoring in fission yeast via the Gpa2 G α , the git5 G β and the git3 putative glucose receptor." Genetics **156**(2): 513-21.
- Wiest, A., D. Grzegorski, et al. (2002). "Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase." J Biol Chem **277**(23): 20862-8.
- Wilhelm, J. and A. Pingoud (2003). "Real-time polymerase chain reaction." Chembiochem **4**(11): 1120-8.
- Wilhelm, J., A. Pingoud, et al. (2003). "Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes." Nucleic Acids Res **31**(10): e56.
- Williams, J., J. M. Clarkson, et al. (2003). "Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom *Agaricus bisporus*." Appl Environ Microbiol **69**(7): 4192-9.
- Wise, A., K. Gearing, et al. (2002). "Target validation of G-protein coupled receptors." Drug Discov Today **7**(4): 235-46.

- Wong, M. L. and J. F. Medrano (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." Biotechniques **39**(1): 75-85.
- Wuczkowski, M., I. Druzhinina, et al. (2003). "Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest." Microbiol Res **158**(2): 125-33.
- Xu, J. R. (2000). "Map kinases in fungal pathogens." Fungal Genet Biol **31**(3): 137-52.
- Xu, J. R. and J. E. Hamer (1996). "MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*." Genes Dev **10**(21): 2696-706.
- Xue, C., Y. S. Bahn, et al. (2006). "G-protein coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP-PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*." Mol Biol Cell **17**(2): 667-79.
- Yamada, O., R. Ikeda, et al. (2007). "Gene silencing by RNA interference in the koji mold *Aspergillus oryzae*." Biosci Biotechnol Biochem **71**(1): 138-44.
- Zeilinger, S., C. Galhaup, et al. (1999). "Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host." Fungal Genet Biol **26**(2): 131-40.
- Zeilinger, S., B. Reithner, et al. (2005). "Signal transduction by Tga3, a novel G-protein α subunit of *Trichoderma atroviride*." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1591-7.