

**Untersuchungen der Atranon- und Satratoxin-Gencluster
des Schwärzepilzes *Stachybotrys chartarum***

von Katharina Johanna Lang

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen der Atranon- und Satratoxin-Gencluster
des Schwärzepilzes *Stachybotrys chartarum***

von Katharina Johanna Lang
aus Bad Reichenhall

München 2022

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Frank Ebel
Mitbetreuung durch: Dr. Sebastian Ulrich

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Ebel

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Kristina Schauer
Priv.-Doz. Dr. Joachim C. Manning

Tag der Promotion: 30. Juli 2022

Für meine Eltern

Teile der vorliegenden Doktorarbeit wurden in der folgenden Publikation am 24.03.2022
veröffentlicht:

Sebastian Ulrich, Katharina Lang, Ludwig Niessen, Christiane Baschien, Robert Kosicki,
Magdalena Twarużek, Reinhard K. Straubinger und Frank Ebel

The Evolution of the Satratoxin and Atranone Gene Clusters of
Stachybotrys chartarum

Journal of Fungi (DOI: 10.3390/jof8040340)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	21
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	22
1.	Gattung <i>Stachybotrys</i>.....	22
1.1.	Taxonomie.....	22
1.2.	Wachstumsbedingungen.....	24
1.3.	Vorkommen.....	25
1.3.1.	Futtermittel.....	25
1.3.2.	Lebensmittel.....	26
1.3.3.	Innenräume.....	27
1.4.	Sekundärmetabolismus.....	28
1.4.1.	Phenylspirodrimane.....	29
1.4.2.	Atranone.....	30
1.4.3.	Trichothecene.....	32
2.	Genetik von Pilzen.....	34
2.1.	RNA-Klassen.....	34
2.2.	Transkription bei Eukaryoten.....	35
3.	Mykotoxincluster bei <i>Stachybotrys</i> spp.	36
4.	Bedeutung als Krankheitserreger.....	41
4.1.	Bedeutung in der Tiermedizin.....	41
4.2.	Bedeutung in der Humanmedizin.....	43
5.	Methoden zur Untersuchung von <i>Stachybotrys</i> spp.	46
5.1.	Genotypisierung.....	46
5.2.	Next Generation Sequencing.....	48
5.2.1.	Transkriptomanalyse.....	49
5.2.2.	Deep Resequencing Analyse.....	53
5.3.	Massenspektrometrie.....	54
5.3.1.	LC-MS/MS.....	54
5.4.	Zellkultur und Zytotoxizitätstest mit <i>S. chartarum</i>	55
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	58
1.	Allgemein.....	58

1.1.	Verwendete Materialien und Geräte	58
1.1.1.	Anzucht	58
1.1.2.	Isolierung chromosomaler DNA für PCR.....	58
1.1.3.	Konzentrationsmessung von DNA und RNA	59
1.1.4.	Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese	59
1.1.5.	Isolierung chromosomaler DNA für Deep Resequencing Analyse	60
1.1.6.	Isolierung von mRNA	60
1.1.7.	Zellbiologische Methoden.....	61
1.1.8.	Zytotoxizitätstest mittels Zellkultur	61
1.1.9.	Toxinextraktion	62
1.1.10.	Färbung mit Annexin V-FITC Kit	62
1.1.11.	Zellkulturtest mit Toxinstandards	62
1.1.12.	LC-MS/MS.....	63
1.2.	<i>Stachybotrys</i> Isolate.....	63
1.3.	Oligonukleotide.....	64
1.4.	Zelllinie	66
1.5.	Erstellung von Graphiken.....	66
2.	Mykologische Methoden.....	66
2.1.	Nährmedien	66
2.2.	Anzucht	67
2.2.1.	Erstellung von Einsporisolaten.....	68
3.	Molekularbiologische Methoden.....	69
3.1.	Isolierung chromosomaler DNA	69
3.2.	Konzentrationsmessung von DNA.....	70
3.3.	Triplex-PCR	70
3.4.	Agarose-Gelelektrophorese	72
3.5.	Isolierung chromosomaler DNA für die Deep Resequencing Analyse.....	72
3.6.	Isolierung von mRNA	73
3.7.	Konzentrationsmessung von mRNA.....	74
3.8.	Next Generation Sequencing.....	74
3.9.	Deep Resequencing Analyse.....	75
4.	Sequenzanalysen.....	76
4.1.	PCR – Bereich Downstream von SC1	76
4.2.	PCR – Übergang zwischen Scaffold 1 und 1543	78

5.	Zellbiologische und mikroskopische Methoden	79
5.1.	Mikroskopische Untersuchungen	79
5.2.	Kultivierung von PK15-Zellen	80
6.	Zelltoxische Methoden	80
6.1.	Toxinextraktion für Zellkulturtest	80
6.1.1.	Toxinextraktion von PDA	80
6.1.2.	Toxinextraktion von Reiskultur (IBT 40293)	81
6.2.	Zytotoxizitätstest mittels Zellkultur	81
6.3.	Überprüfung der Zell-Viabilität durch Trypanblaufärbung	82
6.4.	Toxintest mit Färbung durch Annexin V-FITC und Propidiumiodid	82
6.5.	Überführung der mit Toxinextrakt behandelten Zellen in frisches Medium	83
6.6.	Zellkulturtest mittels verschiedener Zellüberstände	83
6.7.	Zellkulturtest mit Toxinstandards	84
7.	LC-MS/MS	85
7.1.	System	85
7.2.	Toxinextraktion der Isolate	85
7.3.	Messung der Toxinextrakte mittels LC-MS/MS	86
IV.	ERGEBNISSE	89
1.	Sequenzanalysen	90
1.1.	Satratoxincluster	90
1.1.1.	PCR – Bereich downstream von SC1	92
1.1.2.	Übergang zwischen Scaffold 1 und 1543	94
1.2.	GC-Gehalt	95
1.3.	Vergleich der Aminosäuresequenzen von Proteinen mittels BlastP	96
1.3.1.	Satratoxincluster 1 (SC1)	98
1.3.2.	Satratoxincluster 2 (SC2)	101
1.3.3.	Satratoxincluster 3 (SC3)	102
1.4.	Atranoncluster 1 und 2	103
1.4.1.	Atranoncluster 1 (AC1)	103
1.4.2.	Atranoncluster 2 (AC2)	104
2.	Bestätigung der Genotypen mittels Triplex-PCR	106
3.	Deep Resequencing Analyse	107

3.1.	Coverage der Atranoncluster.....	107
3.1.1.	Coverage des Atranoncluster 1 (AC1)	107
3.1.2.	Coverage des Atranoncluster 2 (AC2)	108
3.2.	Satratoxincluster 1 bis 3 (SC1 bis SC3).....	111
4.	Transkriptomanalyse.....	113
4.1.	Hauptkomponentenverfahren	114
4.2.	Satratoxincluster.....	116
4.2.1.	Satratoxincluster 1	116
4.2.2.	Satratoxincluster 2.....	118
4.2.3.	Satratoxincluster 3.....	119
4.3.	Atranoncluster 1	120
4.4.	<i>tri</i> -Gene	121
5.	Zytotoxizitätstest mittels Zellkultur	123
5.1.	Zytotoxizitätstest	123
5.1.1.	Fähigkeit zur Adhärenz von PK15-Zellen nach Zugabe des Toxinextrakts von IBT 40293	126
5.1.2.	Morphologische Veränderungen von PK15-Zellen nach Zugabe des Toxinextrakts von IBT 40293	127
5.1.3.	Überprüfung der Zell-Viabilität durch Trypanblaufärbung	128
5.1.4.	Überführen der Zellen in neues Medium nach Inkubation mit Toxinextrakt	129
5.1.5.	Zellkulturtest mit Toxinzugabe auf intakten Zellrasen	132
5.1.6.	Toxinhaltige Zellüberstände auf gesunde PK15-Zellen.....	132
5.2.	Färbung mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid	134
6.	LC-MS/MS.....	135
V.	DISKUSSION.....	140
1.	Sequenzanalyse	140
2.	Deep Resequencing Analyse	147
3.	Transkriptomanalyse	148
4.	Zytotoxizitätstest	152
5.	LC-MS/MS.....	154
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	156

VII. SUMMARY	158
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	160
IX. DANKSAGUNG	184

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Microliter
ACN	Acetonitril
AS	Aminosäuren
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Atranon-Gencluster
a _w -Wert	Wasseraktivität
BGC	Biosynthetische Gencluster
bp	Basenpaare
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CE	Collision Energy
CEL	Zellulose-Agar
CXP	Cell exit potential
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	desoxyNukleosidTriPhosphat
DP	Declustering potential
DTT	Dithiothreitol
EP	Entrance potential
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
<i>g</i>	<i>g</i> -Kraft
g	Gramm
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IL	Interleukin
ITS	Internal transcribed spacer – Region
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	HPLC-Tandemmassenspektrometrie
Mol/L	Mol pro Liter

<i>M.</i>	<i>Memnoniella</i>
m/s	Meter pro Sekunde
m/z	Masse-/Ladungsverhältnis
MEA	Malzextraktagar
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minuten
ml	Milliliter
MRM	Multiple reaction monitoring
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
<i>P.</i>	<i>Purpureocillium</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PI	Propidiumiodid
PKS	Polyketidsynthase
PK-Zellen	Porzine-Kidney-Zellen
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribosomal Desoxyribonucleic Acid
rpm	revolutions per minute; „Umdrehungen pro Minute“
s	Sekunden
<i>S.</i>	<i>Stachybotrys</i>
SAT	Satratoxin-Gencluster
SBS	Sick-building Syndrom
SBS-Technologie	“short read sequencing by synthesis”-Technologie
SC1, 2, 3	Satratoxincluster 1, 2, 3
SK-Zellen	Swine-Kidney-Zellen
SMB	secondary metabolite biosynthesis
SNA	Synthetischer Nährstoffarmer Agar

sp.	Spezies (Einzahl)
spp.	Spezies (Mehrzahl)
TNF	Tumornekrosefaktor
<i>tri</i>	Trichodiensynthase Gen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Strukturformel von Stachybotrylacton (X = O) und Stachybotrylactam (X = NH)</i>	30
<i>Abbildung 2: Strukturformel von Atranon A (R ≙ H) und Atranon B (R ≙ OMe)</i>	31
<i>Abbildung 3: Grundstruktur eines tetrazyklischen 12, 13-Epoxytrichothec-9-en Ringsystems (EPT) mit Nummerierung der Kohlenstoffatome</i>	32
<i>Abbildung 4: Grundstruktur eines Typ D-Trichothecens.....</i>	33
<i>Abbildung 5: Satratoxincluster 1 – 3 (SC1 -SC3) und der Core Trichothecencluster (CTC) mit angrenzenden Genen von S. chartarum IBT 40293 (Genotyp S).....</i>	38
<i>Abbildung 6: Schematische Darstellung des Atranonclusters 1 (AC1)</i>	38
<i>Abbildung 7: Schematische Darstellung des AC2 und der Region downstream davon von IBT 7711, IBT 40293, IBT 40288 und 51-11 aus ULRICH et al. (2022)</i>	39
<i>Abbildung 8: ITS-Region von Schimmelpilzen mit Primern für S. chartarum nach HAUGLAND und HECKMAN (1998).....</i>	46
<i>Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Illumina Sequenzierungsbibliothek, die einem Poly(A) Enrichment unterzogen wurde; nach MICROSYNTH (2022).....</i>	50
<i>Abbildung 10: SBS Sequenzierung (ILLUMINA INC., 2022a).....</i>	51
<i>Abbildung 11: Schematische Darstellung der Paired-End Sequenzierung mit Dual Index Reads – Reverse Complement; nach ILLUMINA INC. (2022b) und MICROSYNTH (2022)</i>	52
<i>Abbildung 12: Schematische Darstellung der Randbereiche der Scaffolds 1 und 1543 von IBT 40293 (S) mit den Positionen der beiden Primer</i>	66
<i>Abbildung 13: Arbeitsablauf zur Erstellung von Einsporisolaten – Überführen von Pilzsporen auf SNA</i>	68
<i>Abbildung 14: Arbeitsablauf zur Erstellung von Einsporisolaten</i>	69
<i>Abbildung 15 Feld A-C: Satratoxincluster 1 bis 3 (SC1 – SC3) und der Core Trichothecencluster (CTC) der Stämme IBT 7711 (S), IBT 40293 (S), IBT 40288 (A) und 51-11 nach SEMEIKS et al. (2014).....</i>	91
<i>Abbildung 16: Darstellung des trankierten sat1 in Scaffold 31 von 51-11, annotiert nach SEMEIKS et al. (2014), aus ULRICH et al. (2022)</i>	92
<i>Abbildung 17: Vereinfachte Darstellung der Gensequenz von SC1, SC1-down-1 und SC1 SC1-down-2</i>	93
<i>Abbildung 18: Gelbild von SC1-down-1 in verschiedenen S-Genotypen</i>	93
<i>Abbildung 19: Gelbild von SC1-down-1 in verschiedenen A-Genotypen.....</i>	94

<i>Abbildung 20: Verbindende Sequenz der ¹Scaffolds 1 (KL652499) und ³1543 (KL651645) von IBT 40293 (S).....</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 21: Region des Atranoncluster 1 und Bereiche up- und downstream der genannten vier Stämme</i>	<i>104</i>
<i>Abbildung 22: Sequenzen von AC2 und der Region downstream davon in IBT 7711, IBT 40293, IBT 40288 und 51-11</i>	<i>105</i>
<i>Abbildung 23: Gelbild der Triplex-PCR der Stämme IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) zur Bestätigung der Genotypen</i>	<i>106</i>
<i>Abbildung 24: Coverage des KL659150 von IBT 42685 (H) und CBS 324.65 (H)</i>	<i>107</i>
<i>Abbildung 25: Ausschnitt der Coverage des KL659150 von IBT 40293 (S)</i>	<i>108</i>
<i>Abbildung 26: Coverage des KL656922 von IBT 40293</i>	<i>109</i>
<i>Abbildung 27: Coverage des KL656922 von IBT 42685</i>	<i>110</i>
<i>Abbildung 28: Coverage des KL656922 von CBS 324.65</i>	<i>110</i>
<i>Abbildung 29: Coverage der KL650302, KL651028 und KL652499 von IBT 40293 (S)</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 30: Coverage der KL650302, KL651028 und KL652499 von CBS 324.65 (H)</i>	<i>112</i>
<i>Abbildung 31: Coverage der KL650302, KL651028 und KL652499 von IBT 42685 (H). Bild A: Coverage des KL650302 (beinhaltet SC1) von IBT 42685 (H), Bild B: Coverage des KL651028 (beinhaltet SC2) von IBT 42685 (H) und Bild C: Coverage des KL652499 (beinhaltet SC3) von IBT 42685 (H).....</i>	<i>113</i>
<i>Abbildung 32: PCA-Plot 2D mit IBT 40293 (S) als Referenzgenom</i>	<i>114</i>
<i>Abbildung 33: PCA-Plot 2D mit IBT 40288 (A) als Referenzgenom.....</i>	<i>115</i>
<i>Abbildung 34: Ausschnitt des PCA-Plot 3D mit IBT 40288 (A) als Referenzgenom..</i>	<i>115</i>
<i>Abbildung 35: Reads der Satratoxingene (sat1 bis sat10) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) mit Standardabweichung (arb. u. = normalisierte Readcounts).....</i>	<i>117</i>
<i>Abbildung 36: Reads der Satratoxingene (sat11 bis sat16) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) mit Standardabweichung (arb. u. = normalisierte Readcounts).....</i>	<i>118</i>
<i>Abbildung 37: Reads der Satratoxingene (sat17 bis sat21) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) mit Standardabweichung (arb. u. = normalisierte Readcounts).....</i>	<i>119</i>
<i>Abbildung 38: Reads der Atranongene (atr1 bis atr14) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) mit</i>	

<i>Standardabweichung (arb. u. = normalisierte Readcounts).....</i>	<i>120</i>
<i>Abbildung 39: Reads der tri-gene (tri3, tri4, tri5, tri10, tri11, tri14, tri17 und tri18) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) mit Standardabweichung (arb. u. = normalisierte Readcounts). 122</i>	
<i>Abbildung 40: Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mittels Zellkultur.....</i>	<i>124</i>
<i>Abbildung 41: PK15-Zellen, 24 Stunden nach Zugabe von 5 µl Toxinextrakt von IBT 40293 von Reiskultur.....</i>	<i>125</i>
<i>Abbildung 42: PK15-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 5µl Toxinextrakt von IBT 40293 und den Toxinstandards Satratoxin G, Satratoxin H und Roridin L2 (Endkonzentration jeweils 2 µg/ml).</i>	<i>126</i>
<i>Abbildung 43: PK15-Zellen nach 0 (a), 24 (b) und 48 (c) Stunden Inkubation mit 5µl Toxinextrakt von IBT 40293 (S).</i>	<i>127</i>
<i>Abbildung 44: PK15-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit dem Toxinextrakt von IBT 40293.....</i>	<i>128</i>
<i>Abbildung 45: PK15-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit Toxinextrakt von IBT 40293 (S) und Färbung mit Trypanblau</i>	<i>129</i>
<i>Abbildung 46: PK15-Zellen, die zunächst für 24 Stunden dem Toxinextrakt von IBT 40293 (Bild a) ausgesetzt waren, wurden gewaschen und in ein frisches Medium überführt.....</i>	<i>130</i>
<i>Abbildung 47: PK15-Zellen aus Abbildung 42 (Endkonzentration der Toxinstandards jeweils 2 µg/ml) nach Waschung und Aussäen in frischem Medium nach 24 und 48 Stunden Inkubation.....</i>	<i>131</i>
<i>Abbildung 48: PK15-Zellrasen vor und nach Zugabe von Toxinextrakt von IBT 40293 (S)</i>	<i>132</i>
<i>Abbildung 49: PK15-Zellen, versetzt mit dem toxinhaltigen Zellüberstand von adhären und von kugeligen Zellen</i>	<i>133</i>
<i>Abbildung 50: PK15-Zellen nach Färbung mit Annexin V und Propodiiiodid.....</i>	<i>134</i>
<i>Abbildung 51: LC-MS/MS-Chromatogramme von Atranonen und/oder dessen Vorläufermolekülen für IBT 40293 (S) – nicht vorhanden, rotes und blaues Spektrum stehen für die Fragmentionen.</i>	<i>136</i>
<i>Abbildung 52: LC-MS/MS-Chromatogramme von Atranonen und dessen Vorläufermolekülen für IBT 42685 (H) – die jeweilige Retentionszeit der Fragmentionen ist blau umkreist. Blaues Spektrum = Quantifier-Tochterion, rotes Spektrum = Qualifier-Tochterion</i>	<i>137</i>
<i>Abbildung 53: LC-MS/MS-Chromatogramme von Atranonen und dessen</i>	

<i>Vorläufermolekülen für CBS 324.65 (H) – die jeweilige Retentionszeit der Fragmentationen ist blau umkreist. Blaues Spektrum = Quantifier-Tochterion, rotes Spektrum = Qualifier-Tochterion</i>	<i>138</i>
<i>Abbildung 54: LC-MS/MS-Chromatogramme von Atranonen und dessen Vorläufermolekülen für IBT 40288 (A) – die jeweilige Retentionszeit der Fragmentationen ist blau umkreist. Blaues Spektrum = Quantifier-Tochterion, rotes Spektrum = Qualifier-Tochterion</i>	<i>139</i>
<i>Abbildung 55: Schematische Darstellung des Modells zur Evolution der Genotypen S, A und H von S. chartarum.....</i>	<i>145</i>

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Übersicht über Nachweise von Stachybotrys spp. in Innenräumen.....</i>	28
<i>Tabelle 2: Produktion der Sekundärmetaboliten von S. chartarum und S. chlorohalonata nach ANDERSEN et al. (2003) und JAGELS et al. (2019)</i>	29
<i>Tabelle 3: Übersicht über die Bildung von Sekundärmetaboliten von S. chartarum geordnet nach Genotyp A, H und S, modifiziert nach ANDERSEN et al. (2003) und ULRICH et al. (2020).....</i>	29
<i>Tabelle 4: Übersicht der Chemotypen und Genotypen von S. chartarum</i>	40
<i>Tabelle 5: Krankheitsverlauf der Stachybotryotoxikose des Pferdes nach FORGACS (1972).....</i>	42
<i>Tabelle 6: Nachweisbarkeit der Satratoxin- und Atranongene von H-Stämmen von S. chartarum mittels PCR, nach ULRICH et al. (2020).....</i>	47
<i>Tabelle 7: Verwendete Stachybotrys Isolate (n = 4) für Transkriptom-, LC-MS/MS und Deep Resequencing Analyse und ihre Herkunft.....</i>	63
<i>Tabelle 8: Verwendete Isolate (n = 8) von S. chartarum für PCRs und ihre Herkunft</i>	64
<i>Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide für Triplex-PCR nach ULRICH et al. (2020)</i>	65
<i>Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide für PCR im Bereich downstream von SC1 ..</i>	65
<i>Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide für PCR im Übergang zwischen Scaffold 1 und Scaffold 1543 von IBT 40293.....</i>	66
<i>Tabelle 12: Verwendete Nährmedien.....</i>	67
<i>Tabelle 13: Reaktionsansatz (25 µl) für die Triplex-PCR.....</i>	71
<i>Tabelle 14: Temperaturprogramm für Triplex-PCR</i>	71
<i>Tabelle 15: Gencluster und deren Locusname, welche zur Auswertung der Deep Resequencing Daten verwendet wurden.</i>	76
<i>Tabelle 16: Verwendete Stämme für PCR im Bereich downstream von SC1</i>	77
<i>Tabelle 17: Reaktionsansatz (25 µl) für PCR im Bereich downstream von SC1.....</i>	77
<i>Tabelle 18: Temperaturprogramm für PCR im Bereich downstream von SC1.....</i>	78
<i>Tabelle 19: Reaktionsansatz (25 µl) für PCR – Übergang zwischen zwei Scaffolds....</i>	79
<i>Tabelle 20: Temperaturprogramm für PCR- Übergang zwischen zwei Scaffolds.....</i>	79
<i>Tabelle 21: Grundbedingungen für die HPLC</i>	86
<i>Tabelle 22: Gradientenprogramm (linear) für die HPLC</i>	87
<i>Tabelle 23: Verwendete Quellenparameter des Tandemmassenspektrometers (QTRAP 5500, Sciex, Framingham, USA).....</i>	87
<i>Tabelle 24: Substanzspezifische Parameter für die Identifikation von 6-</i>	

<i>Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on, 3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dien-on und Atranon A</i>	88
<i>Tabelle 25: Auflistung der Scaffolds der Stämme IBT 40293 (S), IBT 7711 (S), 51-11 und IBT 40288 (A), die SC1 bis SC3, CTC und AC1 und AC2 enthalten</i>	89
<i>Tabelle 26: GC-Gehalt der SC1 bis SC3 (A) und von AC1 und AC2 (B) und deren Bereiche up- und downstream</i>	96
<i>Tabelle 27: Homologe Sequenzen mit Proteinen des SC1 von IBT 40293 (S) mit Eutypa lata UCREL1</i>	97
<i>Tabelle 28: Vergleich der genomischen Sequenzen, die SC1 von 51-11, IBT 40293 und IBT 7711 beinhalten (Scaffolds 31, 155 und 243)</i>	99
<i>Tabelle 29: Vergleich der Scaffolds, die SC2 beinhalten (51-11: Scaffold 111, IBT 7711: 1258, IBT 40293: 902)</i>	102
<i>Tabelle 30: Vergleich der kodierenden Sequenzen der von AC2 kodierten hypothetischen Proteine und der Scaffolds, die homolog zum AC2 bzw. zu dessen flankierenden Bereichen im Genom von IBT 40288 sind</i>	106
<i>Tabelle 31: Durchschnittliche Reads der Satratoxingene (sat1 bis sat10) von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) im Vergleich</i>	117
<i>Tabelle 32: Durchschnittliche Reads der Satratoxingene (sat11 bis sat16) von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) im Vergleich</i>	118
<i>Tabelle 33: Durchschnittliche Reads der Satratoxingene (sat17 bis sat21) von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) im Vergleich</i>	119
<i>Tabelle 34: Durchschnittliche Reads der Atranongene (atr1 bis atr14) von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) im Vergleich</i>	121
<i>Tabelle 35: Durchschnittliche Reads der tri-gene (tri3, tri4, tri5, tri6, tri10, tri11, tri14, tri17 und tri18) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) im Vergleich</i>	122
<i>Tabelle 36: Ergebnisse der LC-MS/MS-Messungen von 6-Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on, 3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dien-on und Atranon A</i>	135

I. EINLEITUNG

Stachybotrys (*S.*) ist ein Schimmelpilz, der ubiquitär vorkommt, bevorzugt jedoch auf zellulosehaltigem Material wächst (MCQUADE, 1963; NIELSEN et al., 1998a). Ein besonderes Problem stellt der Schimmelbefall in Gebäuden mit vorangegangenen Wasserschaden und erhöhter Luftfeuchtigkeit sowie in Futtermitteln dar (ENGVALL et al., 2001; ANDERSEN et al., 2002; BOTHA und NAUDÉ, 2002). Der Kontakt mit *Stachybotrys* kann vor allem bei Pferden und seltener bei anderen Tierarten die Erkrankung der Stachybotryotoxikose auslösen (FORGACS, 1972; DANKÓ, 1975; HARRACH et al., 1983). Beim Menschen wurden Fälle des sogenannten „Sick Building“-Syndroms (SBS) und pulmonale Hämorrhagien bei Kleinkindern mit dem Vorkommen von *Stachybotrys* spp. in Verbindung gebracht (ETZEL et al., 1998; JOHANNING et al., 1999).

Die Familie der *Stachybotriaceae* wird genetisch als hoch divers und besonders heterogen in ihrer Produktion von Sekundärmetaboliten beschrieben (ANDERSEN et al., 2002; LOMBARD et al., 2016). Neben einer Einteilung in zwei Chemotypen (A und S) nach ihrer Fähigkeit zur Bildung von makrozyklischen Trichothecenen oder Atranonen (ANDERSEN et al., 2003) gibt es einen weiteren Ansatz zur Einteilung von *S. chartarum* in drei Genotypen (A, H und S) (ULRICH et al., 2020). Die Einteilung der Genotypen richtet sich nach der Existenz unterschiedlicher Genabschnitte, die zur Bildung von Satratoxinen (Satratoxincluster 1 bis 3) oder Atranonen (Atranoncluster 1) benötigt werden (SEMEIKS et al., 2014; ULRICH et al., 2020).

In dieser Arbeit wurden vier der bisher auf NCBI hinterlegten Genomsequenzen analysiert und in Bezug auf ihre Satratoxin- und Atranoncluster verglichen. Außerdem wurden von vier *S. chartarum* Isolaten (zwei H-Genotypen, ein Genotyp S und ein Genotyp A) Deep Resequencing und Transkriptomanalysen durchgeführt. Es folgte eine Toxinextraktion der vier Isolate sowie eine Analyse der Metaboliten mittels LC-MS/MS. Die Beurteilung der Zytotoxizität der verschiedenen Genotypen wurde mittels Zytotoxizitätstest ermittelt.

Das Ziel war es durch diese Untersuchungen mehr Einblicke in die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der verschiedenen Genotypen zu erlangen. Mit Hilfe der erlangten Daten können Erklärungsansätze für die evolutionäre Entwicklung in Richtung der unterschiedlichen Genotypen von *S. chartarum* aufgestellt werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Gattung *Stachybotrys*

1.1. Taxonomie

HIBBETT et al. (2007) unterteilten das Reich der echten Pilze, der Mycota, in sieben Abteilungen: Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia und Neocallimastigomycota. Die Einteilung der Mycota erfolgt nach SAMSON (2010) jedoch in vier Abteilungen: die Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota und Chytridiomycota.

Die Gattung *Stachybotrys* (*S.*) wurde von CROUS et al. (2014) neu eingeordnet:

Reich Mycota

Unterreich Dikarya

Abteilung Ascomycota

Klasse Sordariomycetes

Unterklasse Hypocreomycetidae

Ordnung Hypocreales

Familie *Stachybotryaceae*

Gattung *Stachybotrys*

Der Name *S. chartarum* ist gebräuchlich und wird von verschiedenen Wissenschaftlern weltweit verwendet (LI und YANG, 2005). Zum jetzigen Zeitpunkt beinhaltet die Gattung *Stachybotrys* laut Informationen der Mycobank 179 legitimierte Spezies (MYCOBANK DATABASE; CROUS et al., 2014). *Stachybotrys* ist eine Gattung, welche sich in ihrem Phänotyp, Genotyp, Proteom sowie Metabolom sehr heterogen zeigt (CRUSE et al., 2002; WANG et al., 2015; LOMBARD et al., 2016; ULRICH et al., 2016).

In der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde ein schwarzer Schimmelpilz von einer Tapete in einem Gebäude in Prag isoliert. Der österreichische Botaniker Corda beschrieb diesen Pilz morphologisch und benannte ihn *S. atra* (CORDA, 1837). BISBY (1943) beschrieb die beiden Spezies *S. atra* und *S. subsimple*, die sich variabel in ihrer Morphologie zeigten. Man ging davon aus, dass äußere Faktoren, wie Licht und Kälte, Einfluss auf die Spezies hätten und dadurch „freak

isolates“ (abnormale Isolate) entstehen könnten, die jedoch keine eigenen Spezies seien. Die Zugehörigkeit eines Isolates zur Gattung *Stachybotrys* richtete sich nach der Farbe der Kolonie (BISBY, 1943).

Zehn Jahre später erfolgte die taxonomische Einteilung mikroskopisch nach Gestalt und Beschaffenheit der Konidien und Konidiophoren (HUGHES, 1953). Im Jahr 1976 erfolgte die Umbenennung von *S. atra* in *S. chartarum* (JONG und DAVIS, 1976). Zudem wurden aufgrund unterschiedlicher Kulturmorphologien elf Spezies unterteilt (JONG und DAVIS, 1976). Im Jahr 2002 wurden morphologisch ebenso elf anerkannte Spezies, teilweise jedoch abweichend von JONG und DAVIS (1976), beschrieben (CRUSE et al., 2002). Es wurden zwei Chemotypen (A und S) von *S. chartarum*, sowie eine neue Spezies namens *S. chlorohalonata*, beschrieben. Diese Einteilung erfolgte aufgrund der Sekundärmetaboliten sowie molekularer und phylogenetischer Untersuchung, hierbei spielte insbesondere die Sequenz des *tri5* Gens eine wichtige Rolle (ANDERSEN et al., 2003). Eine neuere Arbeit zeigte dann aber, dass es Isolate gibt, die nach Sequenzierung des *tri5* Gens zum Chemotyp S gezählt werden müssten, aber tatsächlich keine makrozyklischen Trichothecene bilden und somit nicht dem Chemotyp S zuzuordnen sind (ULRICH et al., 2016). ULRICH et al. (2020) stellten daher eine neue Einteilung von *S. chartarum* in drei Genotypen vor: Genotyp A besitzt den Atranoncluster, aber nicht die Satratoxincluster. Genotyp S besitzt stattdessen alle Satratoxincluster 1 – 3 (SC1 - SC3), dafür nicht den Atranoncluster 1. Genotyp H stellt einen Hybridtyp dar: Er besitzt den Atranoncluster, aber nur Teile der Satratoxincluster.

Die Zuordnung zur Gattung *Stachybotrys* stellt sich teilweise als problematisch dar, da immer wieder neue fragliche Spezies auftauchen (CRUSE et al., 2002; SCHULTES et al., 2021).

Ein Beispiel hierfür ist die Gattung *Memnoniella* (*M.*) *M. echinata* weist ähnliche Konidiophoren auf, produziert im Gegensatz zu *Stachybotrys* aber runde Sporen, die aneinander gekettet sind. Aus diesem Grund wurde diese Gattung zunächst unabhängig genannt (JONG und DAVIS, 1976). *M. echinata* weist zwar morphologische Ähnlichkeiten mit *Stachybotrys* auf, jedoch wurde durch phylogenetische Untersuchungen gezeigt, dass *Memnoniella* paraphyletisch zu *Stachybotrys* ist (HAUGLAND et al., 2001). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit im Metabolitenprofil wurden *Memnoniella* spp. später zu *Stachybotrys* spp. gezählt (WANG et al., 2014). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch *M. echinata* in der

Lage ist ähnliche Sporenpakete wie *S. chartarum* zu bilden (ZUCK, 1946; WANG et al., 2015). Darum wies WANG et al. (2015) *Memnoniella* der Gattung *Stachybotrys* zu. Dies wurde jedoch nach weiteren genetischen Untersuchungen wieder korrigiert (LOMBARD et al., 2016).

Neben *Memnoniella* wurde auch die Gattung *Myrothecium* unabhängig von *Stachybotrys* aufgelistet (LOMBARD et al., 2016). Doch auch *Myrothecium* hat ein ähnliches Metabolitenprofil sowie morphologische und phylogenetische Gemeinsamkeiten mit *Stachybotrys* spp. (CASTLEBURY et al., 2004).

Die taxonomische Einteilung von *Stachybotryaceae* auf Basis von mikroskopischen Merkmalen scheint nicht auszureichen, weshalb es mehr sequenzbasierter Analysen bedarf (LOMBARD et al., 2016). Im Vergleich zu vielen anderen filamentösen Schimmelpilzen stehen nur sieben Gesamtgenomanalysen von *Stachybotrys* zur Verfügung. WANG et al. (2015), LOMBARD et al. (2016) und ULRICH et al. (2020) weisen daher auf den Bedarf von weiteren Genomuntersuchungen hin, um die Gattung *Stachybotrys* weiter zu durchdringen und mehr Einheitlichkeit in der Taxonomie zu erlangen.

Aktuelle Untersuchungen über das mitochondriale Genom der Familie *Stachybotryaceae* bekräftigen die Zuordnung zu Hypocreales. Zudem wurde aufgrund dieser Untersuchungen angenommen, dass diese Spezies bereits in der Kreidezeit existierte (REN et al., 2021).

1.2. Wachstumsbedingungen

Die bevorzugte Matrix, auf der *Stachybotrys* spp. wachsen, ist zellulosehaltiges Material, da sie die Fähigkeit besitzen aus Zellulose Kohlenstoff zu beziehen (MCQUADE, 1963; SAMSON, 2010). Für *S. atra* wurde eine ideale Wachstumstemperatur von 23 °C und ein optimaler a_w -Wert von 0,98 beschrieben. Es wurde außerdem ein Minimum von 0,94 a_w und Temperaturlimits von 7 °C bis 37 °C genannt (AYERST, 1969). Für *Stachybotrys* spp. und *M. echinata* wurde Glucose als ein limitierender Faktor für das Wachstum beschrieben (BUSTON und BASU, 1948; MCQUADE, 1963). Zudem wurde Biotin in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts als limitierender Wachstumsfaktor für *M. echinata* beschrieben (STEINBERG, 1939; BUSTON und BASU, 1948). In neueren Studien wird 25 °C als die optimale Bebrütungstemperatur sowie PDA und MEA als die geeignetsten Nährmedien für *Stachybotrys* spp. angegeben (SAMSON, 2010; ULRICH und

SCHÄFER, 2020). Für das Nährmedium PDA wurden 25 °C und 0,997 a_w als optimale Wachstumsparameter beschrieben (FRAZER et al., 2011). Außerdem liegt die optimale Temperatur für die Sporulation laut FRAZER et al. (2011) bei 25 °C bis 30 °C und der a_w -Wert bei 0,95 – 0,98. Diese Parameter wurden bestätigt durch weitere Untersuchungen der Produktion von Sekundärmetaboliten des Schimmelpilzes, bei denen das Optimum auf PDA bei 25 °C bis 30 °C und 0,995 a_w lag (FRAZER et al., 2012). CROFT et al. (1986) nahmen an, dass ein hoher Zellulosegehalt und ein niedriger Stickstoffanteil im Medium die Produktion von Sekundärmetaboliten stimulieren. ULRICH und SCHÄFER (2020) zeigten ebenfalls durch LC-MS/MS-Messungen von makrozyklischen Trichothecenen die Relevanz des verwendeten Nährmediums auf. Die höchsten Konzentrationen von makrozyklischen Trichothecenen konnten auf Potato Dextrose Agar und Zelluloseagar detektiert werden (ULRICH und SCHÄFER, 2020).

1.3. Vorkommen

Der Schwärzepilz *Stachybotrys* spp. kommt ubiquitär vor, zumeist wächst er jedoch auf zellulosehaltigem Material (MCQUADE, 1963; NIELSEN et al., 1998a). Passende Substrate stellen Futtermittel und Einstreu, wie Heu und Stroh, sowie feuchte und welkende Elemente, darunter Baustoffe, die Zellulose als Grundlage haben, dar (HINTIKKA, 1977; JARVIS et al., 1983; NIKULIN et al., 1994; DILL et al., 1997; NIELSEN et al., 1998b).

1.3.1. Futtermittel

In der Sowjetunion kam es im Jahr 1931 vermehrt zu Todesfällen bei Militärpferden (FORGACS, 1972). Die Ursache hierfür war der Verzehr von Stroh, welches mit schwarzem Schimmel bedeckt war (DROBOTKO, 1945a). Sarkisov gelang es im Jahr 1947 *S. chartarum* aus Stroh zu isolieren, welches von einem Betrieb stammte, auf dem das Krankheitsbild der Stachybotryotoxikose beschrieben wurde (FORGACS, 1972). 1983 konnten makrozyklische Trichothecene, welche zur Stachybotryotoxikose führten (FORGACS, 1972), erstmals in Stroh nachgewiesen werden (HARRACH et al., 1983). Heu und Stroh werden als die geeignetsten Substrate für das Wachstum von *S. chartarum* beschrieben (DANKÓ, 1975; HARRACH et al., 1987). Das Vorkommen von *S. chartarum* in Heu und Stroh und daraus resultierende Erkrankungen bei Tieren wurden bis vor einigen Jahrzehnten mehrfach in verschiedenen Ländern, darunter Südafrika (KRIEK und MARASAS,

1983; BOTHA und NAUDÉ, 2002), Ungarn (HARRACH et al., 1987), Deutschland (LAUNER et al., 1987) und Marokko (TANTAOUI-ELARAKI et al., 1994) beschrieben. KLUWE (2006) beschrieb das Vorkommen unterschiedlicher *Stachybotrys*-Isolate in 32 Stroh- und Heuproben, welche aus Pferdeställen in Deutschland stammten. Einige der gewonnenen Isolate hatten die Fähigkeit makrozyklische Trichothecene zu produzieren. ULRICH et al. (2021) untersuchten 192 Strohproben aus Deutschland aus den Erntejahren 2006 und 2007 auf das Vorkommen von 21 Mykotoxinen. In 184 Proben wurde mindestens eines der Mykotoxine detektiert. In einer Strohprobe konnten makrozyklische Trichothecene nachgewiesen werden. Zudem wurde in vier Proben erstmals Stachybotrylactam detektiert. Dies weist darauf hin, dass Stroh zu einem nicht unerheblichen Teil zur oralen und inhalativen Exposition bei Tier und Mensch, welche Kontakt zu kontaminiertem Stroh haben, führen kann (ULRICH et al., 2021).

1.3.2. Lebensmittel

Stachybotrys spp. konnte in verschiedenen Lebensmitteln nachgewiesen werden. Im Folgenden sind einige dieser Funde beschrieben. Da jedoch in keinem der Fälle makrozyklische Trichothecene nachgewiesen werden konnten, wird vermutet, dass eine Kontamination durch einzelne Sporen wahrscheinlicher ist (BIERMAIER et al., 2015). Anfang der 1970er Jahre wurde in Finnland *Stachybotrys* aus Gerste und Weizen isoliert (KORPINEN und YLIMÄKI, 1971). In den USA gelang die Isolierung aus Sojabohnenwurzel (LI et al., 2001). Bei einer Untersuchung von getrockneten Kräutern (Majoran, Oregano, Thymian und Bohnenkraut) zeigte sich, dass es sich bei 10 % der isolierten Pilzstämme um hochtoxische Isolate des Chemotyp S von *S. chartarum* handelte (BIERMAIER et al., 2015). Im vergangenen Jahr wurde zudem das Vorkommen von diversen *S. chartarum* Isolaten in dem Staub von Ackerbohnen während des Dreschvorgangs beschrieben (GHERBAWY et al., 2021).

GOTTSCHALK (2009) untersuchte verschiedene Lebensmittelproben, darunter Weizen, Roggen und Hafer, auf deren Belastung mit Trichothecenen. Weizen und Roggen waren in dieser Studie vor allen mit Typ B Trichothecenen belastet, wohingegen Typ A Trichothecene vorwiegend bei Hafer gefunden werden konnten. In den untersuchten Proben konnten keine Trichothecene vom Typ D gefunden werden (LODs $\hat{=}$ Limit of detection, zwischen 0,2 und 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Roridin A Äquivalent) (GOTTSCHALK et al., 2009). BARTHEL et al. (2012) untersuchten

Gerste und Gerstenprodukte aus Bayern auf die Kontamination mit Trichothecenen. Braugerste und Wintergerste waren am stärksten kontaminiert. Braugerste wies die höchsten Konzentrationen mit Typ-A Trichothecenen auf. Im Gegensatz dazu wurden in Wintergerste vor allem Typ-B Trichothecene detektiert. In keiner der untersuchten Proben wurden makrozyklische Trichothecene gemessen (BARTHEL et al., 2012). Auch in weiteren Untersuchungen mit Früchten, Gemüse und Nüssen konnten keine makrozyklischen Trichothecene in den Proben nachgewiesen werden (SULYOK et al., 2010).

1.3.3. Innenräume

Die erste Beschreibung von *Stachybotrys* spp. erfolgte nach der Isolierung von einer Tapete (CORDA, 1837). *Stachybotrys* spp. und andere filamentöse Schimmelpilze kommen vor allem in Gebäuden mit vorangegangenen Wasserschäden und daraus resultierend erhöhter Luftfeuchtigkeit vor (ENGVALL et al., 2001; NIELSEN, 2002). *Stachybotrys* spp. produziert ab einem Wert von 0,95 a_w signifikante Mykotoxinmengen (NIELSEN, 2003; FRAZER et al., 2012). Diese Toxine werden mittels Sporen verschleppt und können bei hoher Sporenlast in Luftproben detektiert werden. Der ungünstigste Fall tritt auf, wenn es zunächst durch einen temporären Wasserschaden im Gebäude zu starkem Schimmelbefall und einhergehender Mykotoxinsynthese kommt, gefolgt von einer Episode mit trockenen Bedingungen, die dazu führen, dass die produzierten Sporen gelöst und an die Umgebungsluft abgegeben werden (ADAN, 1994; NIELSEN, 2003). ALEKSIC et al. (2017) führten Untersuchungen an Schimmelpilzen (unter anderem *S. chartarum*) durch. Die Schimmelpilzproben wurden für den Versuch auf Tapete angezüchtet und anschließend auf ihre Toxinproduktion getestet. Außerdem wurden Aerosole auf das Vorkommen dieser Toxine überprüft. ALEKSIC et al. (2017) kamen zu dem Schluss, dass die untersuchten Substanzen je nach Luftgeschwindigkeit im Aerosol zu finden sind. Besonders die makrozyklischen Trichothecene Satratoxin H und Verrucaridin J können sich an Partikel, welche kleiner als Sporen sind, festsetzen und somit tief in die respiratorischen Luftwege aufgenommen werden (ALEKSIC et al., 2017).

Aus Tabelle 1 ist zu entnehmen, dass *Stachybotrys* spp. sowie dessen Sekundärmetaboliten mehrfach in mehreren Ländern aus Innenräumen von verschiedenen Materialien isoliert werden konnten. Teilweise konnten Erkrankungen von Anwohnern oder Mitarbeitern in den befallenen Gebäuden

festgestellt werden. Näheres wird in Kapitel II.4.2 beschrieben.

Tabelle 1: Übersicht über Nachweise von *Stachybotrys* spp. in Innenräumen

Land	Matrix	Referenz
Niederlande	Luftfilter, Fußböden, Möbel, Teppiche, Wandmaterial, Luftfilter	VAN REENEN- HOEKSTRA et al. (1991)
Finnland	Luftfilter	REPONEN et al. (1994)
USA	verschimmeltertes Papier	JOHANNING et al. (1996)
Finnland	Staub und Baumaterial aus Innenräumen	ANDERSSON et al. (1997)
England	Luftfilter	HUNTER et al. (1988)
USA	Luftfilter	ETZEL et al. (1998)
USA	Luftfilter	JOHANNING et al. (1998)
Dänemark	Holz, Gips, Isoliermaterial, Tapete	GRAVESEN et al. (1999)
Schweden	Verschiedene Materialien aus Innenräumen	ENGVALL et al. (2001)
USA	Luftfilter	BRASEL et al. (2005)
Deutschland	Tapete, Gipskartonbauplatten, Wandmaterial	GOTTSCHALK et al. (2006)
Finnland	Luftfilter	MUSSALO- RAUHAMAA et al. (2010)

1.4. Sekundärmetabolismus

Die Metaboliten des Sekundärstoffwechsels, im Gegensatz zu denen des Primärstoffwechsels, tragen nicht zur Lebenserhaltung eines Organismus bei. Aus diesem Grund wurden sie als sogenannte Abfall- und Detoxifikationsprodukte bezeichnet (HASLAM, 1986). Metaboliten des sekundären Stoffwechsels weisen nur ein geringes Molekulargewicht von meist weniger als 3.000 Da auf (WILLIAMS et al., 1989; KELLER et al., 2005). Zu diesen Stoffen des Sekundärmetabolismus zählen auch die Mykotoxine (JARVIS et al., 1995).

Die Sekundärmetaboliten scheinen eine ökologische Funktion zu haben (SCHARF et al., 2014; BILLS und GLOER, 2016). Zudem wurden antibiotische (MATSUMOTO et al., 1977), antimykotische sowie krebshemmende (DE

CARVALHO et al., 2016) und immunmodulierende (WU et al., 2017) Eigenschaften von Mykotoxinen beschrieben.

Die von *S. chartarum* produzierten Metaboliten lassen sich laut JARVIS (2003) in drei Gruppen einteilen: Phenylspirodrimane, Atranone und Satratoxine. In Tabelle 2 ist beschrieben, welche Metaboliten von *S. chartarum* und welche von *S. chlorohalonata* gebildet werden können (ANDERSEN et al., 2003; JAGELS et al., 2019).

Tabelle 3 gibt die Erkenntnisse über die Bildung von Atranonen, einfachen und makrozyklischen Trichothecenen sowie Phenylspirodrimanen je nach Genotyp (S, H oder A) von *S. chartarum* wieder (ANDERSEN et al., 2003; ULRICH et al., 2020).

Tabelle 2: Produktion der Sekundärmetaboliten von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* nach ANDERSEN et al. (2003) und JAGELS et al. (2019)

	<i>S. chartarum</i>		<i>S. chlorohalonata</i>
	Chemotyp A	Chemotyp S	
Atranone	+	-	+
Phenylspirodrimane	+	+	+
Satratoxine	-	+	-

+ Produktion - keine Produktion

Tabelle 3: Übersicht über die Bildung von Sekundärmetaboliten von *S. chartarum* geordnet nach Genotyp A, H und S, modifiziert nach ANDERSEN et al. (2003) und ULRICH et al. (2020)

<i>S. chartarum</i>	Atranone	Einfache Trichothecene	Makrozyklische Trichothecene	Phenylspirodrimane
Genotyp S	-	+	+	+
Genotyp A	+	+	-	+
Genotyp H	n.b.	n.b.	-	n.b.

+ Bildung nachgewiesen - Bildung nicht nachgewiesen n.b. bisher nicht bekannt

1.4.1. Phenylspirodrimane

Phenylspirodrimane gehören zu den Meroterpenen. Sie haben einen polyzyklischen Aufbau mit einer sogenannten Spiroverbindung (siehe Abbildung 1) (NIELSEN, 2003; WANG et al., 2014).

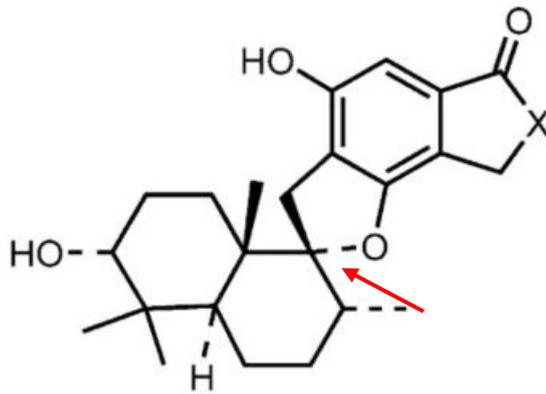


Abbildung 1: Strukturformel von Stachybotrylacton (X = O) und Stachybotrylactam (X = NH), roter Pfeil: Spiroverbindung; nach JARVIS (2003).

Es werden mehrere Dutzend unterschiedliche Phenylspirodrimane beschrieben, die von *Stachybotrys* spp. gebildet werden können (JARVIS et al., 1995; LI et al., 2014; BAO et al., 2021; YANG et al., 2021). Sie machen den größten Teil an Sekundärmetaboliten von *Stachybotrys* spp. aus. Chemotyp S (*S. chartarum*) bildet zudem eine größere Anzahl an Phenylspirodrimananen als *S. chlorohalonata*, welche jedoch in ihrer Toxinkonzentration geringer sind (JARVIS et al., 1995; JAGELS et al., 2019). Die Zytotoxizität von Phenylspirodrimananen ist im Vergleich zu der von makrozyklischen Trichothecenen wesentlich geringer (JARVIS et al., 1995).

Sie können entweder über den Terpensyntheseweg oder den Polyketidsyntheseweg hergestellt werden (NIELSEN, 2003; GERIS und SIMPSON, 2009; MATSUDA und ABE, 2016).

Das Stachybotrylactam, welches zu dieser Gruppe von Sekundärmetaboliten gehört, wird aufgrund seiner Fähigkeit zur Hemmung des Komplementsystems und der Reduktion der Ausschüttung von TNF- α als immunsupprimierend beschrieben (HINKLEY et al., 1999). Phenylspirodrimane weisen zudem antibakterielle, immunmodulierende, antivirale und zytotoxische Aktivität auf (BAO et al., 2015; LI et al., 2017; JIA et al., 2020; BAO et al., 2021; MOU et al., 2021).

1.4.2. Atranone

Atranone haben als chemische Grundstruktur ein Dolabellan-Diterpen-Ringsystem, sowie ein Enol-Lacton-System (siehe Abbildung 2). Atranone A – K gehören zu den Atranonen, welche von *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* gebildet werden können. Die Atranone A – K unterscheiden sich in ihrer Struktur jeweils in ihrem variablen Rest (HINKLEY et al., 1999; HINKLEY et al., 2000; HINKLEY et al.,

2003). *Stachybotrys* spp. sind nur in der Lage entweder Atranone oder makrozyklische Trichothecene zu bilden, nicht jedoch beide gleichzeitig (ANDERSEN et al., 2003). *S. chlorohalonata* und Chemotyp A von *S. chartarum* gehören zu denen, die die Fähigkeit zur Atranonproduktion besitzen (HINKLEY et al., 1999; ANDERSEN et al., 2003; RAND et al., 2006; SEMEIKS et al., 2014).

Die Gene, die vermutlich für die Atranonbildung kodieren, wurden *atr1* bis *atr14* bezeichnet. Der Cluster, der diese Gene beinhaltet soll, wurde als Core Atranoncluster (CAC) oder Atranoncluster 1 (AC1) beschrieben (SEMEIKS et al., 2014).

Genotyp H, welcher durch eine Triplex-PCR bestimmt werden kann, besitzt die ATR-Gencluster, die zur Atranonbildung benötigt werden. Die Bildung von Atranonen wurde bisher aber nicht bestimmt (ULRICH et al., 2020). Die Triplex-PCR von ULRICH et al. (2020) ermöglicht die Zuordnung zu Genotyp A, H oder S von *S. chartarum*, sowie von *S. cholorhalonata* durch den Einsatz von drei Primerpaaren.

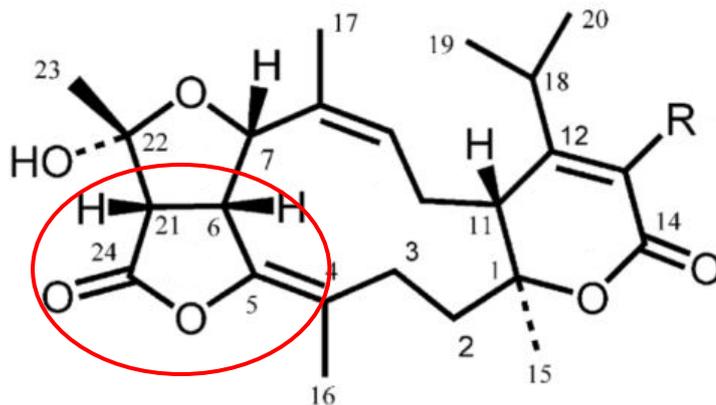


Abbildung 2: Strukturformel von Atranon A ($R \cong H$) und Atranon B ($R \cong OMe$), rot eingekreist: Enol-Lacton-System; nach JARVIS (2003).

Es wurde eine immunmodulierende Wirkung von Atranonen beschrieben. Nach einer intratrachealen Applikation von Atranon A und C, mit Konzentrationen von 2 – 20 μg pro Tier, konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme von Entzündungsmediatoren in der broncho-alveolären Lavageflüssigkeit (BALF) beobachtet werden (RAND et al., 2006). Zudem wurden drei neu entdeckte Atranone beschrieben, die von *S. chartarum* isoliert werden konnten. Für diese Atranone konnte in vitro ein inhibitorischer Effekt auf *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* und Methicillin-resistente *Stachylococcus aureus* (MRSA)

aufgezeigt werden (YANG et al., 2019). Außerdem wurde kürzlich ein zytotoxischer Effekt von Atranonen auf humane Osteosarkomzellen (MG-63) beschrieben (QIN et al., 2020).

1.4.3. Trichothecene

Zur Familie der Trichothecene werden aktuell über 200 Toxine gezählt. Sie alle haben als chemische Grundstruktur ein tetrazyklisches 12,13-Epoxytrichothec-9-en Ringsystem (EPT) (GROVE et al., 2007).

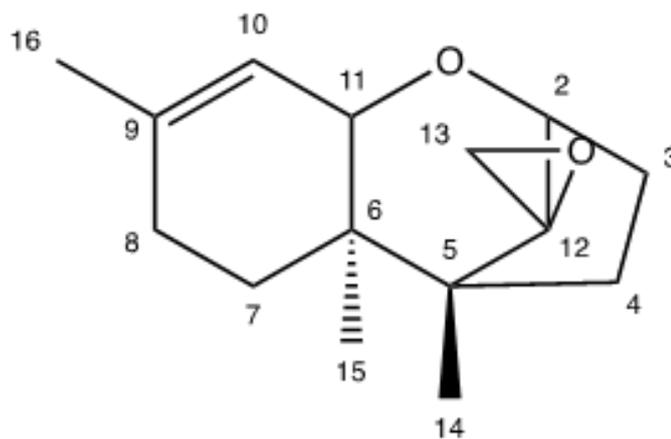


Abbildung 3: Grundstruktur eines tetrazyklischen 12, 13-Epoxytrichothec-9-en Ringsystems (EPT) mit Nummerierung der Kohlenstoffatome.

Trichothecene wurden in die vier Typen A – D unterteilt; sie alle unterscheiden sich in Position und Anzahl der Hydroxygruppen und der Form der Veresterung (UENO, 1983). Typ A und Typ B zählen zu den einfachen Trichothecenen. Trichothecene vom Typ C sind ebenso einfache Trichothecene und zeichnen sich durch eine oder mehrere zusätzliche Epoxygruppen aus. Typ D-Trichothecene zählen zu den makrozyklischen Trichothecenen (COLE et al., 2003; MCCORMICK et al., 2011). Die makrozyklische Form bildet sich durch ein Ringsystem zwischen den Kohlenstoffatomen C-4 und C-15. Bei ihnen befindet sich eine Epoxygruppe zwischen den Kohlenstoffatomen C-12 und C-13 (COLE et al., 2003). Die Grundstruktur eines Typ D-Trichothecens ist der Abbildung 4 zu entnehmen.

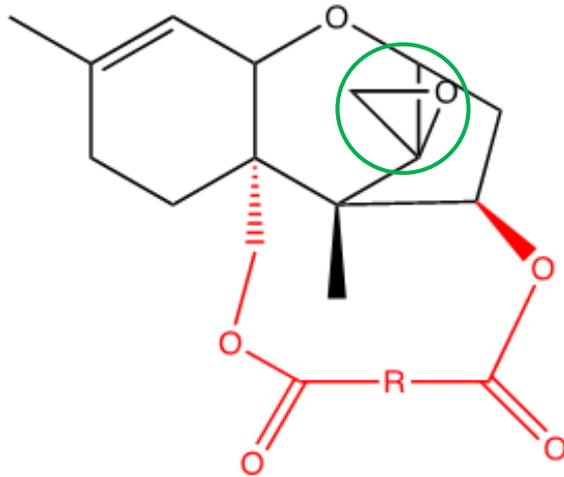


Abbildung 4: Grundstruktur eines Typ D-Trichothecens; rot hervorgehoben: Ringsystem zwischen dem C-4 und C-15-Kohlenstoffatom, grün eingekreist: Epoxygruppe.

Sowohl *S. chartarum* als auch *S. chlorohalonata* sind in der Lage Typ A-Trichothecene, wie Trichodermol und Trichodermin, zu bilden (NIELSEN et al., 1998b; ANDERSEN et al., 2002; ANDERSEN et al., 2003). Die Bildung von makrozyklischen Trichothecenen ist zu diesem Zeitpunkt innerhalb der Gattung *Stachybotrys* nur von Chemotyp S bekannt. Zu diesen Substanzen zählen Satratoxin F, G und H, Roridin E und L-2, sowie Verrucarin J und deren Isoformen (JARVIS et al., 1988; ANDERSEN et al., 2002; JARVIS, 2003).

Makrozyklische Trichothecene sind generell potenter als einfache Trichothecene (PESTKA und FORSELL, 1988; ISLAM et al., 2009). Die makrozyklischen Trichothecene Satratoxin G, Roridin A und Verrucarin A zeigten im Zellkulturtest gegenüber SK-Zellen eine etwa zwanzig Mal höhere inhibitorische Konzentration (IC_{50} : 0,001-0,007 $\mu\text{g/ml}$) als das Typ A Trichothecen T2-Toxin (IC_{50} : 0,018 $\mu\text{g/ml}$) (HANELT et al., 1994; GAREIS, 2006).

Makrozyklische Trichothecene werden neben *Stachybotrys* spp. auch von anderen Schimmelpilzgattungen, wie *Myrothecium* spp., gebildet. Zudem hat auch die Pflanzengattung *Baccharis* vermutlich die Fähigkeit diese Toxine zu synthetisieren (JARVIS et al., 1988). Typ D-Trichothecene zeigen die höchste Zytotoxizität, da sie die Fähigkeit zur irreversiblen Hemmung der eukaryotischen Proteinsynthese haben, indem sie irreversibel an die ribosomale 60S Untereinheit binden (UENO, 1977; HERNANDEZ und CANNON, 1982; UENO, 1985; FEINBERG und MACLAUGHLIN, 1989; ROCHA et al., 2005).

Makrozyklische Trichothecene haben neben einem immunsuppressiven Effekt auch Ödeme und Hautschädigung zur Folge, da sie Schäden an Membranen und Kapillargefäßen verursachen können (UENO, 1984). Sie wirken zudem proinflammatorisch, indem sie die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen und Zytokinen fördern (LEINO et al., 2003; ISLAM et al., 2006; PIECKOVA et al., 2009; LICHTENSTEIN et al., 2010). Bei Zellkulturtests mit Makrophagen wurde eine Hochregulierung von MIP-2 („macrophage inflammatory protein-2“) sowie C3aR („complement 3A receptor“) durch Satratoxin G festgestellt, was sich mit der vorher genannten proinflammatorischen Wirkung von makrozyklischen Trichothecenen deckt (CHUNG et al., 2003a).

2. Genetik von Pilzen

Bedeutende Fortschritte im Verständnis der Genetik von Organismen wurden in den 1940er Jahren durch die genetischen Untersuchungen biochemischer Prozesse an dem Schimmelpilz *Neurospora* von G. W. Beadle und E. L. Tatum erreicht (BEADLE und TATUM, 1941; SEGUNDO-VAL und SANZ-LOZANO, 2016). Durch ihre Untersuchungen konnte die Erkenntnis erlangt werden, dass ein Gen für Biosynthese bestimmter Stoffwechselkomponenten verantwortlich ist – dies führte zur „Ein-Gen-ein Enzym-Hypothese“ (GRAW, 2015).

Im Laufe der Zeit wurde diese aber zur „Ein-Gen-ein-Protein-Hypothese“ erweitert. Vereinfacht betrachtet blieb diese Hypothese auch weitestgehend bestehen. In den 1940er und 1950er Jahren führten weitere Untersuchungen zum besseren Verständnis der RNA. Dazu zählten die Studien von GOLDSTEIN und PLAUT (1955). Sie beschrieben, dass die RNA im Zellkern synthetisiert wird und schließlich ins Zytoplasma übergeht.

2.1. RNA-Klassen

Die rRNA (ribosomale RNA) kommt mit etwa 85 % am häufigsten vor und stellt ein wichtiges Element der Ribosomen dar (PALADE, 1955). Die deutlich instabilere mRNA (englisch: messenger-RNA oder Boten-RNA) macht nur rund 4 % der gesamten RNA aus und ist wesentlich an der Proteinbiosynthese beteiligt (BRENNER et al., 1961). Die heute als tRNA (Transfer-RNA) bekannte Form der RNA macht 5 – 10 % der gesamten RNA aus. HOAGLAND et al. (1958) konnten zeigen, dass Aminosäuren an die tRNA gekoppelt werden können, was sie zu einem Adaptermolekül in der Proteinsynthese macht. Es gibt für jede der 20 Aminosäuren

eine gesonderte tRNA als Anticodon, wodurch die in der DNA kodierten Aminosäuren aneinandergesetzt werden können (GRAW, 2015). Neben der eben genannten RNA-Formen ist heute bekannt, dass es eine Reihe weiterer RNA-Klassen (unter anderem: snRNA, snoRNA, asRNA, siRNA) gibt. Diese sind wesentlich kürzer und gehören zu den nicht-kodierenden Ribonukleinsäuren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genaktivitäten (DUPUIS-SANDOVAL et al., 2015; ROMANO et al., 2017).

2.2. Transkription bei Eukaryoten

Pilze gehören neben Pflanzen und Tieren zum Reich der Eukaryoten, weshalb in diesem Abschnitt auf die Transkription von Protein-kodierenden Genen bei Eukaryoten eingegangen wird.

Als Transkriptom versteht man die Gesamtheit aller kodierender und nicht-kodierender RNA-Moleküle (GRAW, 2015). Eukaryoten besitzen vier (I-IV) RNA Polymerasen, die am Transkriptionsvorgang beteiligt sind. Die Polymerasen unterscheiden sich sowohl in ihren biochemischen Parametern als auch in ihren funktionellen Charakteristika. Die RNA-Polymerase II transkribiert die mRNA Protein-kodierender Gene. Sie benötigt bei Eukaryoten spezielle Proteinmoleküle für die Polymerasebindung, diese werden als Transkriptionsfaktoren bezeichnet (BENTLEY, 1999; GRAW, 2015). Eine essentielle Rolle bei der Regulation der Expression Protein-kodierender Gene spielt der Promotor, ein Sequenzbereich etwa 200 bp upstream des Transkriptionsstarts. An diesen Promotor binden sowohl die RNA-Polymerase II als auch die Transkriptionsfaktoren (GRAW, 2015). Seit den 1970er Jahren weiß man, dass Eukaryoten in ihrer DNA neben kodierenden (Exons) auch nicht-kodierende (Introns) Bereiche aufweisen. Die Introns werden beim Spleißvorgang aus den primären Transkripten herausgeschnitten (SCHERRER et al., 1979). Nach dem Spleißen verfügen die Transkripte über ein durchgehendes offenes Leseraster (englisch: open reading frame, ORF), das die Proteinsynthese ermöglicht (BENTLEY, 1999; PROUDFOOT, 2000). Das sogenannte alternative Spleißen ermöglicht zudem eine Vielzahl von Kombinationen, wie DNA-Sequenzen in Proteininformationen übersetzt werden können (KEREN et al., 2010; GRAW, 2015).

Es werden vier Gruppen von Introns unterschieden, die mittels verschiedener Mechanismen gespleißt werden. Die Introns der Gruppe I werden unter anderem in

Mitochondrien von Pilzen gefunden. Diese Introns spleißen sich selbst, was auch autokatalytisches Spleißen genannt wird (HAUGEN et al., 2005). Die Introns der Gruppe II können im Genom von Bakterien und Organellen gefunden werden; sie zeichnen sich durch eine Lassostruktur aus (LAMBOWITZ und ZIMMERLY, 2011). Bei den meisten eukaryotischen Introns handelt es sich um die dritte Gruppe mit der Spleißosom-abhängigen Reaktion (GRAW, 2015). Das Spleißosom ist ein komplexes Ribonukleoprotein, es kann spezifische Erkennungssignale an den Enden der Introns erkennen. Verschiedene snRNAs (englisch: small nuclear RNAs) sind am Aufbau des Spleißosoms beteiligt und somit essentiell für den Vorgang der Genexpression (WILL und LÜHRMANN, 2011). Die vierte Gruppe der Introns stammt von tRNA. Diese werden im Zellkern von Eukaryoten und in Archaeobakterien gefunden (HEINEMANN et al., 2010).

3. Mykotoxincluster bei *Stachybotrys* spp.

Gene können im Genom entweder isoliert oder in Genclustern (\cong Gruppen) vorkommen (TRAIL et al., 1995). Mykotoxincluster bezeichnet Cluster, deren enthaltene Gene für Proteine kodieren, die zur Bildung von Mykotoxinen benötigt werden. Gencluster beinhalten sogenannte „backbone“ Biosynthesegene für die Produktion von diesen Mykotoxinen (KELLER, 2015). Gene, die in dem gleichen Syntheseweg zur Produktion von Sekundärmetaboliten bei Schimmelpilzen eingebunden sind, sind meist in Genclustern fokussiert und benachbart zu finden. Sie sind somit nur selten getrennt im Genom aufzufinden (SIDHU, 2002; KELLER et al., 2005; ALEXANDER et al., 2009). Diese Genloki werden entweder als „secondary metabolite biosynthesis“ (SMB) Cluster (SEMEIKS et al., 2014) oder als Biosynthetische Gencluster (BGCs) (ROKAS et al., 2020) bezeichnet. Sie befinden sich zumeist an den Enden von Chromosomen oder auf akzessorischen Chromosomen (HOOGENDOORN et al., 2018; ROKAS et al., 2020). Es wurden drei Mechanismen beschrieben, wie es zur evolutionären Entstehung unterschiedlicher Gencluster kommen kann. Dazu zählen die de novo Assemblierung, die sogenannte funktionale Divergenz und der horizontale Gentransfer (ROKAS et al., 2020).

In *S. chartarum* sind drei Gencluster beschrieben, die an der Biosynthese von Satratoxinen beteiligt sind. Diese sind jedoch im Genom verteilt und nicht direkt aufeinanderfolgend. Dies ähnelt den Genclustern, die die Synthese des T-2 Toxins

in *Fusarium sportrichioides* ermöglichen (PROCTOR et al., 2009; ROKAS et al., 2018). SEMEIKS et al. (2014) beschrieb all die Gencluster von *S. chartarum*, die für Proteine kodieren, die je nach Chemotyp entweder für die Synthese von Atranone oder Satratoxine benötigt werden. Dazu zählen zum einen der Core Trichothecencluster (CTC), die drei Satratoxincluster (SC1 – 3 mit *sat1* bis *sat21*) und zum anderen der Core Atranoncluster (CAC oder auch AC1 genannt) und AC2, welche an der Atranonproduktion beteiligt sein sollen. SC1 ist 30 kbp groß und beinhaltet die Gene *sat1* bis *sat10*. Satratoxincluster 2, der eine Größe von 20 kbp hat, ist ausschließlich bei Satratoxin bildenden Isolaten zu finden und umfasst die Gene *sat11* bis *sat16* (ULRICH et al., 2020). Die Regulierung des SC2 erfolgt vermutlich durch das Zinkfingerprotein Sat15 (SEMEIKS et al., 2014).

Zinkfingerproteine sind eine Klasse von Proteinen, die die Fähigkeit besitzen an Nukleinsäuren zu binden (PABO und SAUER, 1984). Zinkfingerproteine besitzen die sogenannte Zinkfingerdomäne, an die ein Zinkion gebunden ist (HANAS et al., 1983). Durch dieses eingebaute Zinkatom entsteht eine schleifenförmige Struktur – der Zinkfinger. Dieser kann spezifisch mit der DNA oder RNA interagieren und zählt somit zu den Transkriptionsfaktoren (KLUG, 2010).

SC1 und SC2 sind die größten Satratoxincluster und können als klassische SMB Cluster gesehen werden, die auf PKSs (Polyketidsynthasen) basieren (SEMEIKS et al., 2014).

Polyketidsynthasen (PKSs) sind eine Familie von großen Multidomänenenzymen oder Enzymkomplexen, welche die Polyketide produzieren (COX, 2007). Die PKS Gene, die an der Bildung eines bestimmten Polyketids beteiligt sind, sind in der Regel in Genclustern organisiert (KELLER, 2015). SEMEIKS et al. (2014) beschrieben das Vorkommen von 35 – 38 PKSs bei den von ihnen untersuchten *S. chartarum* Isolaten. Das sind mehr als bei jedem anderen bisher bekannten Schimmelpilz und doppelt so viele als bei *Fusarium* (SEMEIKS et al., 2014). Dies weist darauf hin, dass eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten von *Stachybotrys* noch nicht beschrieben sind. Zudem scheinen PKSs eine Rolle in der Biosynthese von Trichothecenen und Atranonen von *Stachybotrys* zu spielen (SEMEIKS et al., 2014).

Der kleinere SC3 schließt die Gene *sat17* bis *sat21* ein und befindet sich direkt neben dem CTC. Sat20 ist dem Cys6-Zinkfingerprotein ähnlich, wodurch es

womöglich bei der Regulierung des SC3 beteiligt ist (SEMEIKS et al., 2014). Ähnliche Sequenzen wurden bereits in diversen anderen Transkription regulierenden Proteinen von Schimmelpilzen gefunden (WOLOSHUK et al., 1994).

In Abbildung 5 sind SC1 bis SC3 sowie der Core Trichothecencluster (CTC) von IBT 40293 (Genotyp S) mit den angrenzenden Genen dargestellt, wie sie in der Arbeit von SEMEIKS et al. (2014) beschrieben wurden.

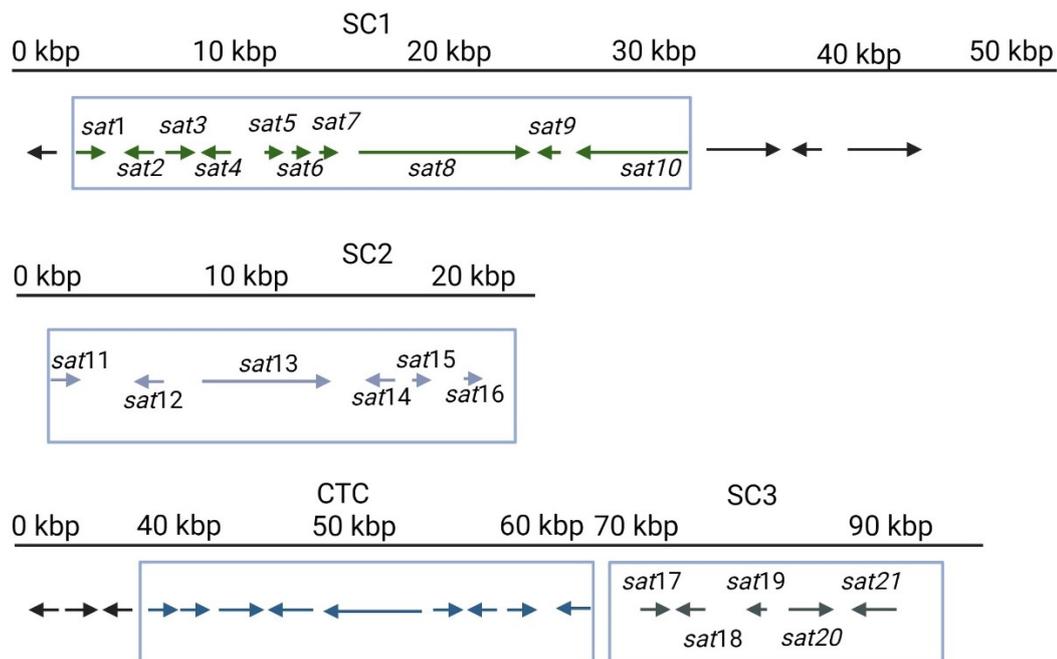


Abbildung 5: Satratoxincluster 1 – 3 (SC1 -SC3) und der Core Trichothecencluster (CTC) mit angrenzenden Genen von *S. chartarum* IBT 40293 (Genotyp S) aus ULRICH et al. (2022). Pfeile zeigen Gene mit ihrer Ausrichtung, die jeweiligen Cluster sind blau eingrahmt dargestellt, aus ULRICH et al. (2022).

Der etwa 35 kbp große Atranoncluster 1 und die angrenzenden Gene sind schematisch in Abbildung 6 dargestellt. Der Atranoncluster 1 (AC1) beinhaltet die Gene *atr1* bis *atr14*.

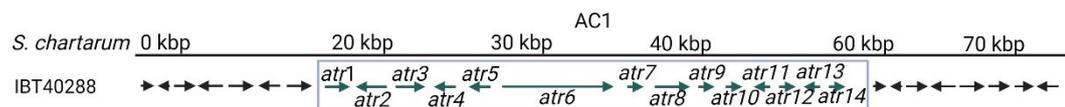


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Atranonclusters 1 (AC1), Pfeile zeigen Gene mit ihrer Ausrichtung, der AC1 ist blau eingrahmt dargestellt, aus ULRICH et al. (2022).

Ein weiterer Gencluster wurde von SEMEIKS et al. (2014) beschrieben und als Atranoncluster 2 (AC2) bezeichnet (siehe Abbildung 7). Dessen Funktion ist bis dato jedoch unklar, da drei der sechs darin enthaltenen Gene auch in Genotyp S zu finden sind und somit nicht Genotyp A spezifisch sind (SEMEIKS et al., 2014).

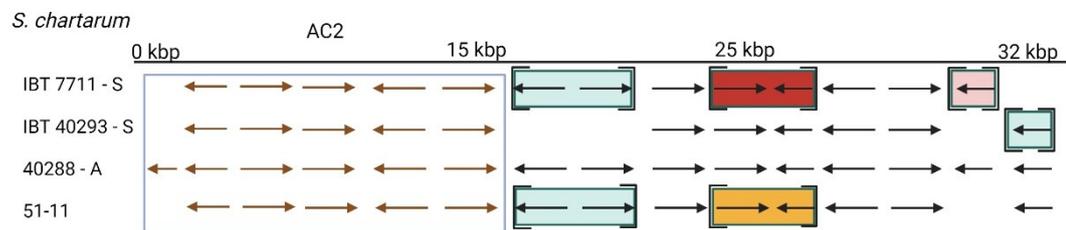


Abbildung 7: Schematische Darstellung des AC2 und der Region downstream davon von IBT 7711, IBT 40293, IBT 40288 und 51-11 aus ULRICH et al. (2022). Gene sind als Pfeile dargestellt. Blau eingerahmt zeigt den AC2, welcher für die folgenden hypothetischen Proteine kodiert: S40288_09035, S40288_11459, S40288_09036, S40288_09037, S40288_09038 und S40288_11460 (von links nach rechts). Gene in eckigen Klammern sind nicht im Scaffold, der auch AC2 beinhaltet, sondern in anderen Scaffolds. Die gleiche Farbe eines Kastens weist auf einen Zusammenhang der Scaffolds in den jeweiligen Stämmen hin, aus ULRICH et al. (2022).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde kein Isolat von *S. chartarum* isoliert, welchem sowohl der AC1 als auch alle Satratoxincluster fehlen oder der alle diese Cluster gleichzeitig aufweist (KÖCK et al., 2021). Es wurde beschrieben, dass Chemotyp S von *S. chartarum* in der Lage ist makrozyklische Trichothecene zu produzieren, während Chemotyp A die weniger toxischen Atranone bildet (JARVIS et al., 1998; HINKLEY et al., 1999; ANDERSEN et al., 2003; HINKLEY et al., 2003) (siehe dazu Tabelle 4). Obwohl der genaue Syntheseweg von makrozyklischen Trichothecenen und Atranonen nicht endgültig geklärt ist, weiß man, dass am Beginn beider Synthesewege Farnesylpyrophosphat steht (UENO, 1983; HINKLEY et al., 1999).

Tabelle 4: Übersicht der Chemotypen und Genotypen von *S. chartarum*

Chemotyp S¹	Chemotyp A¹	
Produziert Satratoxine, aber keine Atranone	Produziert Atranone, aber keine Satratoxine	
Genotyp S²	Genotyp H²	Genotyp A²
Besitzt alle Satratoxincluster (SC) und alle Satratoxingene (<i>sat1</i> bis <i>sat21</i>)	Besitzt nur einen Teil der Satratoxincluster, aber alle Atranongene (<i>atr1</i> - <i>atr14</i>)	Besitzt keinen SC, aber den AC1 mit allen Atranongenen (<i>atr1</i> - <i>atr14</i>)

¹ nach ANDERSEN et al. (2003)² nach ULRICH et al. (2020)

In der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Datenbank sind aktuell vier Genome von *S. chartarum* hinterlegt: zwei Genome von Genotyp S (IBT 40293 und IBT 7711) und ein Genotyp A (IBT 40288), sowie 51-11, dessen Genotyp aber bisher nicht untersucht wurde. Die drei erstgenannten Stämme haben SEMEIKS et al. (2014) zur Erforschung der Chemotyp-spezifischen Mykotoxincluster herangezogen. Bisher gibt es noch keine Gesamtgenomdaten von einem Genotyp H-Stamm. Bislang weisen PCR-Ergebnisse darauf hin, dass Genotyp H den AC1 aufweist, jedoch nur unvollständige Satratoxincluster (ULRICH et al., 2020). Neben den vier Genomen von *S. chartarum* ist ein *S. chlorohalonata*, ein *S. elegans* sowie ein *S. microspora* als Genomprojekt auf NCBI zu finden. Über *S. elegans* wurde berichtet, dass diese Spezies weder Trichothecene noch Atranone bilden kann (ANDERSEN et al., 2002). *S. chlorohalonata* besitzt die Fähigkeit zur Produktion von Atranonen und einfachen Trichothecenen, jedoch kann dieser Stamm keine makrozyklischen Trichothecene synthetisieren (ANDERSEN et al., 2003). Von *S. microspora* ist bekannt, dass er Atranone produziert (ANDERSEN et al., 2002). Über die Bildungsfähigkeit von Trichothecenen sind die Informationen aber teils widersprüchlich (EL-KADY und MOUBASHER, 1982; ANDERSEN et al., 2002).

4. Bedeutung als Krankheitserreger

4.1. Bedeutung in der Tiermedizin

Es wurde beschrieben, dass während der Invasion der Mongolen in Russland im 13. Jahrhundert eine Vielzahl von Pferden verstarb, welche zuvor von mit Schimmel kontaminiertem Stroh fraßen. Dies ist die früheste Beschreibung von Todesfällen im Tierreich, die vermutlich mit *Stachybotrys* spp. in Verbindung steht (FORGACS, 1972; DANKÓ, 1975).

Im Jahr 1930 kam es zu plötzlichen Todesfällen von Pferden in der Sowjetunion. Die Tiere erkrankten damals nach deren Aufnahme von verschimmeltem Stroh, dies wurde als „NZ“ (neizvestnoe zabolevanie - unbekannte Erkrankung) oder „MZ“ (massovoe zabolevanie - Massenerkrankung) bezeichnet. Es wird davon ausgegangen, dass die Erkrankung der Pferde, die früher in Ungarn als Pyoseptikämie bezeichnet wurde, als Primärursache die Erkrankung der Stachybotryotoxikose hatte. Es kam sowohl zu Nekrosen und Geschwüren als auch zu plötzlichen Todesfällen der Tiere (DANKÓ, 1975). Sarkisov und seiner Arbeitsgruppe gelang es 1938 einen Zusammenhang zwischen *Stachybotrys* und der beschriebenen Erkrankung herzustellen indem er *S. alternans* im Stroh eines betroffenen Pferdebestandes nachweisen konnte (FORGACS, 1972). Das Krankheitsbild der sogenannten Stachybotryotoxikose wurde erstmalig in einem Wehrblatt der sowjetischen Armee erwähnt. Um die Gesundheit der Militärpferde zu gewährleisten, wurde darin unter anderem eine Haltungs- und Ernährungsempfehlung beschrieben. Im Jahr 1942 wurde in der Zeitschrift für Veterinärkunden (54. Jahrgang, Nr. 8) eine erste deutsche Fassung der russischen Zeitschrift veröffentlicht, wodurch sich das Wissen über die Stachybotryotoxikose auch im deutschsprachigen Raum verbreitete (KLUWE, 2006).

Bisher sind in der Literatur neben Pferden, auch Fälle von Stachybotryotoxikose bei Rindern (FORGACS, 1972), Schafen (SCHNEIDER et al., 1979; HARRACH et al., 1983) und Schweinen (DANKÓ, 1975) beschrieben. Der klinische Verlauf zeigt Ähnlichkeiten mit dem der Pferde (siehe Tabelle 5), wobei Rinder weniger anfällig erscheinen (FORGACS et al., 1958). Zudem weiß man von Fällen dieser Erkrankung bei Hühnern (ASKALONOV, 1949; FORGACS, 1972). Die Stachybotryotoxikose konnte außerdem bei einem Nilpferd und einem Bison in einem Zoo diagnostiziert werden (FORGACS, 1972).

Die Krankheitsform, der Krankheitsverlauf und die Krankheitsdauer (siehe Tabelle 5) der Stachybotryotoxikose richten sich nach der aufgenommenen Menge des Toxins und der Dauer der Exposition (FORGACS, 1972). Die atypische Verlaufsform kommt nur selten vor (REED et al., 2017).

Tabelle 5: Krankheitsverlauf der Stachybotryotoxikose des Pferdes nach FORGACS (1972)

Verlaufsform	Stadium	Beginn der Symptomatik ¹	Krankheitsdauer	Symptomatik
Typisch	1	2 – 20 d	8 – 30 d	Oberflächliche bis tiefe Risse im Maulbereich Ödeme im Kopfbereich Anschwellen lokaler Lymphknoten
	2	k.A.	5 – 20 d	Koagulopathie Thrombozytopenie Lymphopenie
	3	k.A.	1 – 6 d	Thrombozytopenie ↑ Lymphopenie ↑ Hyperthermie bis 41,5 °C Frische Nekrosen im Maulbereich Apathie Schwacher Puls Tod
Atypisch	k.A.	k.A.	k.A.	Nervöse Störungen verminderte Reflexe Hyperästhesie Schluckbeschwerden Tod durch Aussetzen der Atmung
Schockform	k.A.	k.A.	10 – 12 h	Hyperthermie bis 41 °C Zyanose Hämorrhagien an Schleimhäuten Schwacher Puls Immer tödlich

¹ nach Exposition des Toxins k.A.: keine Angaben

Im Tierversuch konnte Korneev im Jahr 1948 Symptome der Stachybotryotoxikose bei Mäusen, Meerschweinchen, Hasen und Hunden gezielt hervorrufen (FORGACS, 1972). Zudem konnte in einem Experiment die Stachybotryotoxikose durch die Verabreichung von mit *S. alternans* kontaminiertem Futter bei Hühnerküken ausgelöst werden (PALYUSIK, 1970).

Untersuchungen ergaben eine Verschiebung der Immunantwort vom Typ 1 zum

Typ 2, nachdem Mäusen mehrfach hohe Dosen von *S. chartarum* Sporen intratracheal verabreicht wurden (ROSENBLUM LICHTENSTEIN et al., 2016).

Bei einem Tierversuch mit Mäusen konnte überdies gezeigt werden, dass eine intranasale Einbringung von Sporen Krankheitssymptome hervorruft (LEINO et al., 2003). Es wurde eine Monozytose, Neutrophilie und Lymphozytose durch Untersuchungen der Lunge festgestellt. Zudem waren die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α , sowie die Expression der Chemokine MIP-1a, MIP-1b und MCP-1 erhöht (LEINO et al., 2003).

4.2. Bedeutung in der Humanmedizin

Trichothecene, welche von *Stachybotrys* produziert werden, wurden mehrfach mit Toxikosen im Menschen in Verbindung gebracht, wenn diese in Kontakt mit von *Stachybotrys* befallenem Getreide kamen oder dieses aufnahmen (UENO, 1977). Bei einem humanmedizinischen Experiment konnten bei Personen unter anderem Irritationen der Schleimhäute und andere dermatologische Beschwerden sowie Atemwegsprobleme hervorgerufen werden, wenn sie direkten Hautkontakt mit hoch kontaminiertem Stroh hatten (DROBOTKO, 1945).

Der Schimmelbefall durch *S. chartarum* in Gebäuden mit vorangegangenem Wasserschaden und erhöhter Luftfeuchtigkeit stellt ein weiteres Gesundheitsrisiko dar (ANDERSEN et al., 2011). So wurden zwischen Januar 1993 und Dezember 1994 bei zehn Säuglingen in Cleveland, Ohio, USA pulmonale Hämorrhagien und Hämosiderosen beschrieben (ETZEL et al., 1998). In den Jahren 1993 bis 1998 wurde bereits von zehn verstorbenen und insgesamt 37 erkrankten Kleinkindern in derselben Gegend berichtet, bei denen eine pulmonale Hämosiderose diagnostiziert werden konnte. Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Erkranken der Kinder und dem *S. chartarum* Befall nach Wasserschaden in den Häusern hergestellt (ETZEL et al., 1996; DEARBORN et al., 1999). Ein weiterer Fall einer lebensbedrohlichen pulmonalen Hämorrhagie wurde im Jahr 2000 bei einem Neugeborenen in Florida (USA) beschrieben. Das Kind war Berichten zufolge starkem Schimmelbefall (unter anderem *Stachybotrys*) im Wohnbereich und Tabakrauch ausgesetzt (NOVOTNY und DIXIT, 2000; TRIPI et al., 2000).

In dieser Zeit wurde mehrfach das Vorkommen von *Stachybotrys* mit dem Auftreten von neurologischen und respiratorischen Auffälligkeiten beim Menschen in Verbindung gebracht (KOSKINEN et al., 1995; JOHANNING et al., 1996;

DEARBORN et al., 1999; SCHEEL et al., 2001; DEARBORN et al., 2002).

Bei Personen in Finnland, die in von *Stachybotrys* befallenen Häusern wohnten, konnten Augenirritationen, Atemnot und Lethargie festgestellt werden (MUSSALO-RAUHAMAA et al., 2010).

Als sogenanntes „Sick-Building“-Syndrom (SBS) wird ein Symptomenkomplex bezeichnet, welcher unter anderem mit dem Aufenthalt in von Schimmel befallenen Räumen in Verbindung steht (ENGVALL et al., 2001; SCHEEL et al., 2001; ADITAMA und ANDARINI, 2002). Das „Sick-Building“-Syndrom zeichnet sich durch Symptome wie Schleimhautirritationen, Gelenkbeschwerden, Ermüddungserscheinungen, Hautleiden sowie neurologische, respiratorische und gastrointestinale Symptome aus (REDLICH et al., 1997; JOHANNING et al., 1999; SABIR et al., 1999; ADITAMA und ANDARINI, 2002; LORENZ et al., 2013).

Man geht davon aus, dass dem SBS ein multifaktorielles Geschehen zu Grunde liegt (ADITAMA und ANDARINI, 2002). Physischer und psychischer Stress, schlechte Luftqualität und die Exposition gegenüber Mykotoxinen, Bioaerosolen, Rauch und bakteriellen Endotoxinen führen zum Ausbruch des Krankheitsgeschehens (ENGVALL et al., 2001; TROUT et al., 2001; KUHN und GHANNOUM, 2003; MARMOT et al., 2006; ARIKAN et al., 2018).

In Gebäude mit vorangegangenem Wasserschaden kommt *S. chartarum* häufig zusammen mit einer Vielzahl anderer Schimmelpilze vor (MILLER et al., 2003). Die allergischen und nicht allergischen Symptome, die von *S. chartarum* ausgelöst werden sollen, können auch von anderen Schimmelpilzen hervorgerufen werden. Daher postulieren MILLER et al. (2003), dass es in feuchten Gebäuden nicht möglich ist die Beteiligung eines spezifischen Schimmelpilzes (wie *S. chartarum*) an bestimmten Erkrankungen zu beurteilen.

In manchen Fällen konnte rückblickend zudem kein Zusammenhang zwischen den Ausbrüchen von pulmonalen Häm siderosen und der Präsenz von makrozyklischen Trichothecenen in den betroffenen Häusern hergestellt werden (JARVIS et al., 1998). Daher wird davon ausgegangen, dass neben den makrozyklischen Trichothecenen auch andere Sekundärmetabolite von *Stachybotrys*, wie das Stachylysin (ein von *Stachybotrys* gebildetes Hämolyisin), an den Symptomen beteiligt waren (VESPER et al., 2000; VESPER et al., 2001; VESPER und VESPER, 2002). Es wurden *Stachybotrys*-Isolate untersucht, die aus den Gebäuden

aus Cleveland stammten, in denen Fälle von pulmonalen Häm siderosen bei Kleinkindern diagnostiziert wurden. Dabei wurde festgestellt, dass sieben der acht Isolate Stachylysin produzierten (VESPER und VESPER, 2002).

S. chartarum könnte jedoch nicht nur als Pathogen in der Humanmedizin relevant sein, sondern durch diesen Pilz gebildete Moleküle könnten in Zukunft auch als Therapeutikum eine Rolle spielen. So konnten Untersuchungen mit Zellkulturtests zeigen, dass natürliche Sekundärmetaboliten, die aus *S. chartarum* isoliert werden können, die humane Proteinkinase CK2 inhibieren (HAIDAR et al., 2021). Die Proteinkinase CK2 ist in verschiedenen Krebszellen überexprimiert und der gezielte Einsatz solcher Inhibitoren könnte Möglichkeiten für neue Krebstherapien eröffnen (HAIDAR et al., 2021).

5. Methoden zur Untersuchung von *Stachybotrys* spp.

5.1. Genotypisierung

Zur Genotypisierung von *Stachybotrys* spp. wird die Polymerasekettenreaktion (PCR) und eine anschließende Teilgensequenzierung herangezogen. Es gibt eine Reihe von Gensequenzen, die zur Identifizierung von *Stachybotrys* spp. herangezogen werden können. Dazu zählen unter anderem die Genabschnitte ITS-1/4, ITS-1/2, 18S rDNA, ITS-1 sowie die Gene *tri5*, *tub2*, *chs1* und *sat1 – sat21* (WHITE et al., 1990; ZHOU et al., 2000; CRUZ-PEREZ et al., 2001; CRUSE et al., 2002; BLACK et al., 2008; SEMEIKS et al., 2014; ULRICH et al., 2020).

Für die initiale Zuordnung zum Reich der Mycota dienen die sogenannten ITS-Regionen (internal transcribed spacer). Hierbei handelt es sich um nicht kodierende Genabschnitte, die alle Schimmelpilze besitzen (HAUGLAND und HECKMAN, 1998; SCHOCH et al., 2012; HIBBETT und TAYLOR, 2013). Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung der ITS-Region von Schimmelpilzen mit Primern zur Untersuchung von *S. chartarum*.

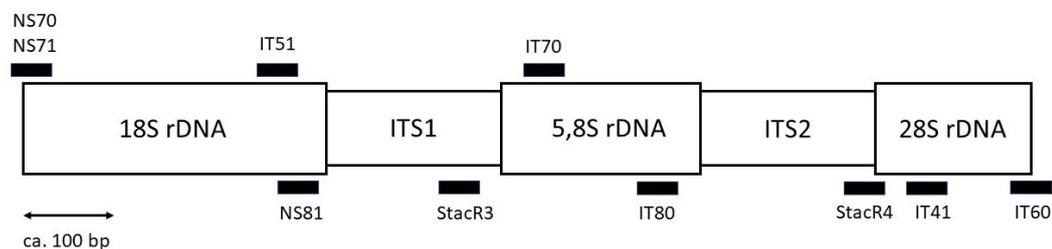


Abbildung 8: ITS-Region von Schimmelpilzen mit Primern für *S. chartarum* nach HAUGLAND und HECKMAN (1998).

S. chartarum und *S. chlorohalonata* unterscheiden sich in dieser ITS-Region lediglich an Position 58 in einem Basenpaar (HAUGLAND und HECKMAN, 1998). Nach ANDERSEN et al. (2003) ist es nicht möglich die beiden Chemotypen A und S von *S. chartarum* anhand der ITS1- und ITS4-Sequenzen zu differenzieren.

Das Gen *chs1* ist kodierend für die Chitin-Synthase (JOLLÈS, 1999). Diese Gensequenz ermöglicht die Differenzierung von *S. chlorohalonata* und *S. chartarum*, da sich diese Sequenzen hier in neun Basenpaaren unterscheiden (ANDERSEN et al., 2003).

Eine Möglichkeit zur Differenzierung der Chemotypen A und S bietet das Gen *tri5*

(CRUSE et al., 2002). Das *tri5* kodiert für die Trichodiensynthase, welche für die Umwandlung von Trichodien aus Farnesylpyrophosphat essentiell ist (MCCORMICK et al., 2011). Die eben genannten Chemotypen unterscheiden sich in einem Basenpaar, während *S. chartarum* und *S. chlorohalonata* sogar 28 Basensubstitutionen in diesem Abschnitt aufweisen (CRUSE et al., 2002; ANDERSEN et al., 2003).

Ein weiteres Gen, das laut ANDERSEN et al. (2003) zur Unterscheidung von *S. chlorohalonata* und *S. chartarum* herangezogen werden kann, ist *tub2*. Das Gen *tub2* kodiert für β -Tubulin: dieses Protein ist Bestandteil des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen (LÖFFLER, 2007).

Einige Isolate, die laut ANDERSEN et al. (2003) zu Chemotyp S von *S. chartarum* gezählt werden, sind jedoch nicht in der Lage makrozyklische Trichothecene zu produzieren (ULRICH, 2016). Aus diesem Grund war eine weitere Unterteilung der Isolate nötig. ULRICH et al. (2020) gelang es eine Triplex-PCR zu entwickeln, durch die sich drei Genotypen (A, S und H) unterscheiden lassen. Die Isolate, die keine makrozyklischen Trichothecene bilden können, aber nach ANDERSEN et al. (2003) aufgrund der *tri5*-Sequenz ursprünglich zum Chemotyp S gezählt wurden, können laut ULRICH et al. (2020) nun dem Genotyp H zugeordnet werden.

Die Fähigkeit zur Produktion von makrozyklischen Trichothecenen ist bislang nur von Genotyp S bekannt. Dieser besitzt alle *sat*-Gene, aber keine Atranongene. Genotyp A besitzt alle *atr*-, jedoch keine *sat*-Gene. Genotyp H ist ein Hybridtyp, der zwar alle Atranongene, aber nur einen unvollständigen Satratoincluster aufweist (ULRICH et al., 2020).

Tabelle 6: Nachweisbarkeit der Satratoin- und Atranongene von H-Stämmen von *S. chartarum* mittels PCR, nach ULRICH et al. (2020)

Gencluster	Gene	Nachweisbarkeit
SC1	<i>sat1</i> bis <i>sat10</i>	+
SC2	<i>sat11</i> bis <i>sat16</i>	-
SC3	<i>sat17</i> bis <i>sat21</i>	+/-
AC1	<i>atr1</i> bis <i>atr14</i>	+

+ nachweisbar durch PCR

- nicht nachweisbar durch PCR

+/- nur manche der Gene waren durch PCR nachweisbar

5.2. Next Generation Sequencing

In dieser Arbeit wurden Next Generation Sequencing (NGS), Transkriptomanalysen und Deep Resequencing Analysen an drei unterschiedlichen Genotypen von *S. chartarum* durchgeführt, um so neue Erkenntnisse in Bezug auf Genetik und Expression der verschiedenen Genotypen zu erlangen.

Das NGS, auch Sequenzierung der zweiten Generation genannt, ist eine effektive Methode zur Sequenzierung von DNA. Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente klonal fragmentiert und schließlich mit Hilfe von Mikrofluiden sequenziert (MCGINN und GUT, 2013).

Im Vergleich dazu steht die Didesoxymethode nach Sanger, welche eine enzymatische Methode der Sequenzierung darstellt. Dabei wird die DNA zunächst denaturiert, mit Hilfe eines Primers wird der Template-Strang komplementiert. Der Einbau eines markierten Desoxynukleotid führt schließlich zum Kettenabbruch. Aus diesem Grund wird diese Methode auch Kettenabbruch-Synthese genannt (SANGER et al., 1977a).

Fred Sanger und sein Team begannen in den 1960er Jahre mit der Entwicklung einer Sequenzierungsmethode, die heute als Sanger-Sequenzierung (Didesoxymethode nach Sanger) bekannt ist. Bei dieser Methode kann die Basenabfolge einer DNA-Sequenz bestimmt werden, indem DNA-Moleküle in kürzere Sequenzen gespalten, anschließend analysiert und wieder zusammengesetzt werden. Ausgehend von einem Oligodesoxynukleotid-Primer katalysiert dabei eine DNA-Polymerase die Synthese des komplementären DNA-Stranges (SANGER et al., 1977b). Durch den Einsatz der Ionophorese gelang zudem eine Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe (SANGER und COULSON, 1978). Nachteilig ist, dass bei dieser Methode eine Teilsequenz der DNA bekannt sein muss, damit der Primer daran binden kann (SANGER, 2001).

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA gelang durch die Entwicklung einer neuen Sequenzierungsmethode von GRONENBORN und MESSING (1978). Bei dieser Methode wandelt der hier verwendete M13 Phage doppelsträngige in einzelsträngige DNA um.

Im Laufe der Zeit begann die Sequenzierung der mitochondrialen DNA des Menschen, wodurch erste Ergebnisse im „Human Genome Projekt“ erlangt werden konnten (ANDERSON et al., 1981; SANGER, 2001). Im Rahmen des „Human

Genome Projekts“ wurden die bisherigen Methoden und Techniken zur Sequenzierung weiterentwickelt, woraus sich das Next Generation Sequencing entwickelte. Das Next Generation Sequencing hat im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung Vorteile in Bezug auf Zeit, Kosten und Arbeitsaufwand (MCGINN und GUT, 2013).

5.2.1. Transkriptomanalyse

Das Transkriptom bezeichnet die Gesamtheit der RNA-Moleküle in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt (WANG et al., 2009). Die Transkriptomanalyse in dieser Arbeit wurde mittels Illumina Sequenzierung durchgeführt, weshalb im Folgenden nur auf diese Art der RNA-Sequenzierung (kurz RNA-Seq) näher eingegangen wird. In dieser Arbeit wurde nicht das gesamte Transkriptom analysiert, sondern lediglich die mRNA (messenger-RNA).

Die RNA-Sequenzierung ist eine effiziente Technologie mit hoher Sensitivität, die der Quantifizierung der Genexpression dient (ANONYMUS, 2014; ZHANG et al., 2018). Die Illumina „short read sequencing by synthesis“ (SBS) Technologie ist durch ihre Schnelligkeit, Kosteneffizienz und Genauigkeit gut für die RNA-Sequenzierung geeignet (ROSENKRANZ et al., 2008; CRAWFORD et al., 2010).

Zunächst erfolgt die Vorbereitung der Sequenzierungsbibliothek. Für die Sequenzierung von mRNA wird die gesamte RNA-Probe vorab einem Poly(A) Enrichment unterzogen. Dieser Schritt ist notwendig, da die RNA-Proben neben mRNA auch große Anteile nicht relevanter RNAs aufweisen, die störend auf die Sequenzierungstiefe wirken (RIO et al., 2010). Eine schematische Darstellung der Durchführung des Poly(A) Enrichments für die Sequenzierungsbibliothek ist in Abbildung 9 dargestellt. Während der Ligation binden die Adapter an beiden Enden des Stranges. Als „Library“ oder Sequenzierungsbibliothek werden die DNA Einzelstränge mit den gebundenen Adaptern bezeichnet (ILLUMINA INC., 2022b).

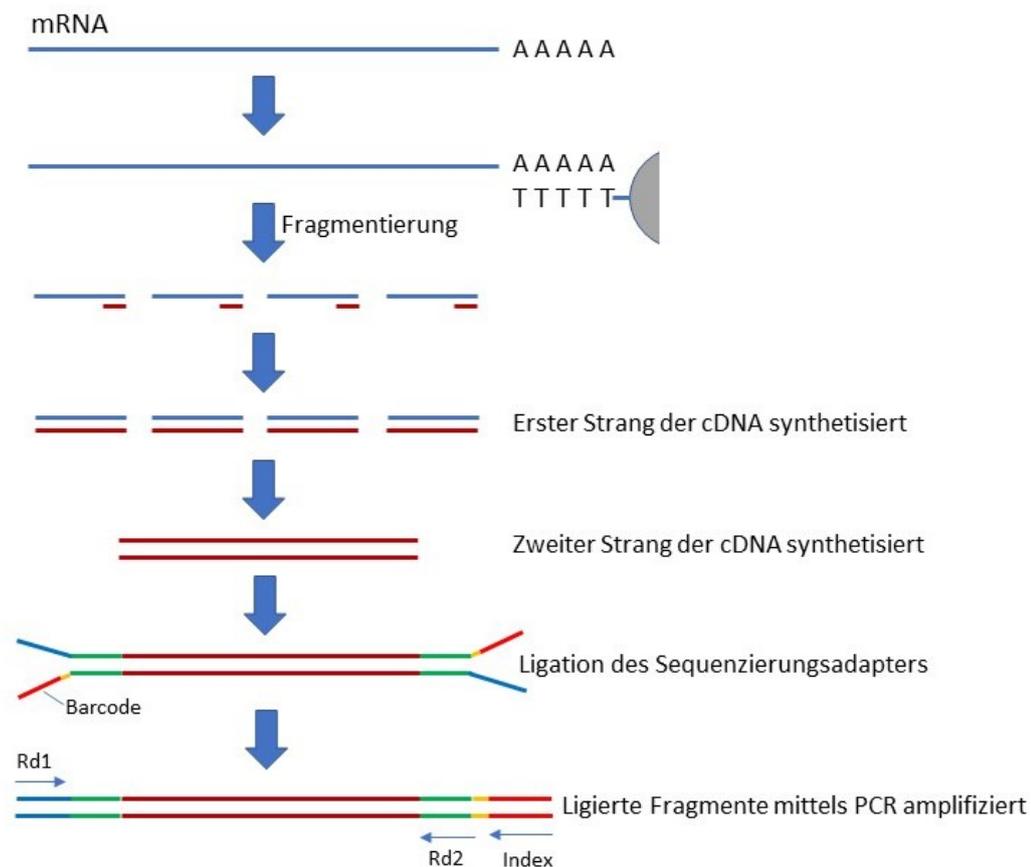


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Illumina Sequenzierungsbibliothek, die einem Poly(A) Enrichment unterzogen wurde; nach MICROSYNTH (2022).

Bei der Vorbereitung der cDNA Bibliothek werden Adapter an die Enden der fragmentierten cDNA ligiert. Das Ziel der Sequenzierungsbibliothek ist die Vorbereitung der Sequenzen, sodass sie an der Fließzelle binden können. Die Fließzelle ist eine Sequenzierungsplatte, auf der kurze DNA-Sequenzen aufgebracht sind, welche komplementär zu den Sequenzierungsadapters sind. Der Aufbau der Fließzelle hängt von dem zur Sequenzierung verwendeten Illuminagerät ab (ILLUMINA INC., 2022b).

Die erstellte Sequenzierungsbibliothek ist „stranded“, was bedeutet, dass die Stranginformationen der sequenzierten Moleküle beibehalten werden. Daraus resultiert eine zuverlässigere Quantifizierung der Genexpression im Vergleich zur „non-stranded“ RNA-Seq (ZHAO et al., 2015).

Alle Sequenzierungsgeräte von Illumina beruhen auf der SBS-Technologie. Je nach Sequenzierungsgerät wird die 4-Channel, 2-Channel oder 1-Channel SBS Chemistry verwendet. Die 4-Channel SBS Chemistry beruht auf der Detektion der

vier Basen, wobei jede der Basen eine eigene Fluoreszenzfärbung besitzt (Thymin \triangleq grün, Adenin \triangleq rot, Guanin \triangleq blau, Cytosin \triangleq gelb). Diese 4-Channel SBS Methode ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

Die 2-Channel SBS Chemistry verwendet nur zwei Fluoreszenzfarben für alle vier Basen. Thymin (T) erscheint in der Farbe grün oder blau (je nach Gerät), Cytosin (C) erscheint rot, Adenin (A) leuchtet mit beiden Farben und Guanin (G) erscheint dunkel, da es auf keine Farbe anspricht. Da nur zwei Farben detektiert werden, ist die Sequenzierungsdauer geringer. Die Anzahl der Bilder richtet sich für beide Methoden nach der Länge der Sequenz (hier 75 Bilder für 75 Basen) (ILLUMINA INC., 2022b).

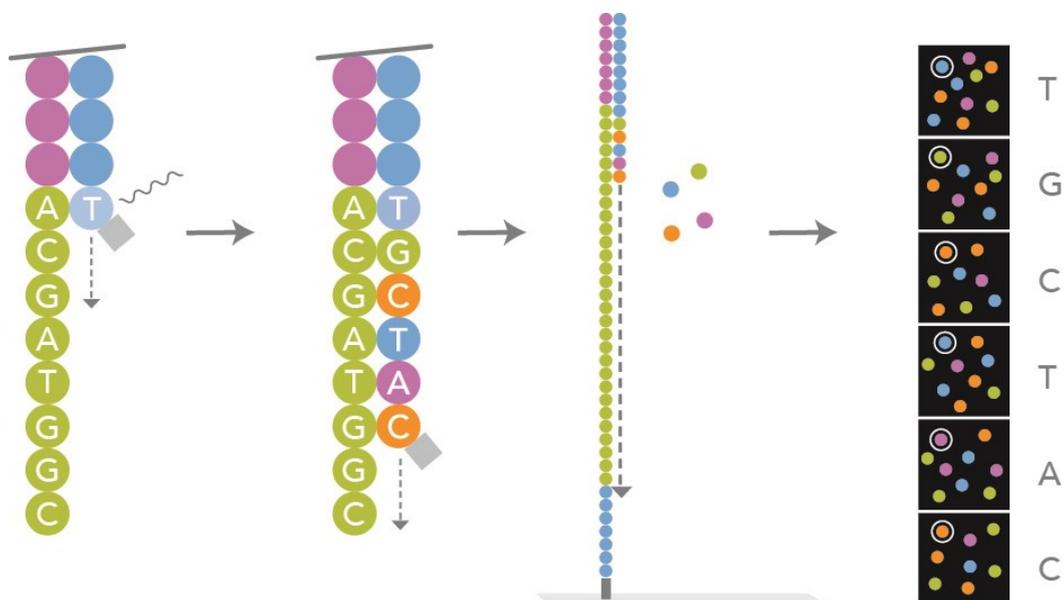


Abbildung 10: SBS Sequenzierung (ILLUMINA INC., 2022a).

Die SBS-Methode basiert auf einer Paired-End Sequenzierung. Hierbei wird die DNA zunächst von der einen Seite (Read 1) und schließlich von der anderen Seite (Read 2) sequenziert. Zwischen diesen beiden Sequenzierungen werden „Dual Index Reads – Reverse Complement“ vorgenommen. Durch Indices können die Proben nach dem Sequenzieren identifiziert werden (ILLUMINA INC., 2022b). Eine schematische Darstellung dieses Sequenzierungsablaufes kann Abbildung 11 entnommen werden.

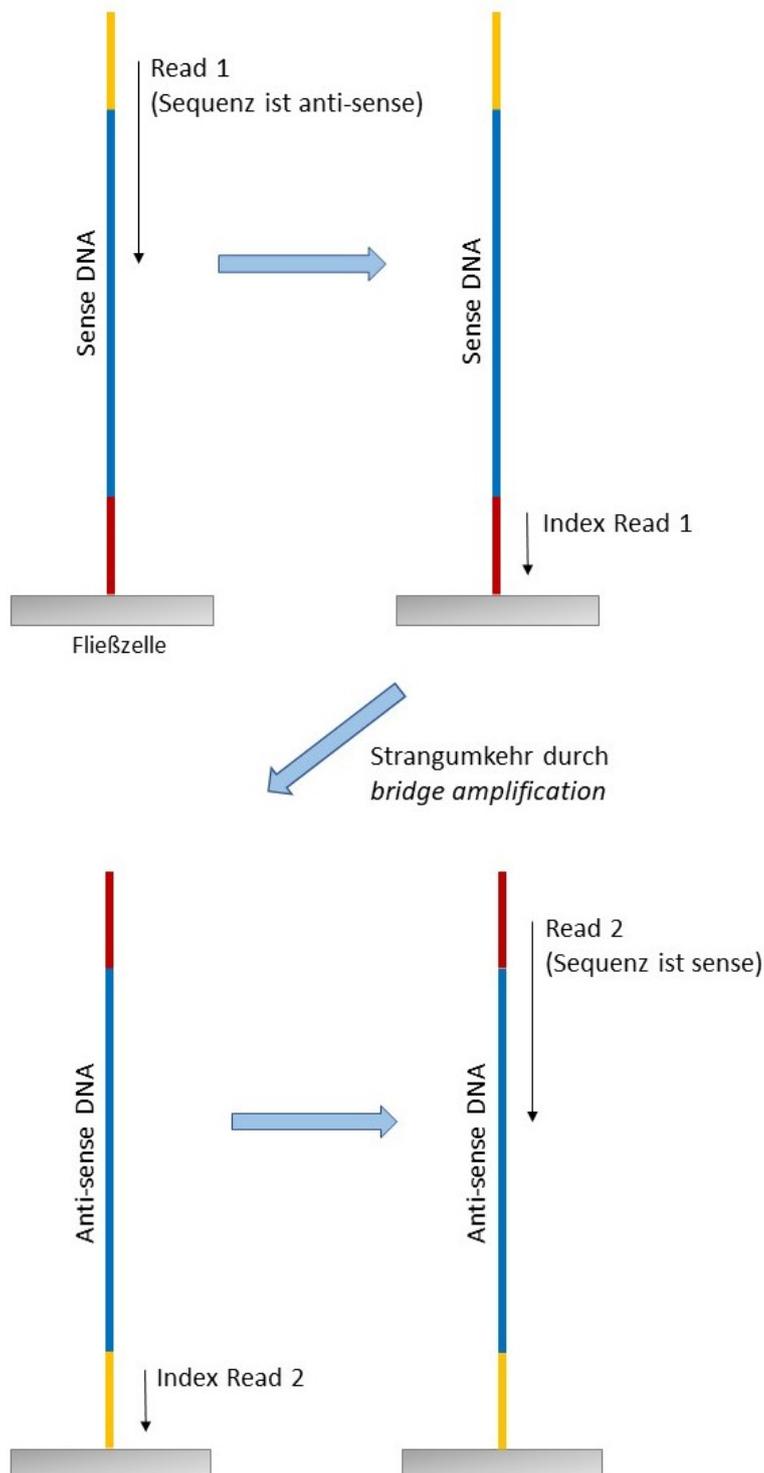


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Paired-End Sequenzierung mit Dual Index Reads – Reverse Complement; nach ILLUMINA INC. (2022b) und MICROSYNTH (2022).

Nach Auswertung der NGS-Datensätze wurde das sogenannte Hauptkomponentenverfahren durchgeführt. Das Hauptkomponentenverfahren, auf Englisch PCA (Principal Component Analysis), ist ein Verfahren der multivariaten

Statistik. Es strukturiert umfangreiche Datensätze durch Benutzung der Eigenvektoren der Kovarianzmatrix. Dadurch können Datensätze vereinfacht und veranschaulicht dargestellt werden. Eine Vielzahl statistischer Variablen wird durch eine geringere Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen, die sogenannten Hauptkomponenten, genähert (JOLLIFFE, 2011). Das Hauptkomponentenverfahren kann zur Darstellung von Gruppierungen einzelner Proben einer RNA-Sequenzierung verwendet werden. Die Anzahl der Dimensionen hängt von der Anzahl der Konditionen, der Anzahl der Replikate, sowie der Anzahl der Transkripte ab (JOLLIFFE, 2011).

5.2.2. Deep Resequencing Analyse

Die Daten der Deep Resequencing Analyse wurden ebenfalls mittels Illumina Next Generation Sequencing ermittelt. Die in Kapitel II.5.2.1 beschriebene Durchführung deckt sich in vielen Teilen, weshalb in diesem Abschnitt nicht mehr auf die Methode des NGS eingegangen wird.

Mit der Hilfe von Referenzgenomen lässt sich ein schnelleres und effektives Resequenzieren erreichen. Dabei werden vergleichsweise kurze Reads mit einem Referenzgenom verglichen, um innerhalb von Spezies genetische Variationen zu identifizieren (BENTLEY et al., 2008). Die theoretische oder erwartete Coverage ist die durchschnittliche Anzahl an Sequenzierungen eines Nukleotids. Man geht von einer bestimmten Anzahl an Reads mit bestimmter Länge aus und nimmt eine zufällige Verteilung in einem idealisierten Genom an (LANDER et al., 2001; SIMS et al., 2014). Die tatsächliche empirische per-base Coverage stellt die exakte Anzahl dar, mit der sich eine Base im Referenzgenom mit einem Read einer untersuchten Sequenz deckt. Die Redundanz der Coverage wird auch als Tiefe (englisch depth) oder Tiefe der Coverage bezeichnet (SIMS et al., 2014). In der Next Generation Sequenzierung ist die Coverage oft die durchschnittliche und unbearbeitete oder einem Alignment unterzogene Tiefe von Reads. Dies deutet auf die erwartete Coverage auf Basis der Anzahl und Länge von hoch qualitativen Reads - vor und nach dem Alignment - an ein Referenzgenom hin. Die Begriffe Tiefe und Coverage können zum einen als Synonym verwendet werden, zum anderen kann Coverage auch als Umfang der Abdeckung eines Zielgenoms bezeichnet werden. Dies ist ein Prozentanteil von Zielbasen, die mit einer gewissen Anzahl an Wiederholungen sequenziert werden (SIMS et al., 2014). Sequenzierungen erhöhen nicht nur das Verständnis von Genomsequenzen, sondern auch von Genomorganisation,

Genexpression, genetischen Variationen und diversen Aspekten der Transkriptomregulation (SIMS et al., 2014).

5.3. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein Verfahren, bei dem Moleküle in gasförmige Ionen umgewandelt werden, mittels Massen-/Ladeverhältnissen (m/z) aufgetrennt und gemessen werden. Ein dabei generiertes Massenspektrum zeigt auf der x-Achse das Massen-/Ladeverhältnissen (m/z) und auf der y-Achse die detektierten Ionen pro Zeiteinheit (hier: cps $\hat{=}$ counts per second) (MCLAFFERTY und TURECEK, 1995).

Je nach gemessener Substanz reicht der Massenbereich von weniger als 100 Dalton (Da) bis zu mehr als 100 kDa. Massenspektrometrische Verfahren dienen zum einen der Identifikation einzelner Moleküle und zum anderen der Quantifizierung dieser Moleküle. Außerdem dienen sie der Generierung von Massenspektren, mit deren Hilfe beispielsweise die Identifikation von Mikroorganismen gelingt (LOTTSPREICH et al., 2012).

5.3.1. LC-MS/MS

Die LC-MS/MS ist ein Analyseverfahren, bei dem die Flüssigkeitschromatographie (LC) und die Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) kombiniert werden. Diese Methode dient dazu die Konzentration von niedermolekularen Analyten, wie z.B. von Mykotoxinen oder Arzneimitteln, in einer Probe nachzuweisen (LOTTSPREICH et al., 2012; EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2021).

Diese Methode kann unter anderem zur Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln verwendet werden (XAVIER und SCUSSEL, 2008; GOTTSCHALK, 2009; SULYOK et al., 2010). Die LC-MS/MS wurde in verschiedenen Studien zum Nachweis von makrozyklischen Trichothecenen in Umwelt- und Futtermittelproben herangezogen (GOTTSCHALK et al., 2006; BLOOM et al., 2007; LANIER et al., 2012; ALEKSIC et al., 2017; JAGELS et al., 2020; ULRICH et al., 2021). Zudem wurden so *Stachybotrys* spp., welche auf verschiedenen Medien angesetzt wurden, auf ihre Sekundärmetabolie überprüft (JAGELS et al., 2019; ULRICH und SCHÄFER, 2020).

Um die gewünschten Analyten aus einer Matrix zu extrahieren, gibt es unterschiedliche Herangehensweisen. In den meisten Fällen arbeitet man mit

organischen und anorganischen Lösungsmitteln, je nach chemischer Eigenschaft des Analyten. Am Ende der Extraktion besteht das Probenextrakt somit aus den Analyten und verschiedenen Lösungsmitteln, weshalb weitere Reinigungsschritte folgen (GOTTSCHALK, 2009; LOTTSPREICH et al., 2012).

Die gewünschten Analyten werden mit Hilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Maschine aufgetrennt. In der Ionenquelle des Massenspektrometers erfolgt unter hoher Spannung (Elektrospray-Ionisation, ESI) und Temperatur die Überführung in die Gasphase und die darauffolgende Ionisierung. Es folgt die Auftrennung der Molekülonen anhand ihres Masse-/Ladungs-Verhältnisses (MCLAFFERTY und TURECEK, 1995).

Ein Tandemmassenspektrometer ist aus drei Quadrupolen und vier parallellaufenden Stabelektroden aufgebaut. Der erste Quadrupol dient der Selektion der ionisierten Zielmoleküle, auf Englisch „precursor ions“ genannt. Die Selektion erfolgt anhand des Masse-/Ladungs-Verhältnisses. Im zweiten Quadrupol wird das selektierte Mutterion in Tochterionen, den „product ions“, fragmentiert (LOTTSPREICH et al., 2012). Im dritten Quadrupol werden zwei spezifische Fragmente mit spezifischen Massen selektiert, die schließlich einen elektronisch messbaren Ausschlag (Peak) zu einer bestimmten Retentionszeit bewirken. (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2002). Aufgrund der spezifischen Retentionszeit eines Fragmentions und der Peakfläche im dazugehörigen Chromatogramm ist die hochspezifische Identifizierung einer Substanz gegeben (MCLAFFERTY und TURECEK, 1995; LOTTSPREICH et al., 2012).

5.4. Zellkultur und Zytotoxizitätstest mit *S. chartarum*

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde erstmals von Versuchen berichtet, bei denen Gewebe oder Organe in vitro kultiviert wurden – der Beginn der Untersuchungen mit Hilfe von Zellkulturen (CARREL, 1912). Je nachdem von welchem Gewebe oder Organ die Zellen abstammen, wächst die Zellkultur adhärent oder in Suspension (FRESHNEY, 2015). Adhärente Zelllinien bilden entweder einlagige, zusammenhängende Zellschichten (Monolayer) oder einen dreidimensionalen Multilayer. Diese Zelllinien wachsen auf einem Substrat, von welchem sie für die Subkultur wieder abgelöst werden müssen (LINDL und GSTRUNTHALER, 2008; FRESHNEY, 2015).

Die Zellkultur ermöglicht den Einsatz in verschiedenen Bereichen der Forschung.

Dazu zählt die Erforschung der Funktion der Zellen und spezifischer Zell-zu-Zell-Interaktionen (CHO et al., 2008). Die Zellkultur dient zudem dem Wachstum verschiedener Viren zur Produktion von Impfstoffen (ZHU, 2012). Überdies können mittels Zellkultur neue Erkenntnisse über die Wirkung verschiedener Chemikalien oder Toxine auf unterschiedliche Zelllinien gewonnen werden und die Technik kann somit als unspezifischer Zytotoxizitätstest eingesetzt werden (SUNG et al., 2014). Ein großer Vorteil der Zellkultur ist außerdem, dass so die Häufigkeit von Tierversuchen im Rahmen von Toxizitätstests reduziert werden kann (ANDERSEN et al., 2010).

Eine schnelle und einfache Methode um die Viabilität von Zellen zu überprüfen ist die Färbung mit Trypanblau (STROBER, 2015). Der dunkelblaue Farbstoff wird von perforierten und toten Zellen aufgenommen. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff in der Regel nicht auf. Es kann jedoch vorkommen, dass Zellmembranschäden wieder repariert werden, wodurch die Zelle wieder vital wird (STROBER, 2015). Falls eine Zelle mit intakter Zellmembran den Farbstoff nicht aufnimmt, kann dadurch jedoch nicht automatisch auf die Funktionstüchtigkeit der Organellen im Zellinneren geschlossen werden (STROBER, 2015).

Eine weitere Methode, die in der Arbeit mit Zellkulturen verwendet wird, ist die Färbung der Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid (PI). Die Färbung mit Annexin V und PI ermöglicht die Unterscheidung der Art des Zelltodes einer Zelle (Apoptose oder Nekrose) (VERMES et al., 1995). Annexin V bindet an das Phospholipid Phosphatidylserin (PS), welches sich normalerweise nur in der inneren Schicht der Zellmembran, in Richtung des Cytoplasmas zeigend, befindet. In frühen Phasen der Apoptose, dem programmierten Zelltod, wendet sich das PS jedoch auf die äußere Seite der Zellmembran (MARTIN et al., 1995) und wird dadurch für das außen zugesetzte Annexin V zugänglich. Die zweite Substanz, PI, hat die Fähigkeit an DNA zu binden, kann jedoch nur in die Zelle eindringen, wenn die Zellmembran zerstört wurde und somit durchlässig ist. Die Anfärbung der Zellen mit PI kann somit für Nekrose und spätere Phasen der Apoptose sprechen (VINDELØV und CHRISTENSEN, 1990; RISS et al., 2004).

In der Literatur sind eine Reihe von Studien beschrieben, die mit *S. chartarum* und dessen Sekundärmetaboliten durchgeführt wurden, wodurch unterschiedliche gesundheitsschädliche Auswirkungen von *S. chartarum* festgestellt werden konnten. ISLAM et al. (2009) führten in vitro Untersuchungen an neuronalen

Zelllinien durch und konnten die Zytotoxizität von Satratoxin G nachweisen. Die von *S. chartarum* gebildeten makrozyklischen Trichothecene interagieren mit eukaryotischen Ribosomen, indem sie die Initiation oder Elongation von Polypeptidketten unterbinden (HERNANDEZ und CANNON, 1982; BAMBURG, 1983; UENO, 1983). Zudem wird eine intrazelluläre Stressantwort induziert und kann zur Erhöhung von Entzündungsmediatoren oder sogar bis zur Apoptose der Zellen führen (CHUNG et al., 2003b; PESTKA et al., 2008).

Ein Test der zur Beurteilung der metabolischen Aktivität von Zellen verwendet werden kann, ist der MTT- (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Zellkulturtest. Hierbei wird der gelbe Farbstoff Tetrazoliumsalz in ein blau-violettes Formazan reduziert (ALTMAN, 1976). Der Grad der Reduktion und somit des Farbumschlages hängt von der Viabilität der untersuchten Zellen ab, je vitaler die Zellen sind, desto stärker ist der Farbumschlag (MOSMANN, 1983; GERLIER und THOMASSET, 1986). Mit Hilfe des MTT-Tests konnte die Zytotoxizität von verschiedenen Umweltproben, die mit *S. chartarum* kontaminiert waren, bewiesen werden. Nach Inkubation mit einem Extrakt wird der Grad der Zellschädigung durch die Stärke des Farbumschlages und durch Errechnen des IC_{50} -Wertes ermittelt. Je zelltoxischer ein Extrakt ist, desto geringer fällt der IC_{50} -Wert aus (GAREIS, 1994; HANELT et al., 1994; GAREIS, 2006). Der IC_{50} -Wert zeigt die Toxinkonzentration an, bei der die Bildung von Formazan gegenüber dem Kontrollansatz um 50 % reduziert ist (CHENG und PRUSOFF, 1973). Die IC_{50} -Werte der untersuchten makrozyklischen Trichothecene liegen zwischen 0,005 $\mu\text{g/ml}$ und 0,007 $\mu\text{g/ml}$, wohingegen Deoxynivalenol einen IC_{50} -Wert von 17,0 $\mu\text{g/ml}$ und T-2 Toxin von 0,02 $\mu\text{g/ml}$ aufwies (UENO, 1983; YOSHIZAWA et al., 1986; GAREIS, 2006).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Allgemein

1.1. Verwendete Materialien und Geräte

1.1.1. Anzucht

- Aqua dest.
- Bunsenbrenner Gasprofi [WLD-Tec (Göttingen) Art.Nr. 6.007.000]
- Glycerin [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 37831]
- Horizontalschüttler, Typ 3005 [GFL (Burgwedel), Art.Nr. 10561614E]
- Impflanzette [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 631-7121 N]
- Impföse [VWR (Darmstadt), Art.Nr. SCUT3686232]
- Impfösenhalter Aluminium mit PVC 150 mm [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 612-2683]
- Kanüle, Sterican® Gr. 1, gelb [B. Braun (Melsungen), Art.Nr. 4657519]
- Lichtmikroskop Leica DMIL LED [Leitz (Stuttgart), Art.Nr. MIC5252]
- Microbank™ Röhrchen [Pro-Lab Diagnostics (Round Rock), Art.Nr. 11929054]
- Mikroskop Axiostar plus [Carl Zeiss (Jena) Art.Nr. 10716153]
- Objektträger 76 x 26 mm, geputzt/Mattrand [Menzel (Braunschweig), Art.Nr. 021102]
- Petrischalen Greiner Ø 94 mm [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 391-3662]
- Pipettenspitzen EP Dualfilter T.I.P.S. 200 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3685]
- Skalpell [B. Braun (Melsungen), Art.Nr. 5518083]
- Pepton [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 107228]

1.1.2. Isolierung chromosomaler DNA für PCR

- Ethanol [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 9065.1]
- Isopropanol [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 9718.2]
- Lysing Matrix A, 2 ml tube [MP Biomedicals (Eschwege), Art.Nr. 6910600]
- Masterpure™ Yeast DNA Purification Kit [Lucigen, Biosearch Technologies (Wisconsin), Art.Nr. MPY80200]
- MP Biomedicals™ FastPrep-24™ 5G [MP Biomedicals (Eschwege), Art.Nr. 12079310]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.024]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 100-1000 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.024]

- 4910000.083]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 10-100 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.059]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3681]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3685]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 50-1000 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3687]
- PureLink™ RNase A [ThermoFisher Scientific™ (Waltham), Art.Nr. 1383185]
- Reaktionsgefäße 1,5 ml [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 0030120.094]
- Skalpell [B. Braun (Melsungen), Art.Nr. 5518083]
- Thermomixer comfort [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 2985]
- Vortex-Genie® 2 Shaker [Scientific Industries, Inc. (New York) Art-Nr. SI-0236]
- Zentrifuge [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. EP5427000015]

1.1.3. Konzentrationsmessung von DNA und RNA

- Aqua dest.
- NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spektrophotometer (ThermoFisher Scientific™(Waltham), Art.Nr. IC 14441)
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.024]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3681]

1.1.4. Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese

- 1 x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer [Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. 1.06174.1000]
- 1kb DNA-Marker [New England Biolabs (Ipswich), Art.Nr. N3232S]
- 100 bp DNA-Marker [New England Biolabs (Ipswich), Art.Nr. N3231S]
- Agarose Standard, Roti®garose [Bio-Rad (München), Art.Nr. 1613101]
- Formamid [Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. 47671]
- Gelelektrophoresekammer, horizontal [VWR (Darmstadt), Art.Nr. 401515]
- GelRed® Nucleic Acid Gel Stain [Biotium (Fremont), Art.Nr. 41003]
- Loading dye 6x [ThermoFisher Scientific™ (Waltham), Art.Nr. R0611]
- Mastercycler® pro [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 11874001]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.024]

- Pipette „Eppendorf Reference“ 10-100 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.059]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3681]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3685]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 50-1000 µl [Eppendorf, Art.Nr. 613-3687]
- Reaktionsgefäße 1,5 ml [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 0030120.094]
- Taq CORE Kit 10 [MP Biomedicals (Eschwege), Art.Nr. 11417040]
- *Tm Calculator* [New England Biolabs]
- UV-Transilluminator UVP GelStudio [Analytik Jena (Jena), Art.Nr. 849-97-0852-02]

1.1.5. Isolierung chromosomaler DNA für Deep Resequencing Analyse

- 50 ml Falcon [Sarstedt™ (Nümbrecht), Art.Nr. 10535253]
- Aqua dest.
- Cetyltrimethylammoniumbromid (Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 9161]
- Chloroform [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 1888]
- Glasperlen steril 4 mm Ø [Bio-Spec Products (Karlsruhe), Art.Nr. 11079105]
- Isopropanol [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 9718.2]
- Thermomixer comfort [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 2985]
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. A411.3]
- Vortex-Genie® 2 Shaker (Scientific Industries, Inc., New York) SKU: SI-0236

1.1.6. Isolierung von mRNA

- Dithiothreitol [ThermoFisher Scientific™(Waltham), Art.Nr. 10578170]
- Ethanol [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 9065.1]
- FastPrep-24™ 5G [MP Biomedicals™ (Eschwege) Art.Nr. 15260488]
- InnuPREP Plant RNA Kit [Analytik Jena (Jena), Art.Nr. 845-KS-2060050]
- Kit DNase Behandlung Kit [Analytik Jena (Jena), Art.Nr. 845-KS-5200050]
- Lysing Matrix A, 2 ml tube, SKU: 116910050-CF, MP Biomedicals
- Pipette „Eppendorf Reference“ 0,5-10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.024]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 100-1000 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.083]

- Pipette „Eppendorf Reference“ 10-100 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.059]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 10 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3681]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3685]
- PureLink™ RNase A [ThermoFisher Scientific™ (Waltham), Art.Nr. 1383185]
- Skalpell [B. Braun (Melsungen), Art.Nr. 5518083]

1.1.7. Zellbiologische Methoden

- Epifluoreszenzmikroskop Leica DM 5000B [Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch), Art.Nr. 298931]
- Kamera Leica DFC 3000G [Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch), Art.Nr. 106094917]
- Lichtmikroskop Leica DMIL LED [Leitz (Stuttgart), Art.Nr. MIC5252]
- Minimum Essential Medium (MEM 1X) [ThermoFisher Scientific™ (Waltham), Art.Nr. 15188319]
- Zellkulturflasche, TC-Flasche T75, Standard (Sarstedt™ (Nümbrecht), Art.Nr. 83.3910.002]

1.1.8. Zytotoxizitätstest mittels Zellkultur

- 15 ml Falcon [Sarstedt™ (Nümbrecht), Art.Nr. 50-809-220]
- 50 ml Falcon [Sarstedt™ (Nümbrecht), Art.Nr. 10535253]
- CryoPure Gefäß [Sarstedt™ (Nümbrecht), Art.Nr. 20010132]
- DMSO [Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. D8779]
- Fetal Bovine Serum [ThermoFisher Scientific™ (Waltham), Art.Nr. 11533387]
- MEM Non-essential Amino Acid Solution (100X) (Sigma-Aldrich, (Taufkirchen), Art.Nr. 32160406]
- Minimum Essential Medium (MEM 1X) [ThermoFisher Scientific™ (Waltham), Art.Nr. 15188319]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 100-1000 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.083]
- Pipette „Eppendorf Reference“ 10-100 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 4910000.059]
- Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 200 µl [Eppendorf (Hamburg), Art.Nr. 613-3685]
- TC-Platte 96 Well, Standard F [Sarstedt™ (Nümbrecht), Art.Nr. 83.3924]
- Trypanblau [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. CN76]

- Trypsin-EDTA-Lösung [Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. MFCD00130286]
- Zellkulturflasche, TC-Flasche T75, Standard [Sarstedt™ (Nümbrecht), Art.Nr. 83.3910.002]

1.1.9. Toxinextraktion

- Acetonitril [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 8825.2]
- Methanol ROTIPURAN® >99,9 % [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 4627.1]
- Original-Langkorn-Reis [Ben's Original™ (Visé), Art.Nr. 7390947]
- Papierfilter Whatman™, 595 ½, Durchmesser 185 mm [GE Healthcare (Buckinghamshire) Art.Nr. 10311647]
- SPE Säulen Strata™-X 33µm Polymeric Reversed-Phase 500 mg/6 ml [Phenomenex (Aschaffenburg), Art.Nr. 8B-S100-TBJ]
- Stomacher® 80 microBiomaster [Seward Limited (Worthing), Art.Nr. 11701477]
- Stomacher® 80, BA6040 closure bags (Seward Limited (Worthing), Art.Nr. BA6040/CLR)
- Visiprep™ SPE Vakuumverteiler [Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. 57044]
- Wasser, HiPerSolv CHROMANORM® für die HPLC [VWR International GmbH (Darmstadt), Art.Nr. 601-006-00-1]

1.1.10. Färbung mit Annexin V-FITC Kit

- Annexin V-FITC Kit [Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach), Art.Nr. 5130930482]
- Propidiumiodid [ThermoFisher Scientific™ (Waltham), Art.Nr. 541.465.8300]
- TC-Platte 24 Well, Standard, F Gefäß [Sarstedt™ (Nümbrecht), Art.Nr. 4038917338523]

1.1.11. Zellkulturtest mit Toxinstandards

- Satratoxin G [Cayman Chemicals (Michigan), Art.Nr. Cay9003415-5]
- Satratoxin H [Cayman Chemicals (Michigan), Art.Nr. Cay30199-5]
- Roridin L2 [Cayman Chemicals (Michigan), Art.Nr. Cay27374-5]
- Zellkulturflasche, TC-Flasche T75, Standard [Sarstedt™ (Nümbrecht), Art.Nr. 83.3910.002]
- Minimum Essential Medium (MEM 1X) [ThermoFisher Scientific™ (Waltham), Art.Nr. 15188319]

1.1.12. LC-MS/MS

- QTRAP 5500 Tandemmassenspektrometer [AB Sciex (Framingham), Art.Nr. 25088069091]
- Stickstoffverdampfer Evaporator, puriVap-6™ [Interchim® (Montluçon), Art.Nr. AWZ5R0]
- Millex® 0.20µm PTFE Membranfilter [Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. 32031690]
- Kinetex C18 100x2.1mm, 2.6µm [Phenomenex (Torrance), Art.Nr. 00A-4461-AN]

1.2. *Stachybotrys* Isolate

Es wurden vier Isolate von *S. chartarum* für eine Transkriptom-, LC-MS/MS und Deep Resequencing Analyse ausgewählt. Jeweils eines dieser Isolate war ein Genotyp S, ein Genotyp A und bei zwei Isolaten handelte es sich um Genotyp H (siehe Tabelle 7). Alle Isolate wurden bis zu ihrer Anzucht in gepuffertem Peptonwasser (+ 10 % Glycerin) bei -80 °C gelagert (NIESSEN und VOGEL, 2010). Die oben genannten Isolate wurden mittels einer Triplex-PCR nach ULRICH et al. (2020) in ihrer Identität bestätigt (siehe IV.2).

Tabelle 7: Verwendete *Stachybotrys* Isolate ($n = 4$) für Transkriptom-, LC-MS/MS und Deep Resequencing Analyse und ihre Herkunft

<i>Stachybotrys</i> (<i>S.</i>) spp.	Land	Herkunft	Bezugsquelle / Referenznummer	Genotyp*
<i>S. chartarum</i>	USA	Baumaterial	IBT**/40293	S
<i>S. chartarum</i>	n.b.	n.b.	IBT**/42685	H
<i>S. chartarum</i>	Niederlande	Innenraum	CBS***/324.65	H
<i>S. chartarum</i>	Dänemark	Baumaterial	IBT**/40288	A

* Triplex-PCR nach ULRICH et al. (2020)

** BioCentrum der Technischen Universität Dänemark (DTU, Lyngby)

*** Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Niederlande

n.b. nicht bekannt

Die Isolate, die für weitere Genomuntersuchungen herangezogen wurden, sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Isolate ($n = 8$) von *S. chartarum* für PCRs und ihre Herkunft

Land	Herkunft	Bezugsquelle / Referenznummer	Genotyp*
USA	Baumaterial	IBT ^a / 40293	S
Ungarn	Hafer	ATCC ^b / 34916	S
Finnland	Gips	DSM ^c / 12880	S
UK	Baumwollstoff	DSM ^c / 2144	S
n.b.	n.b.	IBT ^a / 42685	H
Dänemark	Baumaterial	IBT ^a / 40288	A
n.b.	n.b.	CBS ^d / 129.13	A
Deutschland	Innenraum	MS ^e / 1	A

^a BioCentrum der Technischen Universität Dänemark (DTU, Lyngby)

^b American Type Culture Collection, USA

^c German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Deutschland

^d Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Niederlande

^e Stammsammlung des Lehrstuhls für Bakteriologie und Mykologie der Tierärztlichen Fakultät, LMU München

n.b. nicht bekannt

* bestimmt durch Triplex-PCR nach ULRICH et al. (2020)

1.3. Oligonukleotide

In Tabelle 9 sind die verwendeten Oligonukleotide, ihre Basenpaarlänge und deren Schmelztemperatur für eine Triplex-PCR aufgeführt.

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide für Triplex-PCR nach ULRICH et al. (2020)

Gen- abschnitt	Bezeichnung	Sequenz	Erwartete bp ^c -Länge	Tm ^d in C°
<i>sat</i> ^a 19	SAT19-Stype-f	ACTCTGAAATCTTC CGCTAC	346	58.0- 59.0
	SAT19-Stype-r	ATTAGTCCAAGACA CGGAAC		
<i>atr</i> ^b 4	ATR4-1chloro-f	GTTGCTACCCGAAT CATCA	544	59.0
	ATR4-1chloro-r	CACTCTTGAAAGCT GAGTCT		
<i>atr</i> ^b 6	ATR6-7Atype-f	AAGTCCATCCTTTG TGA CTC	230	59.0
	ATR6-7Atype-r	GAATCTTGCTGAAC TTGCTC		

^a Satratoxingen^b Atranongen^c Basenpaar^d Schmelztemperatur

In Tabelle 10 sind die verwendeten Oligonukleotide für die PCR im Bereich downstream von SC1 aufgeführt. Diese Primer liegen im ersten Gen downstream von SC1. Dieses Gen wird in dieser Arbeit SC1-down-1 bezeichnet. Mittels dieser PCR kann man überprüfen, welche Stämme das komplette SC1-down-1 oder lediglich eine trunkierte Teilsequenz davon besitzen.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide für PCR im Bereich downstream von SC1

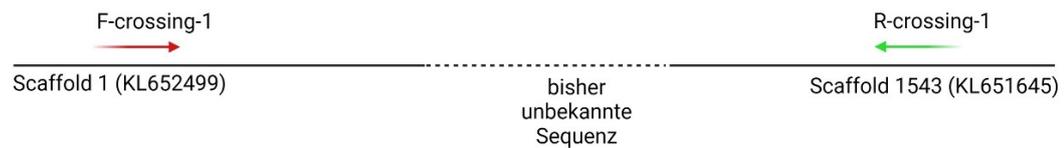
Bezeichnung	Sequenz
A-gen1-F	GCG GGC ACC AGG TGG GC
A-gen1-R	GAG TAC TCC ATC AAG TCC ATC CG
S-gen1-F	ACA TAT CCT CAT GCC TGC AGA

Im Folgenden sind die beiden Primer und deren Sequenz angegeben, welche für die PCR im Übergang zwischen den beiden Scaffolds 1 und 1543 von IBT 40293 verwendet wurden (siehe Tabelle 11). Eine schematische Abbildung der Scaffolds mit eingezeichneten Primern ist in Abbildung 12 dargestellt.

Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide für PCR im Übergang zwischen Scaffold 1 und Scaffold 1543 von IBT 40293

Bezeichnung	Sequenz
F-crossing-1	AGT GCT GAT GGC AGG CGG CTA GCT CGA TCA
R-crossing-1	CAA TGT GAC TAT AGA GCC GAC CAG GGT GTT GG

S. chartarum IBT 40293

**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Randbereiche der Scaffolds 1 und 1543 von IBT 40293 (S) mit den Positionen der beiden Primer (roter und grüner Pfeil)

1.4. Zelllinie

Bei der verwendeten Zellart für die Zytotoxizitätstests handelt es sich um PK15-Zellen. Dies sind kanzeröse Schweinenierenzellen (Porzine-Kidney-Zellen) vom epithelialen Typ. Diese Zellen haben die Fähigkeit zur Adhärenz und Ausbildung von Zellrasen. Die Zellen wurden vom Lehrstuhl für Virologie der Tierärztlichen Fakultät, LMU München zur Verfügung gestellt.

1.5. Erstellung von Graphiken

Die Abbildungen der chemischen Strukturen der Toxine wurden mithilfe von ChemDraw (Version 20.0.0.38, PerkinElmer Informatics, Inc.) erstellt. Die Erstellung von Abbildungen und Graphiken erfolgte durch die Anwendung von Vorlagen auf BioRender.com (<https://app.biorender.com/biorender-templates>). Zum anderen erfolgte die Erstellung von Abbildungen durch die Anwendung von Adobe Photoshop und PowerPoint (Microsoft Office Professional Plus 2019).

2. Mykologische Methoden

2.1. Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien und ihre Zusammensetzung lassen sich aus Tabelle 12 entnehmen. Im weiteren Verlauf werden die Nährmedien abgekürzt (PDA, MEA oder SNA) genannt.

Tabelle 12: Verwendete Nährmedien

Nährmedium	Mischverhältnis/Bezugsquelle
Potato Dextrose Agar (PDA)	Fertigmischung 39,0 g, Aqua dest. ad 1000 ml [Merck Millipore (Burlington) Art.Nr. 110130]
Malzextraktagar (MEA)	Fertigmischung 48,0 g, Aqua dest. ad 1000 ml [Merck (Darmstadt), Art.Nr. 105398]
Synthetischer Nährstoffarmer Agar (SNA)	Zusammensetzung in Gramm pro 1 Liter Nährmedium: <ul style="list-style-type: none"> • Glucose 0,2 [Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. G7021] • Saccharose 0,2 [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 9097.1] • Kaliumdihydrogenphosphat 1,0 [Carl Roth (Karlsruhe), 3904.1] • Kaliumnitrat 1,0 [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. A136.1] • Magnesiumsulfat, wasserfrei 0,25 [Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. M7899] • Kaliumchlorid 0,5; [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 6781.3] • Agar 14,0 [Carl Roth (Karlsruhe), Art.Nr. 64943] • Gesamtmenge 7,2 pH-Wert des fertigen Mediums bei 25 °C: 5,4 ± 0,2

2.2. Anzucht

Zum Auftauen und Rekultivieren wurde ein eingefrorenes Myzelteil entnommen und auf MEA rekultiviert. Die Pilzkulturen wurden im Brutschrank bei 25 °C und 0,89 a_w bei Dunkelheit für mindestens 14 Tage inkubiert.

Nach 14 Tagen wurde mit einer Impflanzette Pilzmaterial entnommen und mittels Dreipunktkultur auf eine Petrischale mit PDA aufgetragen. Bei der Dreipunktkultur wird mit Hilfe einer Schablone an drei Stellen Pilzmaterial aufgetragen, sodass in gleichmäßigem Abstand drei einzelne Pilzkolonien wachsen können (SAMSON, 2010). Die Pilzkulturen wurden für 14 Tage im Brutschrank bei 25 °C und 0,89 a_w bei Dunkelheit inkubiert.

2.2.1. Erstellung von Einsporisolaten

Um sicher zu gehen, dass eine Reinheit der vorliegenden Kulturen besteht, wurden Einsporisolate von den Stämmen erstellt, die anschließend für die Transkriptomanalyse sowie das Deep Resequencing benötigt wurden.

Auf einen Objektträger wurden je zwei Tropfen á 20 µl Aqua dest. aufgetragen. Mit einer 1 µl Impföse wurden einige Sporen von einem zuvor beimpften PDA (siehe III.2.2) abgekratzt und im ersten Tropfen verteilt. Diese Impföse wurde in einem breiten Abstand auf einer SNA Platte ausgestrichen. Danach wurde die Impföse zunächst in den ersten Tropfen mit Pilzmaterial gehalten und anschließend mit dem zweiten Tropfen vermischt, wodurch eine Verdünnung der Sporensuspension entstand. Wie oben bereits beschrieben, wurde die Impföse aus dem zweiten Tropfen nun in breitem Abstand auf einer zweiten SNA Platte ausgestrichen (siehe Abbildung 13). Die SNA Platten wurden für 24 Stunden bei 25 °C und 0,89 a_w bei Dunkelheit bebrütet.

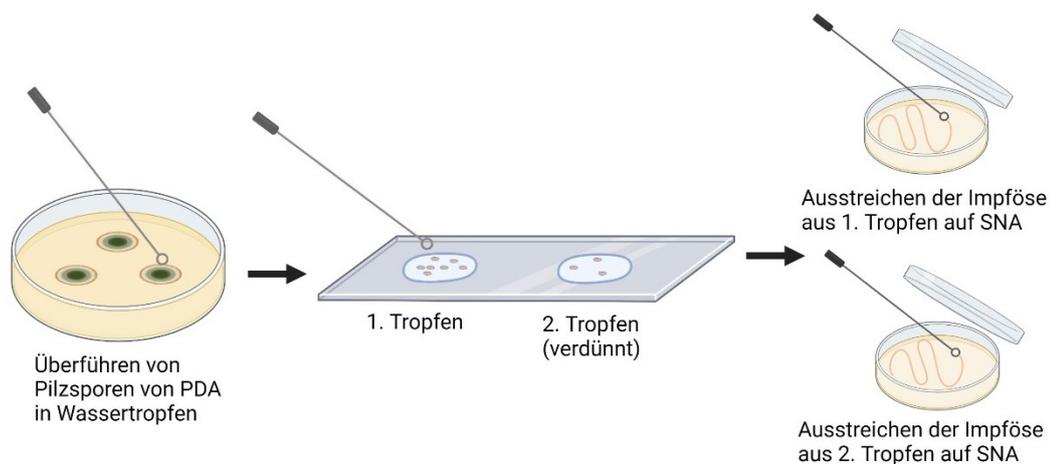


Abbildung 13: Arbeitsablauf zur Erstellung von Einsporisolaten – Überführen von Pilzsporen auf SNA.

Nach 24 Stunden waren die Sporen sporuliert, sodass diese unter dem Mikroskop „gepickt“ werden konnten. Hierfür wurde die Agarplatte bei vierfacher Vergrößerung umgedreht unter das Mikroskop gelegt. Es wurde nahe der Furche, die die Impföse auf der Agarplatte verursacht hatte, nach einzeln gelegenen Sporen gesucht. Sobald eine passende Spore gefunden wurde, wurde der Lichtkegel des Mikroskops verkleinert und die Position der Spore mittels eines Folienstiftes markiert. Eine 200 µl Pipettenspitze wurde mit Hilfe eines Skalpellts soweit abgeschnitten, dass der Durchmesser etwa 2 mm betrug. Die Pipettenspitze wurde senkrecht gehalten, sodass die Spore markiert und ansatzweise ausgestanzt werden

konnte. Dabei war es wichtig, dass der Agar möglichst nicht komplett ausgestanzt wurde und sich am Ende nicht in der Kanüle befand. Zur Kontrolle, ob die Spore getroffen wurde, wurde die Agarplatte erneut umgedreht und unter dem Mikroskop bei vierfacher Vergrößerung angeschaut. Wenn sich die Spore genau in der Mitte des Stanzlochs befand, wurde dieses mit einer sterilen Kanüle herausgenommen und umgedreht in die Mitte auf einen PDA gelegt (Arbeitsablauf ist in Abbildung 14 dargestellt).

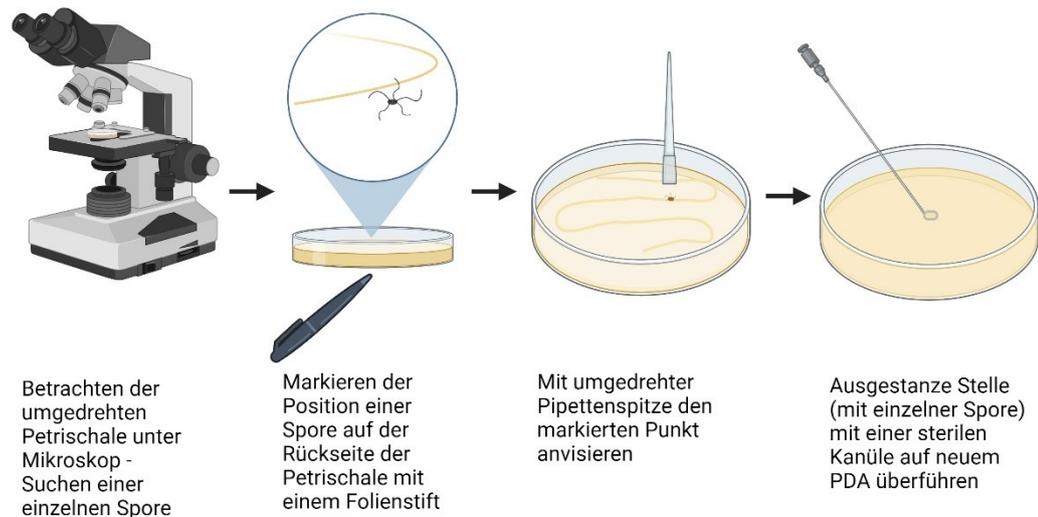


Abbildung 14: Arbeitsablauf zur Erstellung von Einsporisolaten – „Picken“ einzelner Sporen.

Die beimpfte Platte wurde je nach Verwendung, für zehn bis 21 Tage bei 25 °C und 0,89 a_w bei Dunkelheit im Brutschrank inkubiert.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1. Isolierung chromosomaler DNA

Zur DNA-Extraktion und der darauffolgenden PCR wurden die Kulturen der Einsporisolate verwendet. So konnte die Reinheit einer jeden Pilzkultur sichergestellt werden. Die Extraktion chromosomaler DNA wurde mit Hilfe des MasterPure Yeast DNA Purification Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Isolierung erfolgte zunächst die Erstellung eines Einsporisolates (siehe III.2.2.1), welches auf PDA für zehn Tage bei 25 °C und 0,89 a_w bei Dunkelheit inkubiert wurde. Es erfolgte eine Isolierung der gewünschten Stämme indem mittels einer sterilen 1 ml Pipettenspitze ein Teil des Pilzmyzels herausgestanzt wurde. Der überschüssige Agar wurde mit einem sterilen Skalpell entfernt. Das Myzel wurde

in ein DNA-Lysing Matrix Röhrchen überführt, welchem zuvor 225 µl Yeast Cell Lysis Buffer zugegeben wurde. Das Pilzmyzel wurde durch Bearbeitung im MP Biomedicals™ FastPrep-24™ 5G für 40 s bei 6 m/s mechanisch aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 65 °C in einem Heizblock inkubiert. Danach erfolgte für 5 min eine Abkühlung der Proben auf Eis. Nach Zugabe von 112,5 µl MCP Protein Precipitation Reagent und dem Vermischen der Probe mit Hilfe eines Vortexmischers für 10 s, wurde die Probe für 10 min bei 10.600 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, in welches 375 µl Isopropanol hinzugegeben wurden. Indem das Reaktionsgefäß verschlossen und mehrmals invertiert wurde, fiel die DNA aus. Nach erneutem Abzentrifugieren für 15 min bei 17.900 g wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Zum Ansatz wurden 500 µl eiskaltes Ethanol 70 % (H₂O / C₂H₆O, v/v) hinzugegeben, um die Probe zu waschen. Bei 4 °C und 17.900 g wurde die Probe erneut abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei geöffnetem Deckel für einige Minuten auf dem Heizblock bei 50 °C getrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl H₂O (mit RNase 1:500) gelöst. Die Probe wurde entweder bei -20 °C gelagert oder für die Durchführung einer PCR verwendet.

3.2. Konzentrationsmessung von DNA

Nach der Isolierung von DNA-Proben erfolgte die Messung der jeweiligen Konzentration mit dem NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spektrophotometer. Dieses Photometer misst zunächst einen Leerwert, hierfür wurde Aqua dest. verwendet. Die extrahierte DNA zeigt ein Absorptionsmaximum bei A₂₆₀ (260 nm). Zur Bestimmung der Reinheit wird auch der Wert A₂₈₀ (280 nm) gemessen, aus diesen Werten wird im Anschluss der A₂₆₀/A₂₈₀ Quotient berechnet (ARNEMANN, 2019).

3.3. Triplex-PCR

Es wurde eine Triplex-PCR nach ULRICH et al. (2020) durchgeführt, um die jeweiligen Genotypen der *Stachybotrys* Isolate zu bestätigen.

Die verwendeten Oligonukleotide sind unter Kapitel III.1.1, Tabelle 9 aufgelistet. In Tabelle 13 ist der Reaktionsansatz für die Triplex-PCR aufgeführt.

Tabelle 13: Reaktionsansatz (25 µl) für die Triplex-PCR

Stammlösung	µl/Ansatz
10X Puffer	2,5
dNTPs	0,5
<i>sat19f</i>	0,5
<i>sat19r</i>	0,5
<i>atr4f</i>	0,5
<i>atr4r</i>	0,5
<i>atr6f</i>	0,5
<i>atr6r</i>	0,5
Formamid	0,25
Taq Polymerase	0,3
DNA (50 ng/µl)	1,0
H ₂ O	17,45 (ad 25,00)

nDTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat

f: forward r: reverse

Die PCR wurde im Mastercycler[®] pro durchgeführt. In Tabelle 14 ist das durchgeführte Temperaturprogramm der Triplex-PCR aufgeführt. Die passende Temperatur für die Primer-Hybridisierung wurde mit dem Onlineprogramm *Tm Calculator* von New England Biolabs (Version 1.13.1) ermittelt.

Tabelle 14: Temperaturprogramm für Triplex-PCR

Schritt	Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
Initiale Denaturierung	1	94	4
Denaturierung	35	94	1
Annealing	35	61	1
Elongation	35	74	1
Finale Elongation	1	72	4

Im Anschluss des Temperaturprogrammes wurde die Probe für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet, die im folgenden Kapitel beschrieben wird.

3.4. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt. Die DNA-Moleküle werden hierbei nach ihrer Länge aufgetrennt. Es wurde eine Agarosekonzentration von 1 % in 1 x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (Verdünnung 1:50 (w/v)) für das Gel verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde neben der Agarose der fluoreszierende Farbstoff GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (4 µl/100 ml TAE-Puffer) hinzugefügt, um die DNA-Moleküle im Anschluss darstellen zu können. Es erfolgte eine Mischung von 4 µl der Probe, 4 µl Aqua dest. zusammen mit 1 µl Loading dye, welche anschließend in die Tasche des Agarosegels pipettiert wurde. Zur Bestimmung der Länge der amplifizierten DNA-Moleküle wurden zusätzlich 3 µl eines DNA-Markers (100 bp) in eine Tasche des Agarosegels aufgebracht. Das beladene Agarosegel wurde in eine Gelelektrophoresekammer, befüllt mit TAE Puffer, gelegt und für 90 min bei 90 Volt gefahren. Die aufgetrennte DNA in dem Gel konnte anschließend in einem UV-Transilluminator angesehen und fotografiert werden.

3.5. Isolierung chromosomaler DNA für die Deep Resequencing Analyse

Es wurde von zwei H-Genotypen (IBT 42685 und CBS 324.65) sowie von einem S-Genotyp (IBT 40293) DNA extrahiert, um von diesen Stämmen Deep Sequencing Ergebnisse zu erhalten. Die Stämme wurden in flüssigem PDA für 21 Tage bei 25 °C und 0,89 a_w bei Dunkelheit angezchtet.

Das Myzel wurde in ein 50 ml Gefäß überführt und bei 8.228 g abzentrifugiert, der Überstand wurde anschließend verworfen. Das abzentrifugierte Myzel wurde zweimal mit 20 ml sterilem Aqua dest. gewaschen und das Wasser erneut verworfen. 200 mg des Myzels wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß auf einem Heizblock getrocknet. Zwei sterile Glasperlen (4 mm Ø) wurden hinzugegeben und mit dem Vortex-Genie® 2 Shaker so lange bearbeitet bis das Myzel pulverisiert war. Die Glasperlen wurden anschließend steril entnommen. Es wurde 1 ml Cetyltrimethylammoniumbromid hinzugegeben und für 30 min bei 65 °C inkubiert, nach jeweils 10 min wurde das Reaktionsgefäß geschwenkt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. 1 ml Chloroform wurde hinzugegeben und für 1 min geschwenkt bevor die Probe für 10 min bei 1.088 g abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und dieselbe Menge an kaltem Isopropanol (100 %) hinzugegeben und vorsichtig invertiert. Es folgte ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 1.088 g bei 4 °C, nach welchem das

Isopropanol verworfen wurde. Ein Milliliter eiskaltes 70 %iges Ethanol ($\text{H}_2\text{O} / \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, v/v) wurde hinzugefügt und erneut für 10 min bei 1.088 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Ethanol wurde mit einer Pipette abgenommen und das Pellet getrocknet. Anschließend wurden 100 µl TRIS-Puffer (10 nM, pH 7,5 – 8,5) zur Probe gegeben. Die Proben wurden nach der Extraktion direkt auf Trockeneis zur Firma Microsynth (Balgach, Schweiz) für die Sequenzierung geschickt.

3.6. Isolierung von mRNA

Die Isolierung von mRNA erfolgte mit dem InnuPREP Plant RNA Kit laut dem Protokoll RNA Extraktion pflanzlicher Materialien (bis 100 mg) mit zusätzlicher DNase Behandlung. Zusätzlich wurden 35 µl DTT (Dithiothreitol, 1 M) zu 965 µl Lysis Solution RL gegeben. DTT hat die Fähigkeit RNasen zu inaktivieren indem deren Disulfidbrücken gespalten werden (MOMMAERTS et al., 2015). Alle hier aufgeführten Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C vorgenommen.

Für die Isolierung erfolgte zunächst die Erstellung eines Einsporisolates (siehe III.2.2.1), welches auf PDA für 21 Tage bei 25 °C und 0,89 a_w bei Dunkelheit inkubiert wurde. Zur Homogenisierung der Probe wurde mit einer 1 ml Pipettenspitze ein Teil des auf einer Agarplatte gewachsenen Myzels ausgestantzt. Überschüssiger Agar, der sich noch an dem Myzel befand, wurde mit einem sterilen Skalpell entfernt. Das Myzel wurde in ein Lysing Matrix A Tube überführt. Zur Probe wurden 460 µl des Gemisches aus Lysis Solution RL und DTT pipettiert. Die Homogenisierung erfolgte zweimal für 40 s bei 4 m/s im Fastprep 24™. Zur Kühlung wurde etwa 50 g Trockeneis in den Aufsatz des Fastprep 24™ gefüllt. Zwischen den beiden Homogenisierungen wurde die Probe zusätzlich auf Eis gekühlt. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 11.200 g.

Der Spin Filter D wurde in ein Receiver Tube gegeben. Der Überstand der lysierten Probe wurde auf den Spin Filter pipettiert bevor diese für 2 min bei 11.000 g abzentrifugiert wurde. Das Filtrat enthält die RNA und falls die Lösung nicht komplett durch den Filter gedrückt wurde, wurde erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde der Spin Filter D verworfen. Ein Spin Filter R wurde auf einen Receiver Tube aufgebracht. Das gleiche Volumen des Filtrats (etwa 400 µl) wurde in Form von 70 %igem Ethanol zum Filtrat gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Diese Probe wurde auf den Spin Filter R aufgebracht und für 2 min bei 11.000 g

abzentrifugiert. Der Receiver Tube mit dem Filtrat wurde verworfen und der Spin Filter R wurde auf einen neuen Receiver Tube aufgebracht. Für die DNase Behandlung wurden 300 µl der Washing Solution HS auf den Spin Filter R gegeben und für 1 min bei 10.000 g abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Spin Filter R auf einen neuen Receiver Tube aufgebracht. Es wurden 1,5 µl innuPREP DNase I und 73,5 µl DNase I Digestion Buffer zusammen pipettiert und auf den Spin Filter R gegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 300 µl Washing Solution HS zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die Probe für 1 min bei 10.000 g abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Nach der DNase Behandlung wurden für den Waschschrift 650 µl Washing Solution LS auf den Spin Filter R pipettiert und für 1 min bei 11.000 g abzentrifugiert. Der Receiver Tube mit dem Filtrat wurde erneut verworfen und der Spin Filter R auf einen neuen Receiver Tube gegeben. Der Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde die Probe für 2 min bei 11.000 g trocken abzentrifugiert, um alle Spuren von Ethanol zu entfernen. Der Receiver Tube wurde verworfen und der Spin Filter R in ein Elution Tube gegeben. Es erfolgte die Elution, indem 50 µl RNase-freies Wasser auf den Spin Filter R gegeben wurde. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation der RNA für 1 min bei 11.000 g. Da RNA fragil ist, muss die Probe umgehend bei -80 °C eingefroren werden.

3.7. Konzentrationsmessung von mRNA

Nach der Isolierung von RNA-Proben erfolgte die Messung der jeweiligen Konzentration mit dem NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spektrophotometer. Das Photometer misst zunächst einen Leerwert, wofür Aqua dest. verwendet wurde. Anschließend misst das Gerät die Proben fotometrisch, wodurch die Konzentration bestimmt werden kann. Der Quotient A260/A280 dient außerdem der Bestimmung der Reinheit der RNA (ARNEMANN, 2019).

3.8. Next Generation Sequencing

Die RNA-Sequenzierung der Proben wurde von der Firma Microsynth (Balgach, Schweiz) vorgenommen.

Nach Isolierung der RNA wurden die Proben auf Trockeneis gelagert und zur Firma Microsynth geschickt. Dort erfolgte eine Qualitätskontrolle der Proben. Die RNA

wurde einem Poly(A)-Enrichment unterzogen, näheres dazu wurde unter II.5.2 beschrieben. Eine Library Preparation wurde mittels Illumina TruSeq mRNA Library Preparation durchgeführt. Dies erfolgte mit einer „single-end read length“ von 75 Basenpaaren. Nach dem Illumina Next Generation Sequencing wurden die Rohdaten einer RNA-Sequencing Analyse unterzogen. Nach einer erneuten Qualitätskontrolle wurden die sequenzierten Reads an das Referenzgenom [IBT 40293 (Accession: PRJNA185808) und IBT 40288 (Accession: PRJNA170468)] gemappt. Die Accession ist eine eindeutige Bezeichnung eines Genomprojektes und setzt sich in der Regel aus Buchstaben und Zahlen zusammen. Dies erfolgte mit der Software „Salmon“ (PATRO et al., 2017) beziehungsweise „STAR“ (DOBIN et al., 2013). Die Identifizierung der unterschiedlich hoch exprimierten Gene wurde mittels der Software DESeq2 (LOVE et al., 2014) vorgenommen. Die Anzahl der Reads wurde normalisiert und die Varianz, je nach Höhe der Replikation der einzelnen Konditionen, berechnet.

Für die weitere Auswertung der Daten haben wir uns ausschließlich auf die Gene der Satratoxin- und des Atranonclusters sowie den Core Trichothecencluster fokussiert und diese verglichen.

3.9. Deep Resequencing Analyse

Es wurde eine Deep Resequencing Analyse von den Stämmen IBT 40293 (Genotyp S), IBT 42685 (Genotyp H) und CBS 324.65 (Genotyp H) durchgeführt, um die Coverage von Genen zu vergleichen, welche bei der Produktion von Satratoxinen (SC1 – SC3) oder Atranonen (AC1) teilhaben. Nähere Informationen zur Extraktion der chromosomalen DNA befinden sich im Kapitel III.3.5. Die Deep Resequencing Analyse wurde von der Firma Microsynth (Balgach, Schweiz) durchgeführt. Zur Coverage Analyse wurde als Referenz auf die Sequenzen von IBT 40293 (Accession: PRJNA185808) und IBT 40288 (Accession: PRJNA170468) der NCBI Datenbank zurückgegriffen. Tabelle 15 gibt den jeweiligen Locusnamen von SC1 – 3 und AC1 und AC2 wieder. Der Locusname ist eindeutig einem Scaffold zuzuordnen und beinhaltet in der Regel Buchstaben und Zahlen. Auf NCBI sind im Laufe der Zeit verschiedene Arten von Locusnamen aufgekommen. Wenn der Locusname, wie in diesem Fall, aus acht Zeichen besteht, ist er lediglich die Accession-Nummer. Die Länge einer Accession-Nummer kann variieren und richtet sich nach der Art der Sequenzaufzeichnung.

Tabelle 15: Gencluster und deren Locusname, welche zur Auswertung der Deep Resequencing Daten verwendet wurden.

Gencluster	Locusname
SC1	KL650302*
SC2	KL651028*
SC3	KL652499*
AC1	KL659150**
AC2	KL656922**

*von IBT 40293 **von IBT 40288

4. Sequenzanalysen

Folgende Genom-Projekte von *S. chartarum* waren über NCBI (National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine) verfügbar: Genotyp S: IBT 40293: GCA_000732565.1; IBT 7711: GCA_000730325.1; Genotyp A: IBT 40288: GCA_000732765.1; unbestimmter Genotyp: 51-11: GCA_001021365.1.

Die genannten Stämme wurden zum Genomvergleich herangezogen. Zur Eruiierung von ähnlichen Sequenzen wurden die Programme BlastN und BlastP auf NCBI benutzt (ALTSCHUL et al., 1990). Zur Durchführung von Sequenz-Alignments wurde auf das Onlinetool *Multiple Sequence-Alignment – Clustal Omega* (EMBL, Hinxton Hall Conference Centre, UK) mit dessen Standardeinstellungen zurückgegriffen. Zur weiteren Verarbeitung der Alignments wurde die Software MegAlignPro 17.1.1 (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) mit MUSCLE und dessen Standardeinstellung verwendet. Das paarweise Alignment wurde mittels des Smith-Waterman Algorithmus von MegAlignPro 17.1.1 durchgeführt. Proteindomänen wurden mittels des SMART Algorithmus ermittelt (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

4.1. PCR – Bereich Downstream von SC1

Um zu überprüfen, welche Genotypen das erste hypothetische Protein (S40293_09301) Downstream vom Satratoxincluster 1 aufweist, wurde eine PCR durchgeführt. Diese soll zeigen, welche Stämme das gesamte Gen aufweisen und welche nur einen Teil davon besitzen. Tabelle 16 gibt die Stämme und deren Genotyp nach ULRICH et al. (2020) wieder.

Tabelle 16: Verwendete Stämme für PCR im Bereich downstream von SC1

Genotyp nach ULRICH et al. (2020)	Stamm
S	IBT 40293
S	ATCC 34916
S	DSM 12880
S	DSM 2144
H	IBT 42685
A	IBT 40288
A	CBS 129.13
A	MS1

Die Isolierung der chromosomalen DNA und die anschließende Konzentrationsmessung wurde in den Kapiteln III.3.1 und III.3.2 näher beschrieben. Die verwendete Oligonukleotide sind in Kapitel III.1.3, Tabelle 10 aufgelistet. Der Reaktionsansatz und das Temperaturprogramm für die PCR im Bereich downstream von SC1 kann Tabelle 17 und Tabelle 18 entnommen werden.

Tabelle 17: Reaktionsansatz (25 µl) für PCR im Bereich downstream von SC1

Stammlösung	µl/Ansatz
10X Puffer	2,5
dNTPs	0,5
A-gen1-F	0,5
A-gen1-R/S-gen1-R	0,5
Formamid	0,25
Taq Polymerase	0,3
DNA (50 ng/µl)	1,0
H ₂ O	19,45 (ad 25)

nDTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat

F: forward R: reverse

Tabelle 18: Temperaturprogramm für PCR im Bereich downstream von SC1

Schritt	Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
Initiale Denaturierung	1	94	4
Denaturierung	35	94	1
Annealing	35	64	1
Elongation	35	74	1
Finale Elongation	1	72	4

Anschließend wurde, wie in Kapitel III.3.4 beschrieben, eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

4.2. PCR – Übergang zwischen Scaffold 1 und 1543

Um zu überprüfen, ob sich die Scaffolds 1 (dieser beinhaltet den SC3) und 1543 vom Stamm IBT 40293 (S) direkt nebeneinander befinden, wurde ein Primerpaar erstellt. Dabei befindet sich der Vorwärtsprimer F-crossing-1 im Scaffold 1 und der Rückwärtsprimer R-crossing-1 ist im Scaffold 1543, beide Oligonukleotide sind auf den Rand des jeweiligen Scaffolds hin orientiert.

Die Isolierung der chromosomalen DNA und die anschließende Konzentrationsmessung kann den Kapiteln III.3.1 und III.3.2 entnommen werden. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Kapitel III.1.3, Tabelle 11 aufgelistet.

Der PCR Ansatz wurde in Tabelle 19 und das Temperaturprogramm in Tabelle 20 zusammengefasst. Anschließend folgte eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel III.3.4).

Tabelle 19: Reaktionsansatz (25 μ l) für PCR – Übergang zwischen zwei Scaffolds

Stammlösung	μl/Ansatz
10X Puffer	2,5
dNTPs	0,5
F-Übergang 1	0,5
R-Übergang 1	0,5
Taq Polymerase	0,3
DNA (50 ng/ μ l)	1,0
H ₂ O	19,45 (ad 25)

nDTP: Desoxyribonukleosidtriphosphat

F: forward R: reverse

Tabelle 20: Temperaturprogramm für PCR- Übergang zwischen zwei Scaffolds

Schritt	Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden
Initiale Denaturierung	1	98	30
Denaturierung	35	98	35
Annealing	35	65 – 75*	35
Elongation	35	72	35
Finale Elongation	1	72	2

*Gradient

5. Zellbiologische und mikroskopische Methoden

5.1. Mikroskopische Untersuchungen

Zur mikroskopischen Untersuchung der Zellen wurde das Lichtmikroskop Leica DMIL LED verwendet. Die Bilder wurden mit der Canon EOS 600D aufgenommen. Für die Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung von Präparaten wurde das Epifluoreszenzmikroskop Leica DM 5000B verwendet. Die Aufnahme der Bilder wurde mit der Kamera Leica DFC 3000G, mit Hilfe der Software Leica Application Suite X (LAS-X; Leica Microsystems), vorgenommen. Eine Bearbeitung der jeweiligen Bilder erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop und PowerPoint (Microsoft Office Professional Plus 2019).

5.2. Kultivierung von PK15-Zellen

Die Zellen wurden in einer Zellkulturflasche im Inkubator bei 37 °C und 5,0 % CO₂-Konzentration kultiviert. Bei dem verwendeten Medium handelt es sich um Minimal Essential Medium (MEM 1X) mit Earle's Salts und L-Glutamine. Zusätzlich wurden 10 % FCS und 1 % MEM Non-essential Amino Acid Solution (100X) hinzugegeben. Sobald unter dem Lichtmikroskop Leica DMIL LED bei zwanzigfacher Vergrößerung ein Monolayer zu sehen war, wurde ein Teil der Zellen in ein neues Medium überführt. Zunächst wurde mittels einer 25 ml Pipette das Medium abgenommen. Auf die adhärennten Zellen wurde 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung gegeben, sodass die Zellen mit der Lösung bedeckt waren. Nach einer Einwirkzeit von 5 bis 10 min bei 37 °C konnte man unter dem Mikroskop erkennen, dass sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten. Um die Reaktion mit Trypsin zu stoppen, wurde 5 ml des oben beschriebenen MEM zum Trypsin hinzugegeben. Das Trypsin-Zell-Medium-Gemisch wurde in ein 15 ml Gefäß überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert. Je nach Größe des Zellpellets wurden 50 – 100 µl davon zusammen mit 40 ml Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen für 5 min bei 400 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml 92 % FCS und 8 % DMSO resuspendiert. Bis zur Verwendung wurden die PK15-Zellen bei -196 °C in einem Cryotank mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml MEM suspendiert bevor es in eine Zellkulturflasche mit demselben Medium überführt und bis zum nächsten Umsetzen bei 37 °C kultiviert wurde.

6. Zelltoxische Methoden

6.1. Toxinextraktion für Zellkulturtest

6.1.1. Toxinextraktion von PDA

Um die verschiedenen Stämme auf ihre Zytotoxizität zu überprüfen, wurde bei jedem Stamm eine Toxinextraktion vorgenommen. Die Stämme IBT 40293, IBT 42685, CBS 324.65 und IBT 40288 wurden dafür mittels Dreipunktkultur auf PDA

angezogen. Die Kultivierung erfolgte bei 25 °C und 0,89 a_w bei Dunkelheit. Nach 21 Tagen wurde das Pilzmyzel inklusive des Agars einer Platte in einen Stomacherbeutel überführt. Es wurden 50 ml ACN/H₂O (84/16, v/v) (Acetonitril >99,9 % und Aqua dest.) in jeden Beutel gegeben und für 5 min im Stomacher® 80 microBiomaster bearbeitet. Der Inhalt eines Stomacherbeutels wurde durch einen Papierfilter filtriert und aufgefangen. Es wurden SPE Säulen im Vorhinein vorbereitet. Die Beladung jeder Säule erfolgte mit 5 ml Methanol 100 % und 5 ml ACN/H₂O (84/16, v/v). Die unverdünnte Probe wurde auf eine Säule aufgebracht. Danach erfolgte das Waschen der Säule mit 10 ml Methanol (30 %) und das Eluieren mit 10 ml Methanol (100 %). Das Mykotoxinextrakt wurde bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

6.1.2. Toxinextraktion von Reiskultur (IBT 40293)

Um die Ergebnisse des durchgeführten Zytotoxizitätstest mit dem Toxinextrakt von PDA (III.6.1.1) zu überprüfen, wurde IBT 40293 auf Reis angezüchtet und anschließend extrahiert. Es wurden 50 g Reis und 50 ml Aqua dest. für 25 min bei 100 °C autoklaviert (JARVIS et al., 1998). Nach anschließender Abkühlung des Reises wurden 150 µl einer Sporensuspension von *S. chartarum* IBT 40293 (S) auf den Reis gegeben. Es folgten vier Wochen Inkubation bei 25 °C in einem Inkubator. Die nun schwarze Reiskultur wurde nach vier Wochen abgewogen und mit Hilfe eines Handmixers zerkleinert. Die Reiskultur wurde mit der zehnfachen Menge ACN/H₂O (84/16, v/v) gemischt. Es folgte eine 24-stündige Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank. Am nächsten Tag wurde die Reiskultur zweimal durch einen Papierfilter und anschließend einmal durch einen PVDF Filter gefiltert. Das Toxinextrakt wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

6.2. Zytotoxizitätstest mittels Zellkultur

Sobald ein dichter Zellrasen unter dem Mikroskop zu sehen war, wurde das verbrauchte Medium abgenommen. Wie unter III.5.2 beschrieben, wurden 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung auf den Zellrasen pipettiert und für 5 bis 10 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurden 5 ml frisches Medium hinzugegeben. In einem Reaktionsgefäß wurde das Gemisch für 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem Medium gelöst. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde eine 1:10 Verdünnung des Zellgemisches angefertigt (2 µl des Zellgemisches mit 18 µl Medium). 5 µl davon

wurden mit 5 µl Trypanblau vermischt. Mittels einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl mit folgender Rechnung bestimmt (beispielhaft gehen wir von 50 ausgezählten Zellen aus):

$$50 * 2 * 10 * 10.000 = 10 \text{ Mio Zellen/ml}$$

Damit sich nach 24 Stunden ein dichter Zellrasen in einem Well einer 96-Wellplatte bildete, wurde eine geeignete Zellzahl ermittelt. Die ideale Zellzahl lag hierbei bei 10^4 Zellen pro Well.

Bei unserer Beispielrechnung wurde jedes Well mit 240 µl Medium und 1 µl Zellgemisch bestückt. Im Dreifachansatz wurden 5 µl von jedem Toxinextrakt und als Kontrolle 5 µl Methanol 100 % hinzugegeben, da die Extrakte in 100 % Methanol gelöst waren.

Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 37 °C.

6.3. Überprüfung der Zell-Viabilität durch Trypanblaufärbung

Das Ziel war es die Viabilität von PK15-Zellen zu überprüfen, die zuvor mit dem Toxinextrakt von IBT 40293 versetzt wurden. Zunächst wurden zwei Wells einer 96-Wellplatte mit je 240 µl Medium, 10^4 PK15-Zellen und 5 µl vom Toxinextrakt von IBT 40293 bestückt. Die Platte wurde für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Großteil der Zellen war nach 24 Stunden nicht adhärent und befand sich im Überstand; diese ließen sich zusammen mit dem Medium mit Hilfe einer Pipette abnehmen. Der Überstand der beiden Wells wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 µl Medium und 5 µl Trypanblau aufgenommen. Zuletzt wurden die Zellen in eine Neubauer Zählkammer überführt und unter dem Mikroskop auf ihre Viabilität überprüft.

6.4. Toxintest mit Färbung durch Annexin V-FITC und Propidiumiodid

Die PK15-Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst (siehe III.5.2), dann wurde mittels einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Es wurde je ein rundes Deckgläschen in ein Well einer 24-Wellplatte gelegt. Pro Well wurde 1 ml des Mediums hinzugegeben. Im Vorhinein wurde ermittelt, welche Zellzahl am besten geeignet ist, sodass das Deckgläschen mit einem möglichst dichten Zellrasen bewachsen ist. Auf jedes Deckgläschen wurden demnach 7×10^4 Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation von 24 Stunden, damit

die Zellen einen Zellrasen ausbildeten.

Am nächsten Tag wurden 20 µl des jeweiligen Toxinextraktes auf den Zellrasen pipettiert. Nach einer fünfstündigen Inkubation bei 25 °C wurden die Deckgläschen aus dem Well genommen und auf Watte gelegt. Es wurden 10 µl Annexin auf die Deckgläschen pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur und bei Dunkelheit angefärbt. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal in PBS eingetaucht. 5 µl der Propidiumiodid-Lösung wurden auf einen Objektträger getropft und ein Deckgläschen umgedreht, mit der bewachsenen Seite nach unten, daraufgelegt. Anschließend wurden die angefärbten Zellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop Leica DM 5000B betrachtet und fotografiert.

6.5. Überführung der mit Toxinextrakt behandelten Zellen in frisches Medium

PK15-Zellen, welche mit Trypsin aus der Zellkulturflasche gewaschen wurden, wurden nach der Zentrifugation in 1 ml Medium aufgenommen und wie in III.6.2 behandelt. Nach 24 Stunden bei 37 °C wurden die Zellen aus dem Medium mit dem Toxinextrakt in ein Mikrozentrifugationsröhrchen verbracht. Falls sich die Zellzahl während der folgenden Waschschrirte deutlich verringern sollte, wurde der Inhalt von drei Wells, die alle mit derselben Menge an Toxinextrakt versetzt worden waren, verwendet. Die Zellen wurden für 5 min bei 400 g abzentrifugiert und der Überstand wurde anschließend vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Es folgte zweimal eine Waschung mit 1 ml PBS, zwischen den Waschungen wurde erneut für 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Um das Pellet von PBS zu befreien, wurde mit 500 µl Medium gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Als letzter Schritt wurde das Pellet in 240 µl Medium aufgenommen und in ein Well einer 96-Wellplatte überführt. Nach 24 und 48 Stunden wurde der Zustand der Zellen überprüft.

6.6. Zellkulturtest mittels verschiedener Zellüberstände

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob Überstände der Zellen, die mit dem Toxinextrakt von IBT 40293 versetzt wurden, ihre Toxizität verlieren. Wie in III.6.2 beschrieben, wurden dafür 240 µl Medium und 10^4 Zellen in ein Well einer 96-Wellplatte pipettiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach diesen 24 Stunden wurde erneut ein Well mit Medium und Zellen befüllt. Die adhärenr gewordenen Zellen vom Vortag, sowie die neu eingesetzten

Zellen, wurden mit 5 µl des Toxins von IBT 40293 versetzt und erneut für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden wieder frische PK15-Zellen für den Zellkulturtest verwendet. In ein Well wurden 10⁴ dieser Zellen zusammen mit dem Überstand der adhärenen Zellen in ein Well gegeben. In ein zweites Well wurden 10⁴ Zellen mit dem Überstand der „kugeligen“ Zellen von Tag zwei pipettiert. Dieser Überstand wurde zuvor für 5 min bei 400 g abzentrifugiert, um die bereits geschädigten Zellen aus dem Überstand zu entfernen. Am nächsten Tag wurde ermittelt, ob eine unterschiedliche Wirkung der Überstände auf die Zellen gesehen werden konnte.

6.7. Zellkulturtest mit Toxinstandards

Wie unter III.6.2 beschrieben, wurden je 10⁴ PK15-Zellen und 240 µl MEM in ein Well einer 96-Wellplatte überführt. Jeweils im Dreifachansatz wurden den Zellen 5 µl eines Toxinstandards zugefügt. Bei den Standards handelte es sich um Satratoxin G, Satratoxin H und Roridin L2. Die Konzentration der Standards lag jeweils bei 100 µg/ml. Nach 24 Stunden wurden die behandelten Zellen fotografiert und beurteilt.

Die Zellen wurden anschließend, wie in IV.5.1.4 beschrieben, in frisches Medium überführt. Damit sollte überprüft werden, ob die Zellen, sobald sie in frisches Medium überführt werden, wieder Adhärenz zeigen. Dafür wurde nach 24 und 48 Stunden eine mikroskopische Aufnahme der Zellen gemacht.

7. LC-MS/MS

7.1. System

Die qualitative Messung von 6-Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on, 3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dien-on und Atranon A wurde an dem QTRAP 5500 Tandemmassenspektrometer mit einem Shimadzu Nexera HPLC System mit der analytischen Säule Kinetex C18 100x2.1mm, 2.6µm durchgeführt.

7.2. Toxinextraktion der Isolate

Um die vorherigen Ergebnisse bezüglich der Fähigkeit zur Atranonproduktion zu bestätigen, wurden die vier Stämme (IBT 40293, IBT 42685, CBS 324.65 und IBT 40288) mittels Massenspektrometrie auf zwei Vorläufermoleküle von Atranonen (6-Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on, 3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dien-on) sowie Atranon A überprüft. Bis auf IBT 42685 wurde diese Messung bereits in früheren Untersuchungen durchgeführt (ANDERSEN et al., 2002; ANDERSEN et al., 2003).

Die folgenden Schritte wurden nach der Methode von ANDERSEN et al. (2003) vorgenommen:

Es wurden Dreipunktulturen der zu untersuchenden Stämme angesetzt und für drei Wochen bei 25 °C und 0,89 a_w bei Dunkelheit inkubiert. Für die Toxinextraktion wurden zehn Agarpfropfen mit je 6 mm Durchmesser aus einer 21 Tage alten Kolonie herausgestochen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1,5 ml Methanol (100 %) wurden diese über Nacht bei 4 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben jeweils durch einen PVDF Filter gedrückt, in ein frisches Gefäß überführt und mittels eines Stickstoffverdampfers getrocknet. In gekühlter Form wurden die Proben an die Universität Uniwersytet Kazimierza Wielkiego (Wydział Nauk Biologicznych Katedra Fizjologii i Toksykologii, Bydgoszcz, Poland) zur weiteren Bearbeitung geschickt. Die folgenden Schritte wurden erneut nach der Methode von ANDERSEN et al. (2003) durchgeführt:

Die Proben wurden in 1 ml der mobilen Phase (A:B 4:1) (Bestandteile der mobilen Phase - siehe Tabelle 21) aufgelöst. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 14.100 g und eine Filterung der Proben durch einen 0,20 µm PTFE Membranfilter.

7.3. Messung der Toxinextrakte mittels LC-MS/MS

Die Bestimmung des Gehalts von zwei Vorläufermolekülen von Atranonen (6-Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on, 3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dienon) und Atranon A erfolgte mittels LC-MS/MS.

Die Bedingungen für die Flüssigkeitschromatographie sind in Tabelle 21 und Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 23 gibt die Massenspektrometer-spezifische Einstellung wieder. Tabelle 24 zeigt die substanzspezifischen MS-Parameter der jeweiligen Toxine. Alle Analyten wurden als „adduct ions“ von Wasserstoff $[M+H]^+$ gemessen. Die Identifikation der Toxine erfolgte im „multiple reaction monitoring“-Modus (MRM).

Da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine kommerziellen Atranontoxinstandards zur Verfügung stehen, wurde auf den bisher beschriebenen MRM zurückgegriffen (ANDERSEN et al., 2003).

Tabelle 21: Grundbedingungen für die HPLC

HPLC-Säule	Kinetex C18 analytical column (100x2.1mm, 2.6µm; Phenomenex, Torrance, USA)
Mobile Phase A	Reinstwasser + 0,1 % Essigsäure + 5 mM* Ammoniumacetat
Mobile Phase B	Methanol + 0,1 % Essigsäure + 5 mM* Ammoniumacetat
Flussrate	0,300 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl
Säulentemperatur	40 °C

*mM Millimolar

Tabelle 22: Gradientenprogramm (linear) für die HPLC

Zeit (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	85	15
14,2	25	75
14,5	5	95
17	5	95
17,1	85	15
22	85	15

Eluent A: Reinstwasser + 0,1 % Essigsäure + 5 mM Ammoniumacetat

Eluent B: Methanol + 0,1 % Essigsäure + 5 mM Ammoniumacetat

Tabelle 23: Verwendete Quellenparameter des Tandemmassenspektrometers (QTRAP 5500, Sciex, Framingham, USA)

Ionisierung	Elektrospray positiv (ESI +)
Ionisierungsspannung (ISV)	4.500 V
Temperatur	550 °C
Nebuliziergas (GS1)	80 psi*
Heizgas	80 psi*
Curtaingas (CUR)	20 psi*
Kollisionsgas (CAD)	medium

* pounds per square inch

Tabelle 24: Substanzspezifische Parameter für die Identifikation von 6-Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on, 3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dien-on und Atranon A

Analyt	Q1	Q3	Retentions-	DP	CE	CXP
	[m/z] ^a	[m/z] ^a	zeit [min] ^b	[V]	[V]	[V]
6-Hydroxydolabella- 3,7,12-trien-14-on	303,3	205,1	12,0	86	15	12
		243,0	12,0	86	11	14
3,4-Epoxy6- hydroxy-dolabella- 7,12-dien-on	319,2	221,1	10,5	101	11	12
		259,0	10,5	101	9	14
Atranon A	417,3	205,2	11,4	200	33	12
		357,2	11,4	200	15	11

^a qualitative Messung,
CE: Collision energy

^b voraussichtliche Retentionszeit; DP: Declustering Potential
CXP: Cell exit potential

IV. ERGEBNISSE

Die Einteilung nach Genotypen A, H und S erfolgt anhand der atranon- und satrattoxinspezifischen Gene (*atr*- und *sat*-Gene) (ULRICH et al., 2020).

Das Prinzip, *S. chartarum* Isolate nach Genotypen einzuteilen, ist vergleichsweise neu. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, mehr Informationen über die Unterschiede der Genotypen in Bezug auf ihr Genom, Transkriptom und ihre Fähigkeit zur Produktion von Toxinen sowie deren Wirkung im Zellkulturtest zu erlangen.

In Hinblick auf die Gensequenzen wurde der Fokus in dieser Arbeit auf die Gencluster, die von SEMEIKS et al. (2014) beschrieben wurden, sowie ihre flankierenden Sequenzen gelegt.

Die Bezeichnungen upstream und downstream richten sich bei Genclustern nach der Strangrichtung (5'→3'-Richtung), die durch den jeweiligen Datenbankeintrag vorgegeben ist. Upstream bezeichnet dabei den an das 5'-Ende angrenzenden Bereich (LODISH et al., 2008).

Von Interesse waren die Scaffolds, die Satratotoxincluster 1 bis 3 (SC1 - SC3), Core Trichothecencluster (CTC) und Atranoncluster 1 und 2 (AC1 und AC2) beinhalten. In Tabelle 25 sind diese Scaffolds der verwendeten Stämme aufgelistet.

Tabelle 25: Auflistung der Scaffolds der Stämme IBT 40293 (S), IBT 7711 (S), 51-11 und IBT 40288 (A), die SC1 bis SC3, CTC und AC1 und AC2 enthalten

	IBT 40293 (S)	IBT 7711 (S)	51-11	IBT 40288 (A)
SC1	155	234	31	n/a
SC2	902	1.258	111	n/a
SC3 und CTC	1	1.385	11	n/a
AC1	n/a	n/a	n/a	1
AC2	n/a	1.035	4	123

n/a nicht vorhanden

Im Folgenden werden die Genotypen nach ULRICH et al. (2020) vereinfacht mit S, H oder A abgekürzt und zum besseren Verständnis in Klammern nach dem jeweiligen Stamm geschrieben. Wie später noch erläutert wird, ist nicht eindeutig geklärt, ob der Stamm 51-11 ein S-Genotyp ist. Aus diesem Grund wird bei diesem Stamm auf die Nennung des Genotypus in Klammern verzichtet.

1. Sequenzanalysen

In dieser Arbeit wurden Sequenzanalysen von *S. chartarum* durchgeführt, um mehr Einblicke in die Gencluster und ihre flankierenden Bereiche zu erlangen.

In den durchgeführten Sequenzanalysen wurde auf bereits vorhandene Sequenzen (aus der NCBI-Datenbank) und Annotierungen, soweit diese verfügbar waren, zurückgegriffen. Es gibt noch keine vollständigen Sequenzen, stattdessen liegen lediglich größere Genomabschnitte, sogenannte Scaffolds, vor. Dazu zählen die Scaffolds, die SC1 – SC3, CTC sowie AC1 und AC2 beinhalten. [Stamm 51-11 (Scaffolds 31, 111, 11, 4); Genotyp S: Stamm IBT 40293 (Scaffolds 155, 902, 1, 1203) und Stamm IBT 7711 (Scaffolds 234, 1258, 1385, 1035); Genotyp A: Stamm IBT 40288 (Scaffolds 1 und 123)].

Der Core Trichothecencluster (CTC) wurde von SEMEIKS et al. (2014) für die Stämme IBT 7711 (S), IBT 40293 (S) und IBT 40288 (A) von *S. chartarum* sowie für IBT 40285 von *S. chlorohalonata* beschrieben. Dieser beinhaltet bei *Stachybotrys* neun sogenannte *tri*-Gene, die für diverse Enzyme kodieren, die zur Trichothecenbiosynthese benötigt werden.

1.1. Satratoxincluster

Abbildung 15 Feld A bis C zeigt SC1 bis SC3 und den CTC sowie die flankierenden Bereiche, wie sie von SEMEIKS et al. (2014) beschrieben wurden. Die Gene sind als Pfeile dargestellt. Die dazugehörigen Cluster sind mit einem blauen Kasten markiert. Wenn eine Sequenz fehlt, ist diese als gepunktete Linie dargestellt.

Abbildung 15 Feld A zeigt den SC1 und die angrenzenden Bereiche. IBT 7711 (S), IBT 40293 (S) und 51-11 haben homologe Sequenzen (Identität 95,7 – 99,8 %, siehe Tabelle 28). IBT 40293 (S) weist einen vollständigen SC1 auf. Der Stamm 51-11 besitzt ebenfalls alle Satratoxingene, jedoch ist das *sat1* nur trunziert vertreten (siehe Abbildung 16).

In Abbildung 15 Feld B sind die Gene des SC2 dargestellt. IBT 7711 (S), IBT 40293 (S) und 51-11 sind in ihren Genen identisch, lediglich IBT 40288 (A) besitzt diese Gene nicht.

In Abbildung 15 Feld C sind die Genbereiche des CTC und des SC3 sowie deren flankierende Genbereiche zu sehen. Der CTC und der upstream Bereich sind mit

einer Identität von mehr als 99 % in den verglichenen Sequenzen sehr ähnlich. IBT 7711 (S) und IBT 40293 (S) zeigen zudem einen übereinstimmenden SC3. Der rechte eingerahmte Kasten in Feld C zeigt den Scaffold 1543. Da die Reihenfolge der anderen Sequenzen (IBT 40288 und 51-11) einen Hinweis dafür liefert, dass der Scaffold 1543 im Genom anschließen könnte, wurde eine PCR durchgeführt. Das Ziel war es, zu überprüfen, ob Scaffold 1 und Scaffold 1543 im Genom von IBT 40293 aufeinander folgen (siehe dazu IV.1.1.2). Die braunen Pfeile stellen vier homologe Gene dar, die in allen vier Stämmen vorkommen.

Durch Proteinvergleiche mittels BlastP sind Ähnlichkeiten von *Sat10* und die Proteine downstream davon mit dem *Purpureocillium lilacinum* Isolat PLBJ-1 aufgefallen. Diese wurden in Abbildung 15 Feld A ebenso dargestellt.

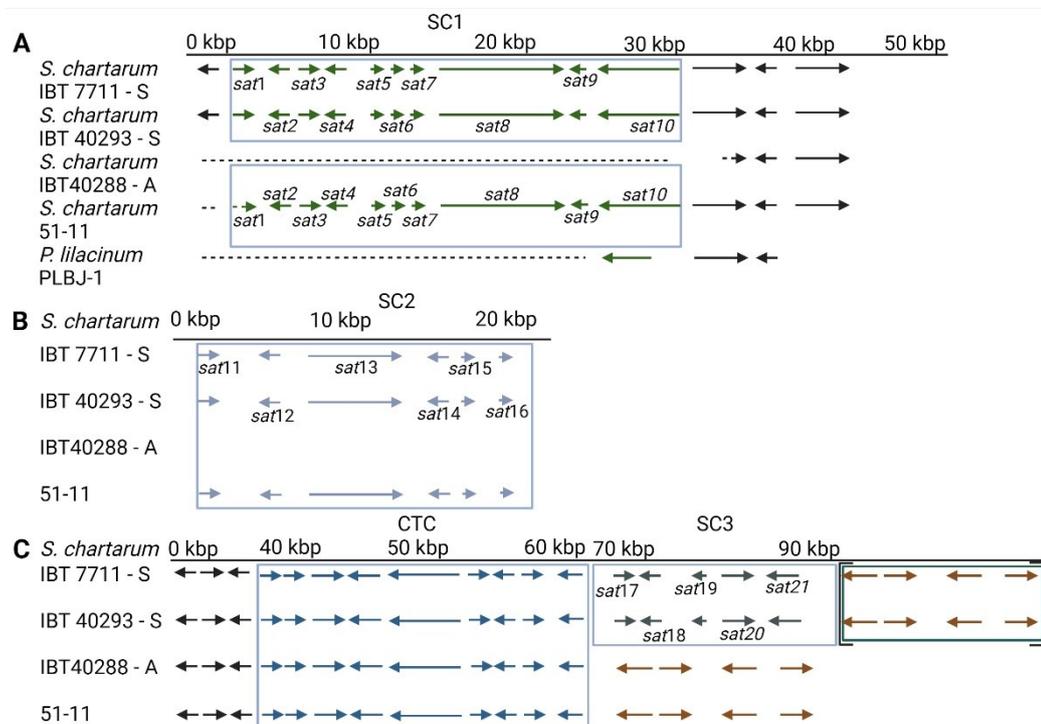


Abbildung 15 Feld A-C: Satratoxincluster 1 bis 3 (SC1 – SC3) und der Core Trichothecencluster (CTC) der Stämme IBT 7711 (S), IBT 40293 (S), IBT 40288 (A) und 51-11 nach SEMEIKS et al. (2014). Die Pfeile zeigen Gene mit entsprechender Ausrichtung; die Gencluster sind mit blauen Kästen umrandet; eine gepunktete Linie bedeutet, dass eine Gensequenz nicht vorhanden ist. Die Gene im rechten Kasten in Feld C liegen in einem anderen Scaffold, der sich laut unseren Ergebnissen jedoch hinter dem Scaffold 1 (mit SC3) von IBT 40293 befinden sollte. Die braunen Pfeile in Feld C zeigen homologe Gene, die in allen vier Stämmen vorkommen. Feld A zeigt zudem homologe Sequenzen von *Purpureocillium lilacinum* (Isolat PLBJ-1), aus ULRICH et al. (2022).

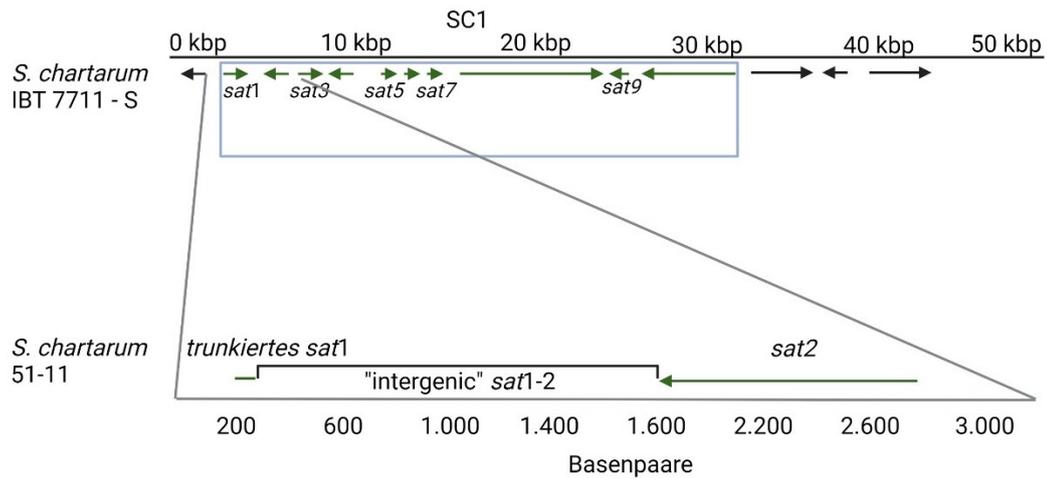


Abbildung 16: Darstellung des truncierten *sat1* in Scaffold 31 von 51-11, annotiert nach SEMEIKS et al. (2014), aus ULRICH et al. (2022). Die Gene und das *sat1* Fragment sind als grüne Pfeile bzw. eine grüne Linie dargestellt.

IBT 40288 (A) weist den SC1 nicht auf, jedoch besitzt dieser Stamm Teile des 1. Gens downstream von SC1, welches für ein hypothetisches Protein kodiert, sowie die beiden nachfolgenden Gene. Daher wurden Primer designed und eine PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob dies auch in anderen A-Genotypen so vorkommt. Die ersten beiden Gene downstream des SC1 wurden in dieser Arbeit als SC1-down-1 (\triangleq S40293_09301) und SC1-down-2 (\triangleq S40293_09300) bezeichnet.

1.1.1. PCR – Bereich downstream von SC1

Es wurden Primer designed, um zu überprüfen, welche Stämme nur einen Teil und welche Stämme den gesamten Genabschnitt des SC1-down-1 besitzen. Man erwartet für die S-Genotypen ein langes als auch ein kurzes PCR-Amplifikat und nur ein kurzes Fragment bei den A-Genotypen. Da keine Sequenzen der H-Genotypen zur Verfügung standen, war unklar, ob diese Stämme die gesamte Sequenz oder nur die Teilsequenz besitzen (vergleiche Abbildung 17)).

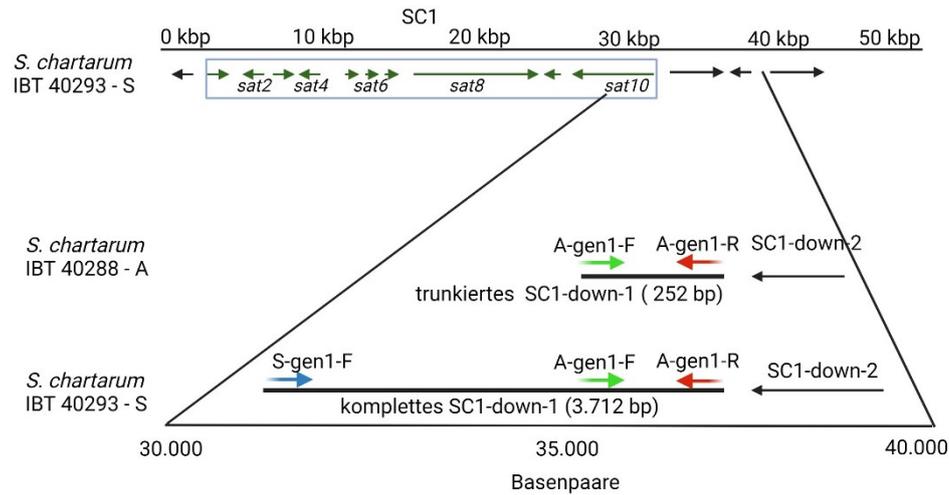


Abbildung 17: Vereinfachte Darstellung der Gensequenz von SC1, SC1-down-1 und SC1-down-2. Gesamte Gensequenz von IBT 40293 (S) mit 3.712 bp und Teilsequenz von SC1-down-1 mit 252 bp. Die verwendeten Primer sind als bunte Pfeile dargestellt, aus ULRICH et al. (2022).

In Abbildung 18 ist zu sehen, dass alle hier untersuchten S-Genotypen sowohl das kurze, als auch das lange Genfragment besitzen. Dies weist darauf hin, dass diese Stämme von *S. chartarum* das gesamte Gen besitzen, welches für das hypothetische Protein kodiert. In Abbildung 19 zeigt sich hingegen, dass die drei A-Genotypen nur ein kurzes Fragment dieses Gens aufweisen, jedoch ist keine weitere Bande zu erkennen. Dies beweist, dass Genotyp A nur ein Teilstück dieses Gens besitzt.

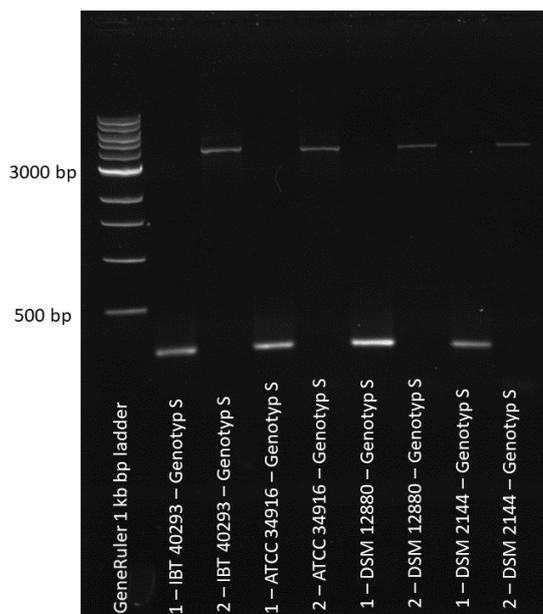


Abbildung 18: Gelbild von SC1-down-1 in verschiedenen S-Genotypen: IBT 40293, ATCC 34916, DSM 21880, DSM 2144; 1: Teilsequenz mit 252 bp; 2: Gesamte Gensequenz mit 3.712 bp.

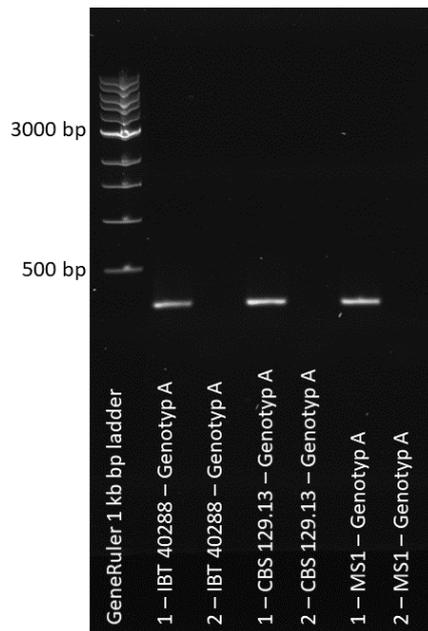


Abbildung 19: Gelbild von SC1-down-1 in verschiedenen A-Genotypen: IBT 40288, CBS 129.13 und MS1; 1: Teilsequenz mit 252 bp; 2: Gesamte Gensequenz mit 3.712 bp.

1.1.2. Übergang zwischen Scaffold 1 und 1543

Da die Reihenfolge der Sequenzen von IBT 40288 (A) und 51-11 downstream des CTC einen Hinweis dafür lieferten, dass Sequenzen von IBT 40293 (S) von Scaffold 1 und 1543 im Genom benachbart liegen könnten, wurde eine PCR durchgeführt. Das Ziel war es, zu überprüfen, ob Scaffold 1 und Scaffold 1543 im Genom von IBT 40293 aufeinander folgen. Aus diesem Grund wurden zwei Primer designed und eine PCR mit dem Stamm IBT 40293 (S) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde anschließend sequenziert. In Abbildung 20 ist die erhaltene Sequenz mit den Primern (in rot und grün) sowie ein neu sequenzierter Genbereich (gelb), der die beiden Scaffolds verbindet, abgebildet. Der Vorwärtsprimer (grün) ist in Scaffold 1 und der Rückwärtsprimer (rot) in Scaffold 1543 gelegen. Dies zeigt, dass die beiden Scaffolds im Genom aufeinander folgen und dass der noch unbekannte Übergangsbereich lediglich 177 bp umfasst.

¹CCAGGCGCAA²GTGCTGATGGCAGGCGGCCAGCTCGATCAT³GCGCACCGTGGGGACCTCGAGGA
 GGAAGTGGGAAAGGCGAAAAAGGAGGTAGAGGATAAATGGGACCACGAGATGCGTATTCCGCA
 ACATGTCACAGGGCGAATGGAAGATGAAGAGGGATGAAATGACCTGTTGCAAAGATACTTGATT
 TGATAGTGATGGAATGGATGGCTAAGCAGTTGAATATTAATTATACTTAG²TTATTTTAAGAAGTA
 AACTTTTTAAATACCCCTTATATTAATTAAGTATTTTAAATTGTTTTAAATTATTTAAAAAGAAG
 TATTAATATATAGAATTTAGAATTTAGTAATTATATTTATAAAAAATGTATTATATTATTAGATTA
 TTAAAGAAAACTTAATAACTATAGAAT²GTATTATATAAGTAGCTTAAGAGAAAATAGTATATT
 ATAGATAAGGAATTAATAGAGACATACTACGTTTTTTATAGGGACGCATAATATAATCCTTAGGG
 ACACATAACTGACTACACCTCCGATTGGTCAGAAAACAATCTGCCCTGCTATTCCCCGGCCCACC
 ATATCGCAACCAGATGCCCTAACAGAGCCATAGCTACAACGGCTACAGCAGTAGGGCGCTAACAG
 CCTCGATAGCTTCAATCGGGCTCGGGTACCGCTATGGGCGCTATAGCTATTATAAACCGGAGG
 CATCCTGCACAAGGCACAGTATGACAATATTACGCAGCTCAAATAACCAGAATAAGCCTCGTTG
 GTAGAGTCTAAGGGTCATGTTACCATAACCACTCCCAATTAGGCATAGTGCAAGTAGTTTCCCTCA
 AATGGTCCCAGAATTGAGGGGCCAAGAGGGAATAGACACTAACAAACAACATGACGGTCAAACA
 GAAATGGTCTGTTTCGGCCTGGTACCACTCGG²AAATGACTATAGAGCCGACCAGGGTGTGGT
 GTAATCAACTTCGCCAAACACGTACGAACCGCTGTTAGCCTTGAGCTCGATA³

Abbildung 20: Verbindende Sequenz der ¹Scaffolds 1 (KL652499) und ³1543 (KL651645) von IBT 40293 (S). Grün: Vorwärtsprimer F-crossing-1; Rot: Rückwärtsprimer R-crossing-1; ²Gelb: neu sequenzierter Bereich, aus ULRICH et al. (2022).

1.2. GC-Gehalt

Der GC-Gehalt in Prozent für die entsprechenden Cluster sowie deren flankierenden Bereich ist in Tabelle 26 A + B dargestellt. Der GC-Gehalt der Cluster und der meisten up- und downstream gelegenen Regionen ist mit 42 – 54 % recht ähnlich. Der GC-Gehalt der Satratoincluster gleicht sich ebenso mit 47 – 53 %, wohingegen die Bereiche up- und downstream des SC2 vom Stamm 51-11 einen recht geringen GC-Anteil von 27 % haben. Der Bereich upstream von SC2 der Stämme IBT 40293 (S) und IBT 7711 (S) ist mit 772 und 886 Basenpaaren verhältnismäßig kurz. Daher ist deren GC-Gehalt im Vergleich zu 51-11 nur bedingt beurteilbar.

In Tabelle 26 B sind die GC-Gehalte und die Länge der Basenpaare der Sequenzen von AC1 und AC2 mit ihren flankierenden Bereichen aufgeführt. Der GC-Gehalt ist bei allen vorhandenen Sequenzen mit 45 bis 57 % recht ähnlich. Lediglich im Bereich downstream von AC1 liegt der GC- Gehalt von 51-11 bei 39 %.

Tabelle 26: GC-Gehalt der SC1 bis SC3 (A) und von AC1 und AC2 (B) und deren Bereiche up- und downstream. Der GC-Gehalt, angegeben in % wurde in normaler Schriftgröße und die Länge der jeweiligen Sequenz in tiefgestellter Schrift dargestellt. Aufgelistet sind 51-11, IBT 40293 (S), IBT 7711 (S) und IBT 40288 (A). bp = Basenpaare, n.d. = nicht definiert, - - - = fehlt, IBT = Institut for Bioteknologi; SC = Satratoxincluster, *aufgrund von Fragmentierung nur teilweise ausgewertet, **Sequenz ist in zwei Teile geteilt und befindet sich in zwei Scaffolds

A: Satratoxincluster

		Stammnummer			
		51-11	IBT 40293	IBT 7711	IBT 40288
SC1 Scaffolds	Upstream	45 _{1.638} bp	44 _{4.155} bp	45 _{4.564} bp	- - -
	SC1	53 _{29.998} bp	53 _{28.909} bp	53 _{29.996}	- - -
	Downstream	48 _{140.301} bp	51 _{10.613} bp	50 _{72.574} bp	52 _{96.283} bp
SC2 Scaffolds	Upstream	27 _{2.133} bp	42 ₈₈₆ bp	45 ₇₇₂ bp	- - -
	SC2	47 _{19.876} bp	47 _{19.873} bp	47 _{19.854} bp	- - -
	Downstream	27 _{140.301} bp	44 _{10.613} bp	43 _{72.574} bp	- - -
SC3 Scaffolds	Upstream	51 _{849.200} bp	51 _{105.159} bp	51 _{95.549} bp	51 _{129.561} bp
	SC3	- - -	53 _{10.500} bp	54 _{10.496} bp	- - -
	Downstream	- - -	48 ₁₁₂ bp/42.552 bp**	33 ₁₂₂ bp	- - -

B: Atraroncluster

		Stammnummer			
		51-11	IBT 40293	IBT 7711	IBT 40288
AC1 Scaffolds	Upstream	46 _{85.474} bp	49 _{42.470} bp	50 _{33.211} bp/12.367 bp	45 _{24.509} bp
	AC1	- - -	- - -	- - -	49 _{35.610} bp
	Downstream	39 _{21.564} bp/849.200 bp**	49 _{54.221} bp	- - -	48 _{74.142} bp
AC2 Scaffolds	AC2	53 _{10.350} bp	57 _{9.340} bp	53 _{10.380} bp	51 _{11.699} bp
	Downstream	53 _{n.d.*}	54 _{294.349} bp*	53 _{64.167} bp*	51 _{24.996} bp

1.3. Vergleich der Aminosäuresequenzen von Proteinen mittels BlastP

Um nähere Informationen über den Ursprung der Gene der Satratoxin- und Atraroncluster zu bekommen, wurde eine Suche nach homologen Sequenzen mittels BlastP vorgenommen. Das Ziel war es, orthologe Proteine zu identifizieren.

Es zeigte sich, dass die aus allen *sat* Genen abgeleiteten Proteinsequenzen für die Stämme IBT 7711 und IBT 40293 mit 87 – 100 % Übereinstimmung sehr homolog waren.

Es wurden Proteine, die ähnlich zu den von *sat1* bis *sat10* kodierten (SC 1) in mehreren Pilzspezies gefunden, wobei auch jeweils ähnliche Domänenstrukturen vorhergesagt wurden. Manche dieser Spezies hatten entweder mehrere, andere nur eines dieser homologen Proteine. Sofern mehrere dieser Proteine vorhanden waren, waren die sie kodierenden Gene meist im Genom verteilt und nicht auf eine Stelle fokussiert. In Tabelle 27 sind homologe Sequenzen von den Sat-Proteinen des SC1 von IBT 40293 (S) mit *Eutypa lata* UCREL1 aufgeführt. Es wurden keine Homologien mit Sat2, Sat8 und Sat9 gefunden. Gene, die für die homologen Proteine von Sat5 bis Sat7 kodieren, befinden sich als benachbarte Gene im Scaffold EL1_03_scaffold_1050.

Tabelle 27: Homologe Sequenzen mit Proteinen des SC1 von IBT 40293 (S) mit *Eutypa lata* UCREL1

Sat-Protein	Sequenz_ID	Identität	Accession-Nummer / Scaffold
Sat1	EMR65633.1	50 %	KB706815.1 / EL1_03_scaffold_1477
Sat3	EMR71422.1	67 %	KB705644.1 / EL1_03_scaffold_306
Sat4	EMR66051.1	54 %	KB706720.1 / EL1_03_scaffold_1382
Sat5	EMR67658.1	55 %	KB706388.1 / EL1_03_scaffold_1050
Sat6	EMR67661.1	51 %	KB706388.1 / EL1_03_scaffold_1050
Sat7	EMR67660.1	59 %	KB706388.1 / EL1_03_scaffold_1050
Sat10	EMR68614.1	29 %	EL1_03_scaffold_865 KB706203.1 /

Ein weiteres Beispiel hierfür ist *S. elegans*. Die homologen Proteine sind hier Sat1, Sat2 und Sat3 (IDS: IDs: KAH7316935.1, KAH7303828.1, und KAH7323111.1) mit einer Identität von 70 – 88 % und einer Coverage von 86 – 100 %. Ähnliche Ergebnisse konnten für die Proteinsequenzen der SC2-Gene für *Monosporascus* gefunden werden. In diesem Fall waren diese Gene zudem in Clustern angeordnet.

Monosporascus cannonballus besitzt einen Cluster, der die benachbarten Gene beinhaltet, welche für Sat14 (RYO94656.1) und Sat15 (RYO94655.1) kodieren. Ein weiterer Cluster schließt zehn mutmaßliche Trichodiensynthasegene ein; dazu gehören die Gene, die für Sat11 (RYO75587.1), Sat12 (RYO75582.1), Sat13 (RYO75583.1) und Sat16 (RYO75586.1) kodieren. Diese Organisation zeigt sich beispielsweise in dem Genom von *Monosporascus* sp. 5C6A.

Zudem konnten weitere homologe Sequenzen der von SC3 kodierenden Proteine (Sat17 – Sat21) in diversen Pilzspezies gefunden werden. Darunter zählt *Xylaria grammica*. Diese Gattung hat Gegenstücke der fünf SC3-Proteine. Dabei sind vier davon in einem Cluster zu finden (EKO27_g10813, EKO27_g10814, EKO27_g10815 und EKO27_g10816). Lediglich das Gen, das für das dem Sat17 ähnliche Protein (EKO27_g994) kodiert, befindet sich an einer anderen Stelle im Genom.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es diverse homologe Proteinsequenzen, die den Proteinen ähnlich sind, die von SC2 kodiert werden, gibt. Cluster konnten jedoch nur für Homologe der SC2- und SC3-kodierten Proteine gefunden werden.

Die Proteine, die vom AC1 kodiert werden, lassen sich neben *S. chartarum* auch in dem Stamm IBT 40285 von *S. chlorohalonata* finden, der ebenfalls die Fähigkeit zur Atranonproduktion hat (ANDERSEN et al., 2002). Dieser Stamm wurde in der Arbeit von SEMEIKS et al. (2014) ebenfalls als Atranonproduzent zur Untersuchung der Clusterbildung von *Stachybotrys* herangezogen. Der AC1 von IBT 40288 (A – *S. chartarum*) und von IBT 40285 (*S. chlorohalonata*) ist ähnlich aufgebaut, mit dem Unterschied, dass IBT 40285 nur 13 Atranongene hat. Die Identität der Proteinsequenzen dieser beiden Stämme ist hoch und liegt zwischen 91 und 98 %.

Zudem konnten weitere Proteine anderer Pilzspezies ausgemacht werden, die Ähnlichkeiten mit den von AC1 kodierten Proteinen haben. Dazu zählen unter anderem diverse *Fusarium* und *Aspergillus* Spezies. Die Identität ist allerdings niedrig und liegt in den meisten Fällen zwischen 40 und 60 %. Oft fanden sich ähnliche Domänenstrukturen, ein Hinweis für Clusterbildung der entsprechenden Gene konnte jedoch nicht gesehen werden.

1.3.1. Satratoincluster 1 (SC1)

Die SC1 der Stämme IBT 7711 (S) (29.996 bp), IBT 40293 (S) (29.998 bp) und 51-

11 (28.909 bp) weisen eine ähnliche Länge und starke Ähnlichkeiten ihrer Sequenzen auf (siehe Tabelle 28). Laut SEMEIKS et al. (2014) beinhaltet der SC1 zehn Gene (*sat1* bis *sat10*) (Abbildung 15 Feld A). IBT 7711 (S), IBT 40293 (S) und 51-11 weisen einen vollständigen SC1 auf. Nur dem Stamm 51-11 fehlt das Gen *sat1*. Sonstige Lücken befinden sich ausschließlich in den nicht-kodierenden Bereichen.

Die verfügbare Sequenz von 51-11 upstream von SC1 ist mit 1.638 bp nur kurz. Im Vergleich dazu hat die entsprechende Sequenz von IBT 7711 (S) eine Länge von 4.564 bp und von IBT 40293 (S) eine Länge von 4.155 bp. Die Identität ist außerdem mit 85,7 % sehr hoch und somit in ihrer Sequenz gut konserviert.

Das Gen *sat1* von 51-11 ist nicht vorhanden. Deshalb wurde die Region upstream von *sat2* (mit einer Länge von 1.638 bp im Scaffold 31) näher analysiert. Es zeigte sich, dass eine kurze Sequenz mit 230 bp auch in anderen Stämmen zu finden ist: Zum einen im IBT 7711 (Scaffold 518) mit einer Identität von 87 % und einer Coverage von 100 %. Zum anderen im IBT 40293 (Scaffold 506) mit einer Identität von 89 % und einer Coverage von 97 %. Dieser Bereich deckt die Sequenz zwischen den Genen *sat2* und *sat1* (1.373 bp, Identität 99 %) und die letzten 35 bp von *sat1* ab (Identität 97 %) (siehe Abbildung 15).

Tabelle 28: Vergleich der genomischen Sequenzen, die SC1 von 51-11, IBT 40293 und IBT 7711 beinhalten (Scaffolds 31, 155 und 243)

Stamm-ID	upstream von SC1		SC1 genes (<i>sat1-10</i>)		downstream von SC1	
	Identität (%)	Lücken (%)	Identität (%)	Lücken (%)	Identität (%)	Lücken (%)
51-11 vs. IBT 40293	46.5	37.6	95.7	4.1	98.7	0.6
51-11 vs. IBT 7711	45.4	40.0	95.7	4.1	98.5	0.6
IBT 40293 vs. IBT 7711	85.7	11.7	99.8	0.0	99.3	0.1

Die Sequenzen downstream von SC1 haben bei allen drei S-Genotypen eine Länge von etwa 10.000 bp. Sie haben eine hohe Übereinstimmung ihrer Sequenz mit 98,7 % bis 99,3 % und einer Coverage von 100 %. Direkt downstream des SC1 werden Gene, die für zwei hypothetische Proteine kodieren, vorhergesagt. Diese wurden zum besseren Verständnis als SC1-down-1 (\cong S40293_09301) und SC1-down-2 (\cong S40293_09300) bezeichnet. Mittels BlastN wurde nach homologen Sequenzen in anderen Schimmelpilzen gesucht. Die einzige Übereinstimmung wurde bei *Purpureocillium (P.) lilacinum* Isolat PLBJ-1 (scaffold00012) gefunden. Die beiden hypothetischen Proteine lauten VFPBJ_11029 und VFPBJ_11030. Die Übereinstimmungen mit SC1-down-1 und SC1-down-2 liegen bei 77 % und 82 %. Die beiden Gene befinden sich in gleicher Ausrichtung wie in *Stachybotrys* nebeneinander im Genom von *P. lilacinum* PLBJ-1 und PLFJ-1. Bei dem Sequenzvergleich weiter upstream der beiden *Purpureocillium* Isolate zeigte sich zudem eine Übereinstimmung eines Gens mit *sat10* von *S. chartarum* von 73 %. Das entsprechende Protein von *P. lilacinum* (A0A179HJD5 mit 1265 AS) weist eine kürzere Aminosäuresequenz als das *Sat10* auf (KEY74377 mit 1930 AS). Beide Proteine haben jedoch die gleiche Anzahl von Ankyrin-Wiederholungen ($n = 16$). Aufgrund der Homologien und der konservierten Genanordnung kann davon ausgegangen werden, dass diese Sequenz entweder von oder an *P. lilacinum* durch horizontalen Gentransfer übertragen wurde.

Die hohen Übereinstimmungen der drei Stämme im SC1 und die übereinstimmenden Gensequenzen up- und downstream davon weisen auf einen gemeinsamen Insertionsort dieses Clusters hin. Die einzige abweichende Region liegt im Bereich upstream von SC1 im Stamm 51-11.

Der Vergleich der Sequenzen mit denen aus IBT 40288 (Genotyp A) zeigt stark homologe Bereiche downstream von SC1 (Scaffold 1204 von IBT 40288). Es zeigt sich ein vollständiges SC1-down-2-Gen mit einer Identität von 100 %. Das Gen SC1-down-1 ist mit 241 bp statt 3.691 bp nur als Fragment vorhanden. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde eine PCR verschiedener Stämme im Bereich downstream von SC1 durchgeführt (siehe IV.1.1.1). Im Gegensatz zum Bereich downstream konnten upstream keine Homologien zwischen IBT 40288 und den S-Genotypen gefunden werden.

Des Weiteren konnten keine Übereinstimmungen der Gensequenz upstream des unvollständigen SC1-down-1 von IBT 40288 mit den S-Genotypen gefunden

werden. Dies weist darauf hin, dass die beiden Gene, die für zwei hypothetische Proteine (S40288_06821 und S40288_11170) kodieren, Genotyp-A-spezifisch sind.

1.3.2. Satratoxincluster 2 (SC2)

Es wurden überdies Alignments der Sequenzen, die SC2 beinhalten, vorgenommen. (51-11: Scaffold 111, IBT 40293: Scaffold 902, IBT 7711: Scaffold 1258). Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 29 aufgeführt. Die Gensequenzen von *sat1* 1-16 sind in allen drei Stämmen mit 99,5 - 99,6 % sehr homolog. Alle Sequenzen zeigen zudem eine ähnliche Länge: 51-11: 19.876 bp, IBT 7711: 19.854 bp und IBT 40293: 19.873 bp. Die Sequenzen upstream von SC2 sind vergleichsweise kurz mit einer minimalen Länge von 772 bp bei IBT 7711 und einer Maximallänge von 2.133 bp bei 51-11. Auch die Sequenzen upstream zeigen mit 99,0 – 99,1 % eine hohe Übereinstimmung bei allen drei Stämmen. Downstream haben die Sequenzen der Stämme unterschiedliche Längen: 51-11: 8.737 bp, IBT 7711 bp: 2.775 und IBT 40293: 2.768 bp. All die Sequenzen sind jedoch hoch konserviert, was auf eine Insertion an derselben Stelle im Genom der drei Stämme hinweist. In den Bereichen up- und downstream sind bisher keine weiteren Gene annotiert. Der Vergleich dieser angrenzenden Sequenzen mit IBT 40288 (A) zeigte keine eindeutigen Ergebnisse.

Tabelle 29: Vergleich der Scaffolds, die SC2 beinhalten (51-11: Scaffold 111, IBT 7711: 1258, IBT 40293: 902)

Stamm-ID	upstream von SC2		Gene von SC2 (<i>sat11-16</i>)		downstream von SC2	
	Identität (%)	Lücken (%)	Identität (%)	Lücken (%)	Identität (%)	Lücken (%)
51-11 vs. IBT 40293	99.0	0.3	99.5	0.1	98.5	0.2
51-11 vs. IBT 7711	99.0	0.6	99.5	0.1	98.6	0.1
IBT 40293 vs IBT 7711	99.1	0.8	99.6	0.1	98.8	0.2

1.3.3. Satratoxincluster 3 (SC3)

Der SC3 ist bei den Stämmen IBT 7711 und IBT 40293 neben dem Core Trichodiensynthasecluster (CTC) gelegen. Aus diesem Grund wurde im Stamm 51-11 an dieser Position nach dem SC3 gesucht. Es konnten aber keine homologen Sequenzen downstream des CTC oder an einer anderen Stelle im Genom von 51-11 gefunden werden. Aus diesem Grund ist von einem Fehlen des SC3 in diesem Stamm auszugehen.

IBT 7711 und IBT 40293 zeigen beim Alignment, dass alle Gene des SC3 (*sat17* bis *sat21*) vollständig vorhanden sind und eine Identität von über 99,1 % aufweisen (siehe Abbildung 15 Feld C). Auch die Region upstream von SC3, die den CTC beinhaltet, weist alle Trichodiensynthasegene auf und hat eine Übereinstimmung von 99 %. Die Sequenzen downstream von SC3 sind sehr kurz mit 122 bp bei IBT 7711 und 112 bp bei IBT 40293, zeigen aber eine gute Konservierung.

Ein Alignment des Scaffolds, der die SC3 der jeweiligen S-Genotypen beinhaltet, mit den vorhandenen Sequenzen des IBT 40288 (A) weist, mit Ausnahme der Trichodiensynthasegene, keine homologen Sequenzen auf.

Überdies zeigen die Sequenzen downstream des CTC in 51-11 und IBT 40288 (A)

eine gute Konservierung der kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen. Die Länge der Sequenzen ist 273.615 bp (51-11) und 59.315 bp (IBT 40288) und weist eine Identität von 100 % auf.

Die beiden Gene, die sich bei 51-11 und IBT 40288 (A) downstream des CTC, befinden, konnten auch in IBT 7711 (S) und IBT 40293 (S) mit einer Übereinstimmung von 99 % gefunden werden (siehe dazu Abbildung 10 Feld C, braune Pfeile). Jedoch liegen diese Gene in den beiden S-Stämmen in einem anderen Scaffold als der CTC. Da die Gene im jeweiligen Scaffold aber am Rand der Sequenz liegen, war die Überlegung, ob die Scaffolds im Genom nebeneinander liegen könnten. Aus diesem Grund wurde eine PCR durchgeführt, die in Kapitel IV.1.1.2 näher beschrieben ist.

Diese PCR zeigte, dass die beiden Scaffolds 1 und 1543 in IBT im Genom nebeneinander liegen und nur durch 177 bp voneinander getrennt sind.

1.4. Atranoncluster 1 und 2

1.4.1. Atranoncluster 1 (AC1)

Eine BlastN Suche ergab, dass keiner der S-Genotypen die Gene des AC1 (*atr1-atr14*) aufweist. Lediglich eine 170 bp lange Promotorregion von *atr1* und eine Teilsequenz des *atr1* (*atr1*: Länge: 242 bp, Identität 80,4 % Coverage 42 %) wurden in IBT 40293 (S) und 51-11, jedoch nicht in IBT 7711, gefunden.

Dies bestätigt die Ergebnisse der Deep Resequencing Analyse (siehe IV.3.1.1), die zeigt, dass Teile des *atr1* in IBT 40293 (S) noch vorhanden sind. Für IBT 40293 (S) und 51-11 sind keine weiteren Informationen über die Sequenzen downstream von *atr1* vorhanden, da die jeweiligen Scaffolds (1474 und 47) an dieser Stelle enden.

Die Region upstream von AC1 in IBT 40288 (A) ist in allen *S. chartarum* Genomsequenzen vorhanden und gut konserviert (Identität 99 %). Bei IBT 7711 (S) ist die Region upstream von AC1 in zwei Scaffolds (Scaffold 1183 und 1150) unterteilt (siehe Abbildung 21). Es scheint, dass diese Scaffolds aufeinander folgen. Ein Hinweis dafür ist, dass die Sequenzen von IBT 40293 (S), IBT 40288 (A) und 51-11 in diesem Bereich durchgängig sind. Eine durchgeführte PCR konnte die Vermutung, dass die beiden Scaffolds von IBT 7711 (S) aufeinanderfolgen, aber nicht bestätigen.

Die Sequenzen downstream von AC1 sind mit Ausnahme von IBT 7711 (S) ebenfalls gut konserviert. Ein Unterschied ist die Sequenz, die für ein hypothetisches Protein (S40288_11253) kodiert. Diese wurde nur beim Genotyp A (IBT 40288) gefunden, nicht aber bei den S-Genotypen. Die Region mit Homologie zum downstream-Bereich von AC1 in IBT 40288 findet sich im 51-11 Genom in zwei Scaffolds. Die dargestellten Gene befinden sich aber nicht am Ende der genannten Scaffolds, weshalb sich diese Regionen vermutlich an unterschiedlichen Positionen im Genom befinden. Die Stelle, die die beiden Scaffolds trennt, scheint genau die zu sein, bei der in IBT 40288 (A) das Genotyp-A-spezifische Gen (S40288_11253) liegt.

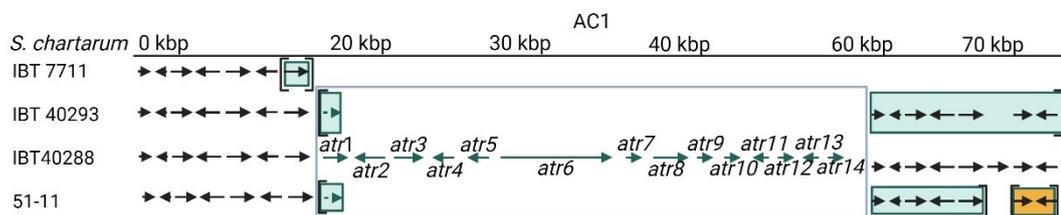


Abbildung 21: Region des Atratoncluster 1 und Bereiche up- und downstream der genannten vier Stämme. Gene sind als Pfeile gekennzeichnet. Die blau umrandete Region zeigt den AC1. Bereich mit rechteckigen Klammern: Sequenzen aus Scaffolds, die nicht den AC1 beinhalten. Gleiche Farben weisen auf einen gemeinsamen Scaffold in den jeweiligen Stämmen hin, aus ULRICH et al. (2022).

Um zu überprüfen, ob anderen Genome von *Stachybotrys* spp. Übereinstimmungen im AC1 aufweisen, wurden Analysen mit BlastN durchgeführt. Die hinterlegten Sequenzen von IBT 40288 (Genotyp A von *S. chartarum*) (Accession-Nummer: GCA_000732765.1) und dem *S. microspora* N1 (Accession-Nummer GCA_020085135.1) zeigten bei *atr1* und *atr3* bis *atr14* eine Identität von 89,00 bis 93,49 % sowie einer Coverage von 99 – 100 %. Das *atr2* Gen konnte aufgrund der fehlenden Annotierung in IBT 40288 (A) nicht beurteilt werden.

1.4.2. Atratoncluster 2 (AC2)

Der AC2 wurde von SEMEIKS et al. (2014) definiert. Dieser Cluster setzt sich aus sechs Genen zusammen, fünf von diesen sind in den drei S-Genotypen gut konserviert mit einer Identität von 88 % und einer Coverage von 99 % (siehe Abbildung 22 und Tabelle 30). Die Region downstream von AC2 unterlief in den einzelnen Stämmen signifikanten Veränderungen und Umorganisationen. Die

Identität liegt nur bei 51,1 – 74,5 % bei einer Coverage von 64,4 – 86,0 %. Die Gene in dieser Region downstream von AC2 sind in den S-Genotypen meist gut konserviert, jedoch auf verschiedene genomische Scaffolds verteilt (siehe Abbildung 22). Aufgrund fehlender Sequenzen konnte von den Regionen upstream von AC2 bisher kein Vergleich vorgenommen werden.

Es wurde eine intensivere Analyse der Proteinsequenzen von AC2 vorgenommen. Es zeigte sich eine Pho4 Domäne (InterPro entry IPR001204) im Protein S40288_09036 und ein Helix-Loop-Helix-Motiv in S40288_11459, die beide bereits von SEMEIKS et al. (2014) beschrieben wurden. Außerdem konnten fünf Transmembranregionen in S40288_11460 sowie eine LMWPc Domäne (pfam01451), die gewöhnlich in niedermolekularen Phosphatasen vorkommt, in S40288_09035 gefunden werden. Das eben genannte Protein zeigt sich nur in IBT 40288 (A).

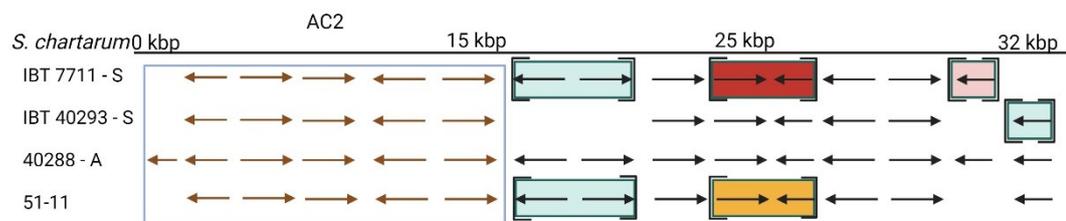


Abbildung 22: Sequenzen von AC2 und der Region downstream davon in IBT 7711, IBT 40293, IBT 40288 und 51-11. Gene sind als Pfeile dargestellt. Blau eingrahmt zeigt den AC2, welcher für die folgenden hypothetischen Proteine kodiert: S40288_09035, S40288_11459, S40288_09036, S40288_09037, S40288_09038 und S40288_11460 (von links nach rechts). Gene in eckigen Klammern sind nicht im Scaffold, der auch AC2 beinhaltet, sondern in anderen Scaffolds. Die gleiche Farbe eines Kastens weist auf einen Zusammenhang der Scaffolds in den jeweiligen Stämmen hin, aus ULRICH et al. (2022).

Tabelle 30: Vergleich der kodierenden Sequenzen der von AC2 kodierten hypothetischen Proteine und der Scaffolds, die homolog zum AC2 bzw. zu dessen flankierenden Bereichen im Genom von IBT 40288 sind (IBT 40288: Scaffold 123; 51-11: Scaffolds 4, 5 und 2; IBT 40293: Scaffolds 1203, 1206, und 386; IBT 7711: Scaffolds 1035, 142, 1199 und 500).

Stamm-ID	AC2		downstream von AC2	
	Durchschnittl. Identität (%)	Durchschnittl. Coverage (%)	Durchschnittl. Identität (%)	Durchschnittl. Coverage (%)
51-11	88.4	100	74.5	86.0
IBT 40293	89.2	98.8	54.1	64.4
IBT 7711	88.7	100	73.5	84.2

2. Bestätigung der Genotypen mittels Triplex-PCR

Um sicher zu gehen, dass die vier Stämme, die zur Deep Resequencing und Transkriptomanalyse herangezogen wurden, nicht kontaminiert sind und um deren Genotyp zu bestätigen, wurde eine Triplex-PCR nach ULRICH et al. (2020) durchgeführt. Abbildung 23 zeigt das Gelbild der durchgeführten PCR. Das größere DNA-Fragment zeigt eine Gensequenz von *sat19*. Dieses ist sowohl in den S- als auch in den H-Genotypen zu finden. Das kürzere DNA-Fragment spiegelt eine Sequenz im Bereich von *atr6* und *atr7* wider, die bei A- und H-Genotypen vorkommt.

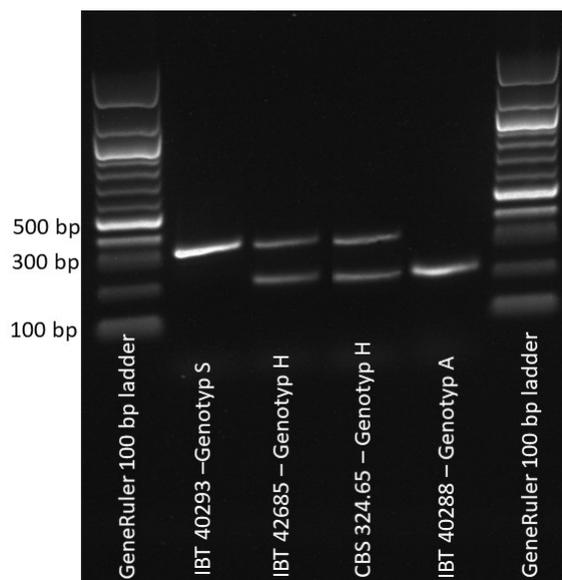


Abbildung 23: Gelbild der Triplex-PCR der Stämme IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) zur Bestätigung der Genotypen.

3. Deep Resequencing Analyse

Es wurde eine Deep Resequencing Analyse von den Stämmen IBT 40293 (S), IBT 42685 (H) und CBS 324.65 (H) durchgeführt. Die Analyse fokussierte sich auf die Genbereiche, bei denen angenommen wird, dass deren Expression essentiell für die Bildung von Satratoxinen (SC1 bis SC3) und Atranonen (AC1 und AC2) ist.

3.1. Coverage der Atranoncluster

3.1.1. Coverage des Atranoncluster 1 (AC1)

Für die Coverage Analyse des Atranoncluster 1 (AC1) wurde als Referenz auf die Genomsequenz des Stammes IBT 40288 (A) aus der NCBI Datenbank zurückgegriffen. Der Genbereich von AC1 befindet sich in Scaffold 1 (Accession Nummer KL659150) von IBT 40288 (A). Der AC1 reicht von 24.509 bp (*atr1*) bis 60.118 bp (*atr14*).

In Abbildung 24 lässt sich erkennen, dass die beiden H-Genotypen, IBT 42685 und CBS 324.65, eine vollständige Coverage der KL659150 aufweisen. Im Gegensatz zum IBT 40293, einem Genotyp-S, (vergleiche Abbildung 25) ist der AC1 hier vollständig vorhanden. Da keine Lücken zu erkennen sind, ist der KL659150 (mit AC1 inbegriffen) gut konserviert.

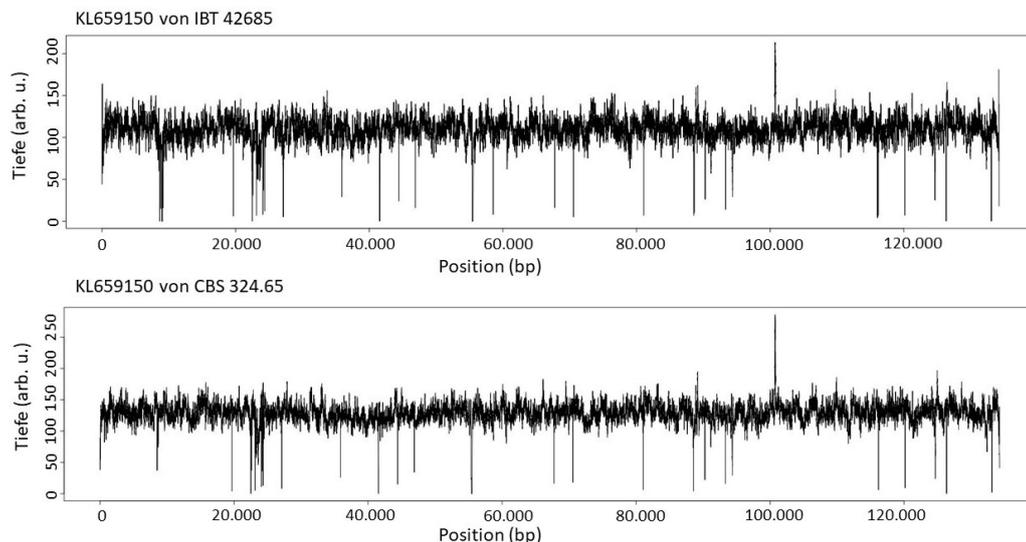


Abbildung 24: Coverage des KL659150 von IBT 42685 (H) und CBS 324.65 (H), (beinhaltet den AC1).

In Abbildung 25 zeigt sich, dass der AC1 im Genom von IBT 40293 (S) nicht vorhanden ist. Lediglich eine kurze Sequenz am Beginn des AC1 ist zu erkennen. Dies weist darauf hin, dass ein Teil des *atr1* noch vorhanden ist (siehe blaue

Markierung in Abbildung 25). Zudem zeigt die Abbildung 25, dass der Bereich up- und downstream von AC1, mit Ausnahme zweier Sequenzen, gut konserviert ist. Die Sequenzen mit fehlender Coverage reichen im KL659150 aus dem Referenzstamm IBT 40288 (A) von 70.513 bis 71.026 bp und 71.417 bis 73.403 bp. Im IBT 40288 (A) befindet sich an der zweiten Position (siehe grüner Pfeil in Abbildung 25) der kodierende Bereich für ein hypothetisches Protein mit der Bezeichnung S40288_11253 (71.829 bis 73.238 bp). Dieses Protein mit der Accession-Nummer KFA70679 zeigt Ähnlichkeiten mit dem hypothetischen Protein F4814DRAFT_136125 des Holzkohlenpilzes *Daldinia grandis* (Identität 50,23 %, Coverage: 90 %).

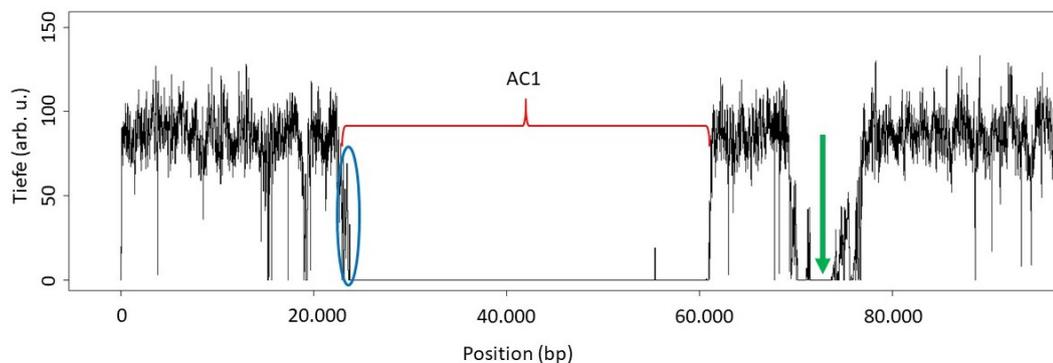


Abbildung 25: Ausschnitt der Coverage des KL659150 von IBT 40293 (S), welche den AC1 (rot markiert) beinhaltet, grüner Pfeil zeigt auf den Bereich, der für das hypothetische Protein S40288_11253 kodiert, der blau markierte Bereich spiegelt den Überrest von *atr1* wider, aus ULRICH et al. (2022).

3.1.2. Coverage des Atrononcluster 2 (AC2)

Für die Coverage Analyse des Atrononcluster 2 (AC2) wurde als Referenz ebenso auf die Genomsequenz des Stammes IBT 40288 (A) aus der NCBI Datenbank zurückgegriffen. Der Genbereich von AC2 befindet sich im KL656922 des Scaffold 123 von IBT 40288 (A). Die Position reicht von 2.926 bis 14.620 bp.

Die Coverage mit den IBT 40293 (S) Sequenzen zeigt, dass im KL656922 der AC2 vorhanden ist (siehe blau markierter Bereich in Abbildung 26). Der restliche Bereich dieser Sequenz weist aber nur eine geringe Tiefe und eine immer wieder lückenhafte Coverage auf, was auf schlecht konservierte Genbereiche hinweist (vergleiche Abbildung 26).

Abbildung 27 und Abbildung 28 zeigen die Coverage von KL656922 durch die Sequenzen der verwendeten H-Genotypen IBT 42685 und CBS 324.65. Der blau markierte Bereich stellt die Position von AC2 dar. In beiden Stämmen ist der AC2

vorhanden, wobei die Tiefe bei IBT 42685 höher ist. Die Coverage im KL656922 ist teilweise lückenhaft und nicht vollständig.

Das Muster weist in allen drei Stämmen Übereinstimmungen in der Coverage auf. Tendenziell ist die Coverage der H-Genotypen aber vollständiger als die von IBT 40293 (S).

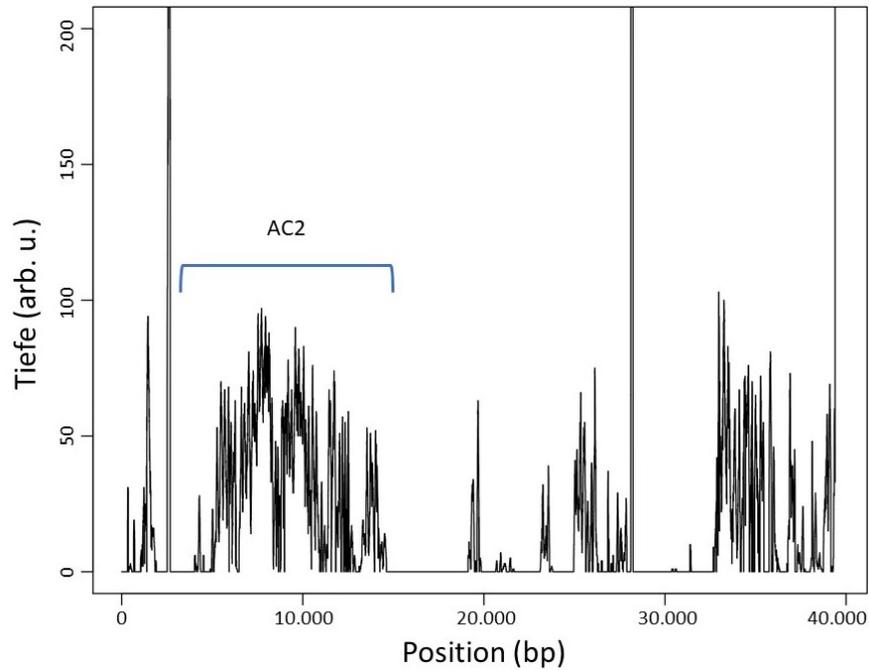


Abbildung 26: Coverage des KL656922 von IBT 40293 , welcher den AC2 (blau eingezeichnet) beinhaltet, aus ULRICH et al. (2022).

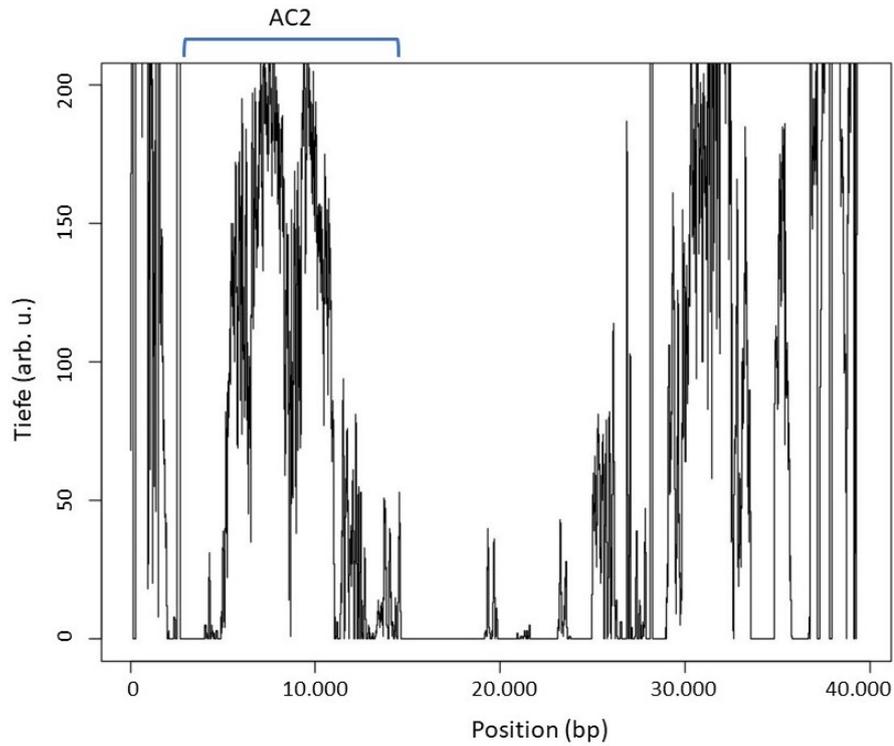


Abbildung 27: Coverage des KL656922 von IBT 42685 , welcher den AC2 (blau eingezeichnet) beinhaltet.

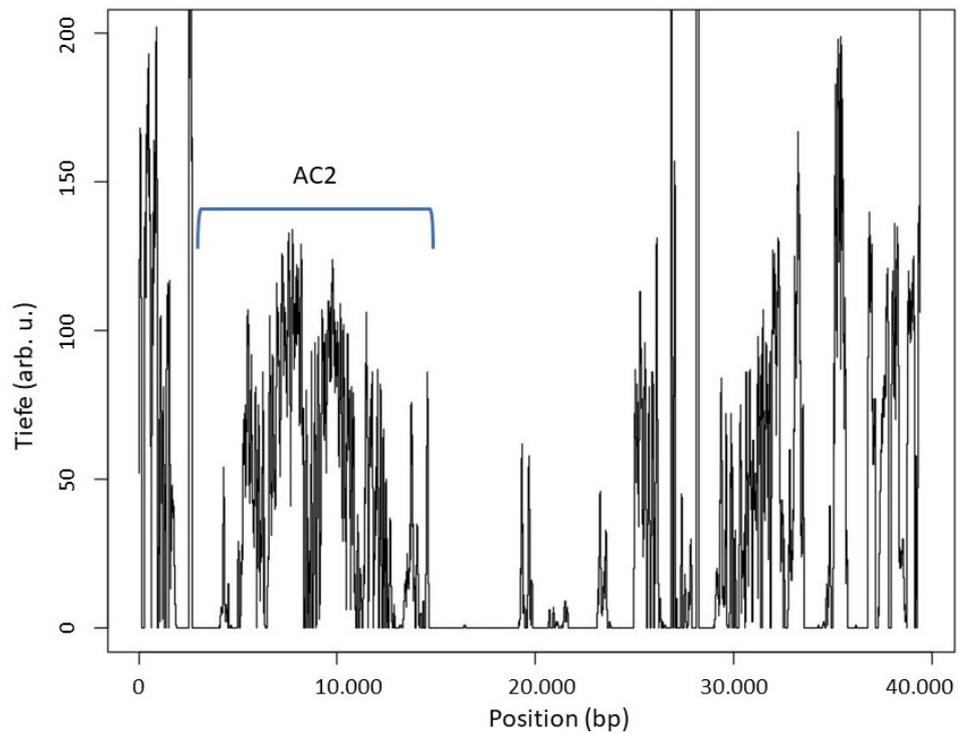


Abbildung 28: Coverage des KL656922 von CBS 324.65 , welcher den AC2 (blau eingezeichnet) beinhaltet.

3.2. Satratoxincluster 1 bis 3 (SC1 bis SC3)

Für die Satratoxincluster 1 - 3 (SC1 bis SC3) wurde als Referenz auf die Genomsequenzen des Stammes IBT 40293 (S) aus der NCBI Datenbank zurückgegriffen. Der SC1 liegt in KL650302, der SC2 in KL651028 und der SC3 in KL652499.

Da der Stamm identisch mit dem Referenzstamm ist, bestätigt die Coverage von IBT 40293 (S), dass die Satratoxincluster SC1 bis SC3 im verwendeten Stamm vorhanden sind (siehe Abbildung 29 A – C).

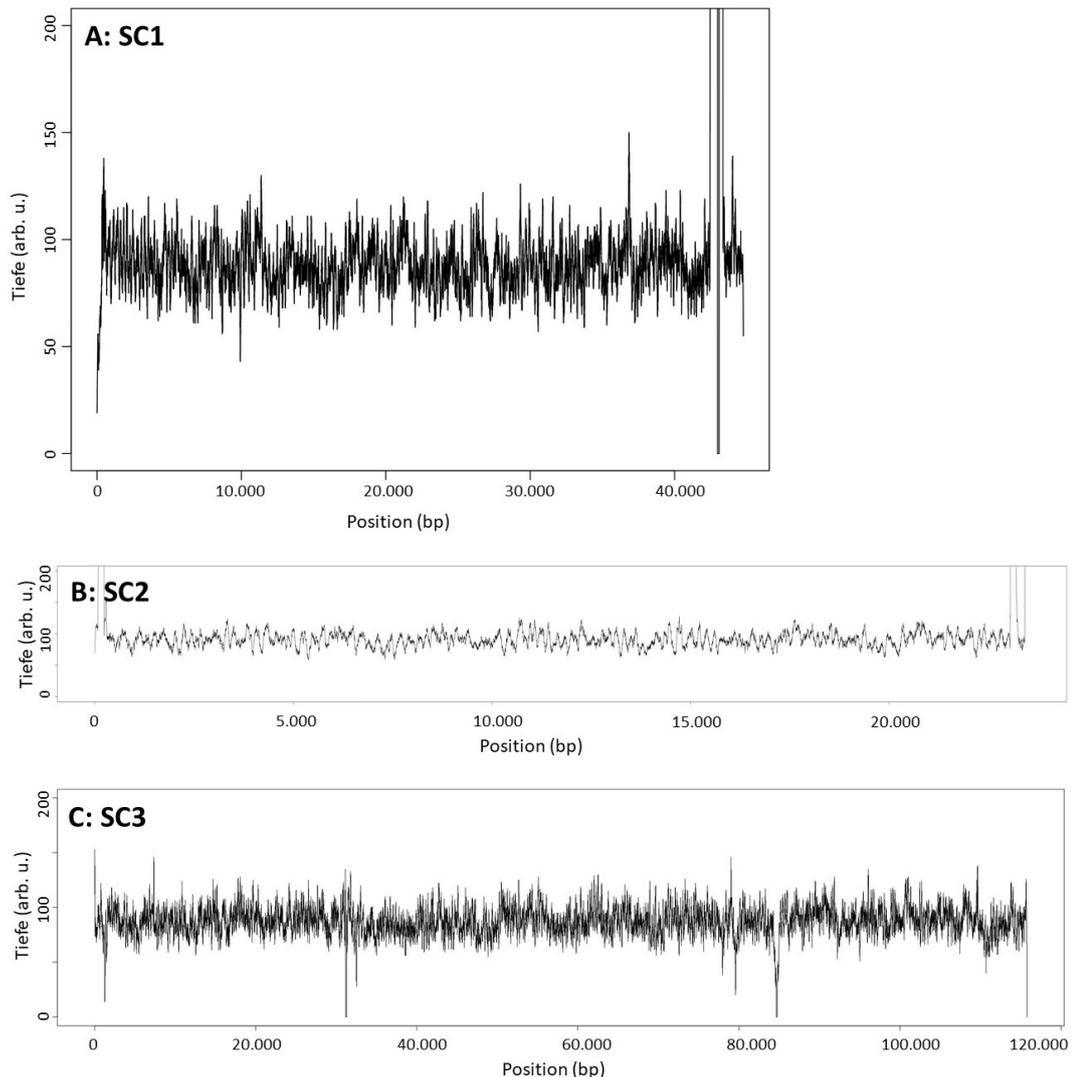


Abbildung 29: Coverage der KL650302, KL651028 und KL652499 von IBT 40293 (S). Bild A: Coverage des KL650302 (beinhaltet SC1) von IBT 40293 (S), Bild B: Coverage des KL651028 (beinhaltet SC2) von IBT 40293 (S) und Bild C: Coverage des KL652499 (beinhaltet SC3) von IBT 40293 (S), aus ULRICH et al. (2022).

Abbildung 30 (A – C) und Abbildung 31 (A – C) zeigen die Deep Resequencing Ergebnisse der Isolate CBS 324.65 (H) und IBT 42685 (H). Die Coverage zeigt,

dass KL650302 (Feld A) und KL652499 (Feld C), diese beinhalten SC1 und SC3, vollständig vorhanden sind. Jedoch haben die beiden H-Genotypen keine Coverage von KL651028 (B); in diesem Genbereich liegt der SC2 in IBT 40293 (S). Dies weist auf ein Fehlen des SC2 der H-Genotypen hin und bestätigt somit die bisherigen Teilgenesequenzierungen von ULRICH et al. (2020).

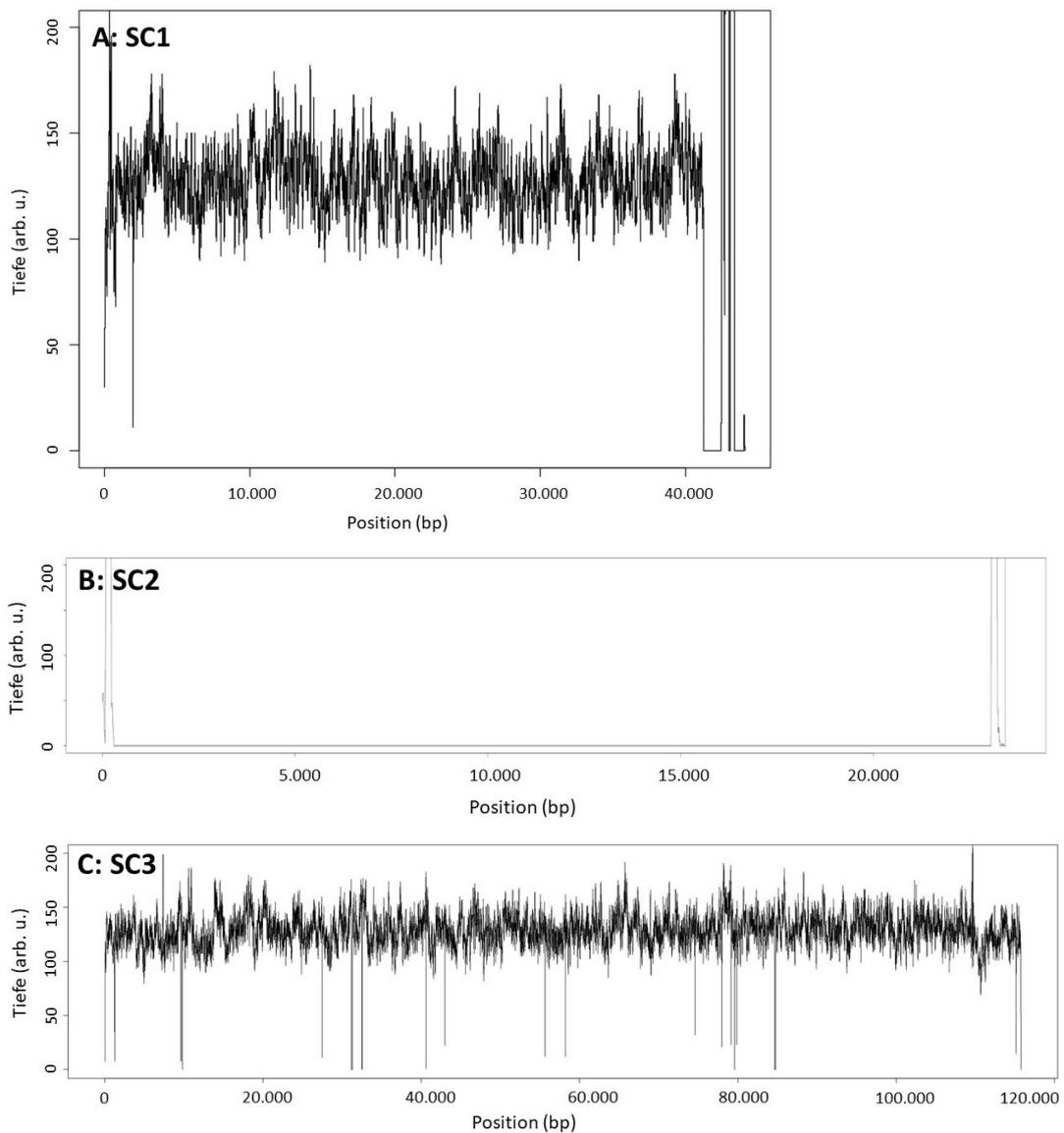


Abbildung 30: Coverage der KL650302, KL651028 und KL652499 von CBS 324.65 (H). Bild A: Coverage des KL650302 (beinhaltet SC1) von CBS 324.65 (H), Bild B: Coverage des KL651028 (beinhaltet SC2) von CBS 324.65 (H) und Bild C: Coverage des KL652499 (beinhaltet SC3) von CBS 324.65 (H).

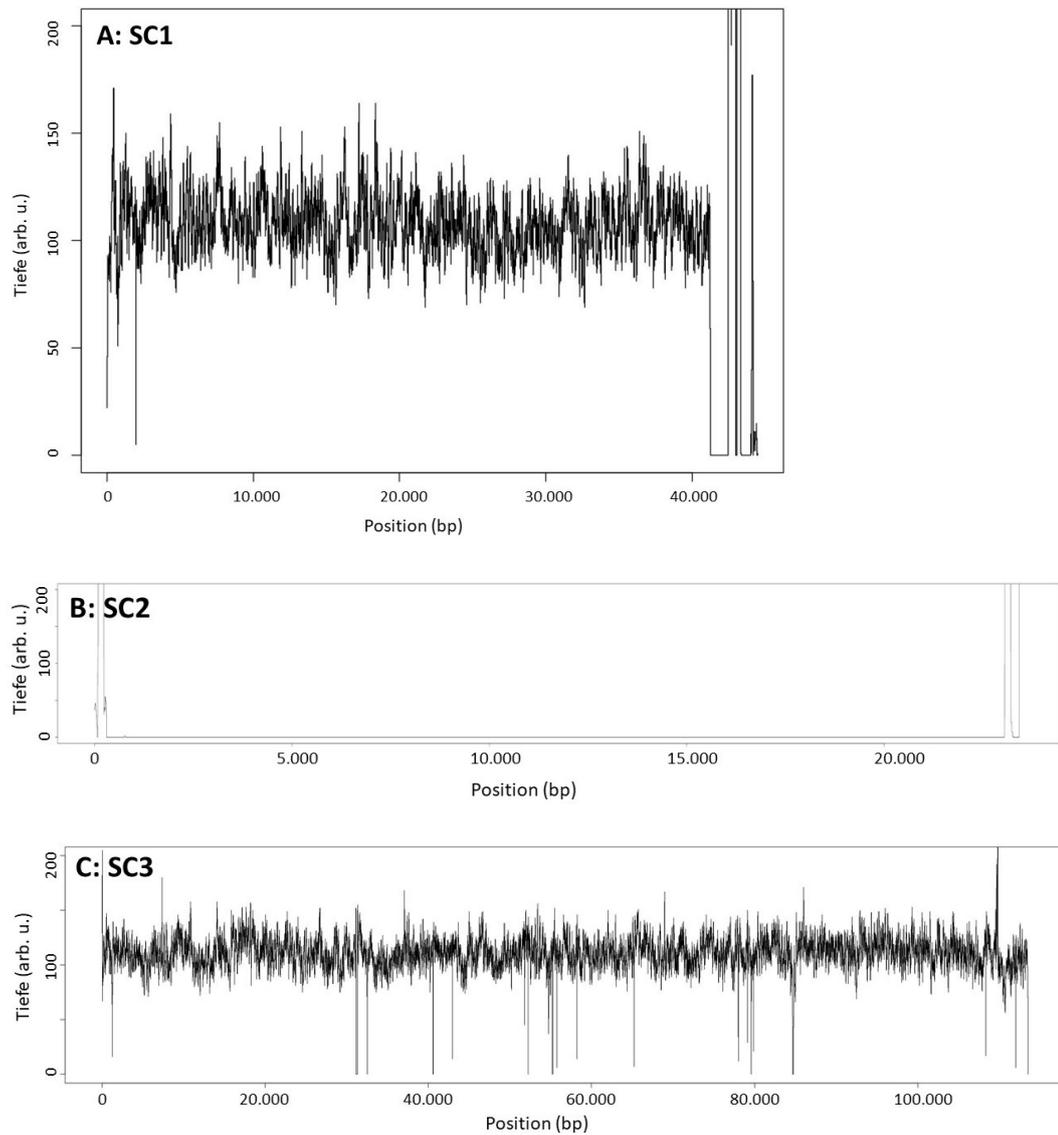


Abbildung 31: Coverage der KL650302, KL651028 und KL652499 von IBT 42685 (H). Bild A: Coverage des KL650302 (beinhaltet SC1) von IBT 42685 (H), Bild B: Coverage des KL651028 (beinhaltet SC2) von IBT 42685 (H) und Bild C: Coverage des KL652499 (beinhaltet SC3) von IBT 42685 (H).

4. Transkriptomanalyse

Es wurde eine Transkriptomanalyse der Stämme IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) durchgeführt. Das Ziel dieser Untersuchung war es, Informationen über die Höhe der Expression der Gene der verschiedenen Stämme zu erlangen. Der Fokus lag hierbei auf den Satratoxingenen (*sat1* bis *sat21*), den Atranongen (*atr1* bis *atr14*) sowie den *tri*-Genen im CTC (*tri3*, *tri4*, *tri5*, *tri6*, *tri10*, *tri11*, *tri14*, *tri17* und *tri18*). Die Stämme IBT 40293 (S) (Accession: PRJNA185808) und IBT 40288 (A) (Accession: PRJNA170468) auf NCBI wurden als Referenzstämme herangezogen.

4.1. Hauptkomponentenverfahren

Beim Hauptkomponentenverfahren (Englisch: PCA) wurden die einzelnen Proben anhand ihres Transkriptionsmusters gruppiert.

In Abbildung 32 ist der 2D PCA-Plot mit IBT 40293 (S) als Referenzgenom (Accession: PRJNA185808) dargestellt.

Die vier Stämme von *S. chartarum* zeigen in dem folgenden PCA-Plot eine klare Separierung, was auf die unterschiedlichen Genexpressionsmuster zurückzuführen ist. Gleichzeitig gruppieren sich die drei Replikate der Stämme, was als Qualitätsparameter angesehen werden kann.

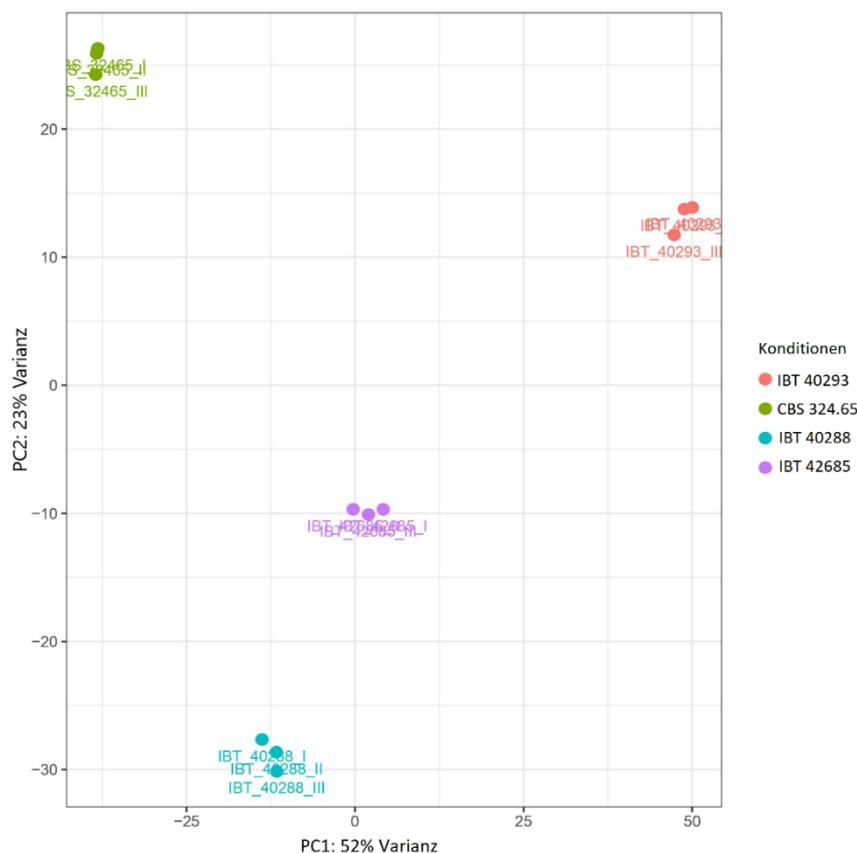


Abbildung 32: PCA-Plot 2D mit IBT 40293 (S) als Referenzgenom.

In Abbildung 33 ist der 2D PCA-Plot mit IBT 40288 (A) als Referenzgenom (Accession: PRJNA170468) zu sehen. Die drei Replikate der verschiedenen Stämme gruppieren sich auch in diesem Plot. In dieser Abbildung liegen die drei Replikate von IBT 40293 (S) und IBT 42685 (H) nahe zusammen. Wenn man jedoch den dazugehörigen 3D PCA-Plot (Ausschnitt davon in Abbildung 34) betrachtet, kann man erkennen, dass in dieser Ansicht die beiden Stämme weiter

voneinander entfernt sind, als es in der 2D-Ansicht scheint.

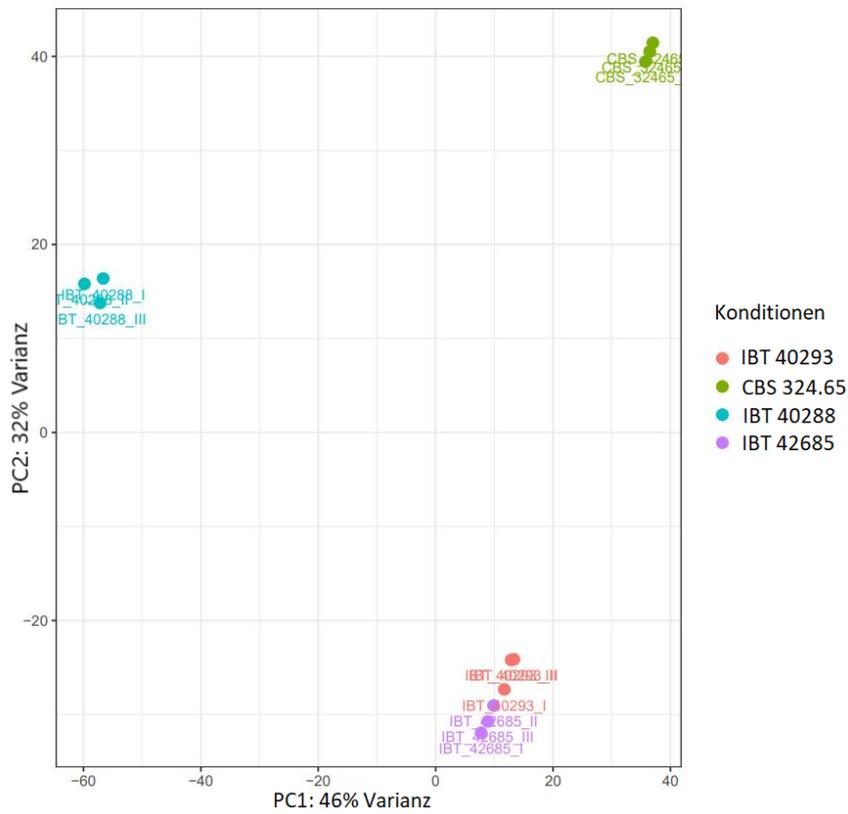


Abbildung 33: PCA-Plot 2D mit IBT 40288 (A) als Referenzgenom.

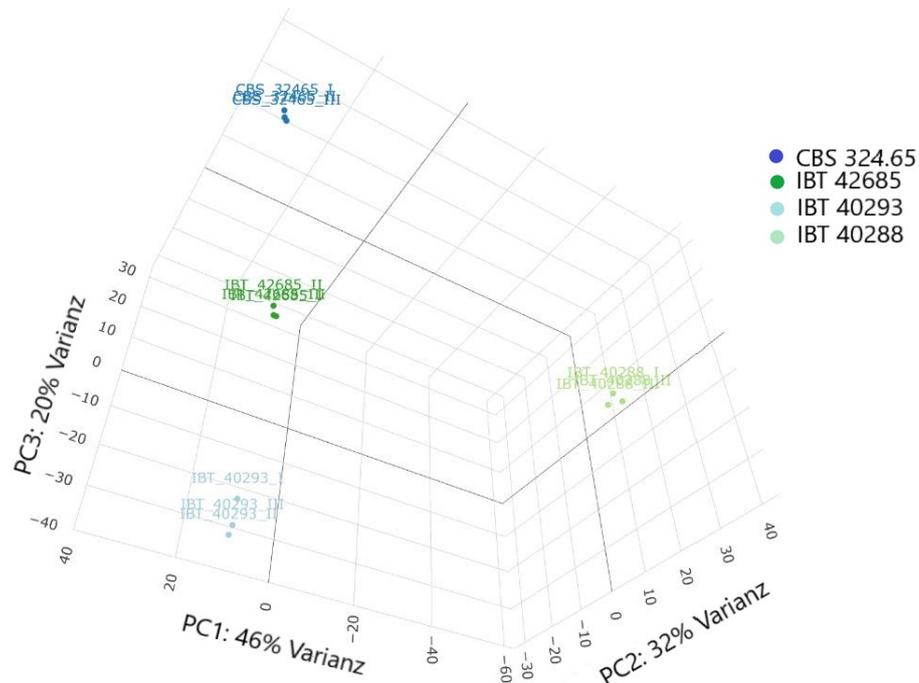


Abbildung 34: Ausschnitt des PCA-Plot 3D mit IBT 40288 (A) als Referenzgenom.

4.2. Satratoxincluster

Die Transkriptomanalyse der Satratoxingene (*sat1* bis *sat21*) soll überprüfen wie hoch die Expressionslevel in Genotyp S, H und A sind. Es ist von Interesse zu sehen, welche der Gene eine besonders hohe Transkription zeigen. Durch die Höhe der transkriptionellen Expression kann vermutlich ein Zusammenhang zum Expressionslevel der Proteine hergestellt werden.

4.2.1. Satratoxincluster 1

In Abbildung 35 sind die normalisierten Readcounts der Satratoxingene des SC1 (*sat1* bis *sat10*) als Balkendiagramm dargestellt. Es wurde jeweils ein Durchschnitt der normalisierten Readcounts der drei biologischen Replikate eines Isolates verwendet. Tabelle 31 zeigt dieselbe Anzahl der normalisierten Readcounts der Stämme in tabellarischer Form. Genotyp A (IBT 40288) zeigt keine Expression der SC1 Gene.

Das *sat1* Gen zeigt annähernd keine Expression in den beiden H-Genotypen. IBT 40293 (S) zeigt zudem keinerlei Transkription für dieses Gen. IBT 40293 (S) zeigt bei den Genen *sat6*, *sat7* und *sat10* eine signifikant höhere Genexpression als IBT 42685 (H). Im Gegensatz dazu zeigt IBT 42685 (H) nur im *sat1* eine signifikant höhere Expression als IBT 40293 (S). CBS 324.65 (H) hat bei den Genen *sat1*, *sat2*, *sat3* und *sat8* eine signifikant höhere Expression als der Genotyp S. IBT 40293 (S) dagegen zeigt nur bei *sat9* und *sat10* signifikant mehr Expression.

Generell kann man zusammenfassen, dass das Expressionsmuster bei den beiden H-Genotypen und dem Genotyp S im SC1 ähnlich ist. Lediglich *sat10* fällt mit einer deutlich höheren Expression (8.617 arb. u.) des Genotyp S auf. Die Gene *sat1* und *sat9* sind zudem tendenziell geringer transkribiert (0 bis 27,9 arb. u.).

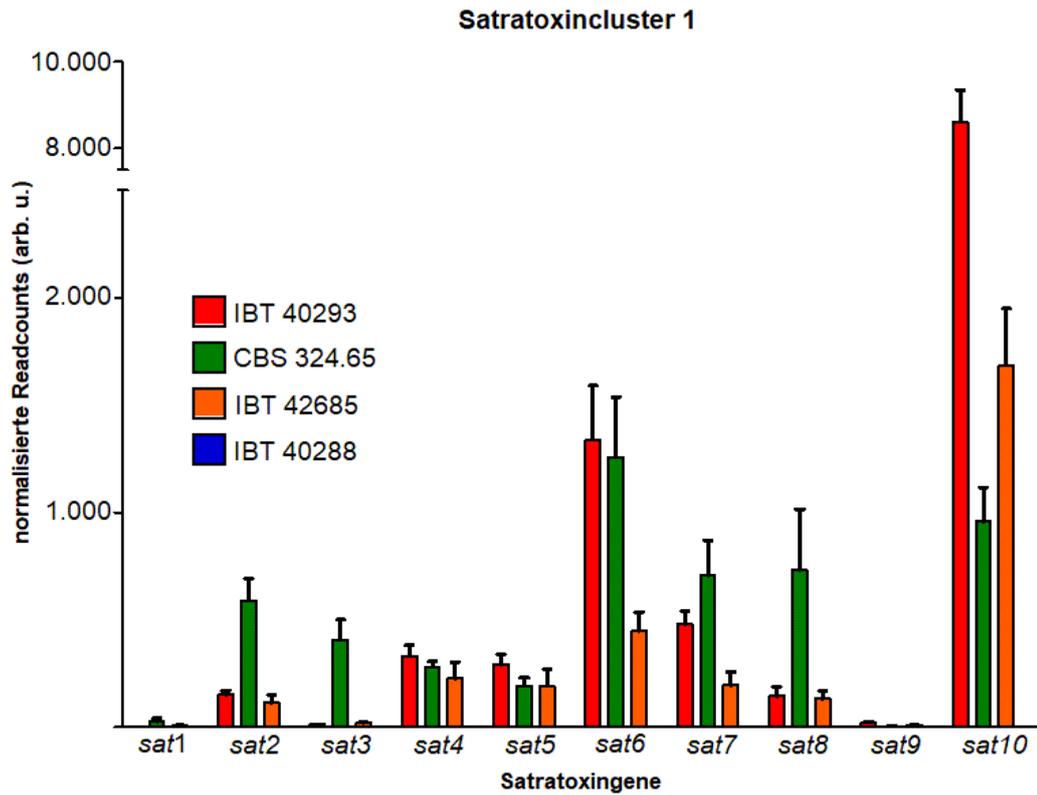


Abbildung 35: Reads der Satratoxingene (*sat1* bis *sat10*) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) mit Standardabweichung (arb. u. = normalisierte Readcounts).

Tabelle 31: Durchschnittliche Reads der Satratoxingene (*sat1* bis *sat10*) von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) im Vergleich

Satratoxingene	IBT 40293	CBS 324.65	IBT 42685	IBT 40288
<i>sat1</i>	0,0	27,9	9,8	0,0
<i>sat2</i>	151,6	590,9	115,3	0,0
<i>sat3</i>	13,1	409,3	20,7	0,0
<i>sat4</i>	332,3	281,9	229,0	0,0
<i>sat5</i>	292,4	193,3	192,4	0,0
<i>sat6</i>	1.339,9	1.258,8	448,9	0,0
<i>sat7</i>	481,3	707,8	197,4	0,0
<i>sat8</i>	144,9	733,4	133,3	0,0
<i>sat9</i>	24,9	6,2	9,5	0,0
<i>sat10</i>	8.617,0	957,8	1.686,8	0,0

4.2.2. Satratoxincluster 2

In Abbildung 36 und Tabelle 32 sind die normalisierten Readcounts für die Gene des SC2 (*sat11* bis *sat16*) dargestellt. Da der SC2 laut bisherigen PCR- und Genomergebnissen nicht im Genom der Genotypen A und H vorkommt, liegt die Expression hier jeweils bei null Reads. IBT 40293 als Vertreter des Genotyp S zeigt eine Expression vor allem bei *sat11* bis *sat14*, *sat15* und *sat16* haben dagegen annähernd keine Expression.

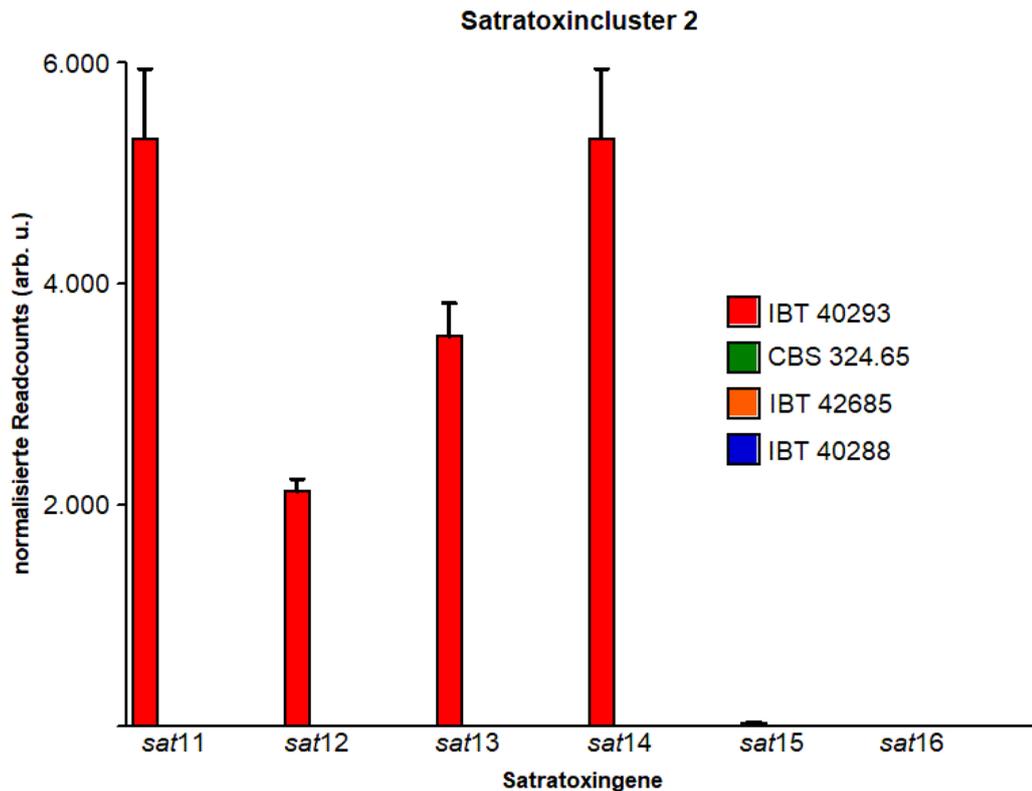


Abbildung 36: Reads der Satratoxingene (*sat11* bis *sat16*) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) mit Standardabweichung (arb. u. = normalisierte Readcounts).

Tabelle 32: Durchschnittliche Reads der Satratoxingene (*sat11* bis *sat16*) von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) im Vergleich

Satratoxingene	IBT 40293	CBS 324.65	IBT 42685	IBT 40288
<i>sat11</i>	5.313,1	0,0	0,0	0,0
<i>sat12</i>	2.124,5	0,0	0,0	0,0
<i>sat13</i>	3.525,6	0,0	0,0	0,0
<i>sat14</i>	5.313,1	0,0	0,0	0,0
<i>sat15</i>	33,9	0,0	0,0	0,0
<i>sat16</i>	0,4	0,0	0,0	0,0

4.2.3. Satratoincluster 3

Abbildung 37 und Tabelle 33 sind die Readcounts der vier Isolate zu entnehmen. Wie bereits in SC1 und SC2 zeigt IBT 40288 (A) keine Expression der aufgeführten Gene. Auch die beiden H Genotypen (CBS 324.65 und IBT 42685) zeigen keine hohe Expression im SC3. Lediglich CBS 324.65 zeigt bei *sat21* normalisierte Readcounts von durchschnittlich 79,8 arb. u.. IBT 40293 (S) hat die höchsten Expressionen (828,7 und 755,1 arb. u.) bei *sat17* und *sat20*. Die anderen drei Gene sind mit 12,3, 44,1 und 219,1 arb. u. deutlich geringer in ihrer Transkription.

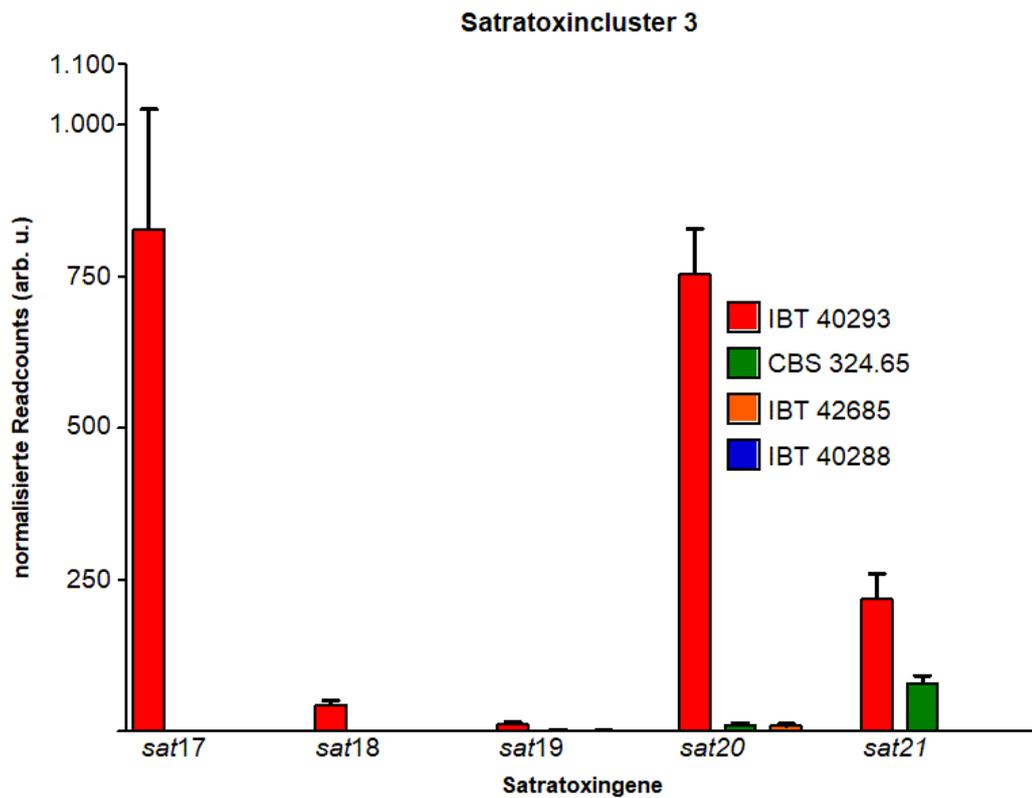


Abbildung 37: Reads der Satratoinogene (*sat17* bis *sat21*) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) mit Standardabweichung (arb. u. = normalisierte Readcounts).

Tabelle 33: Durchschnittliche Reads der Satratoinogene (*sat17* bis *sat21*) von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) im Vergleich

Satratoinogene	IBT 40293	CBS 324.65	IBT 42685	IBT 40288
<i>sat17</i>	828,7	0,0	0,0	0,0
<i>sat18</i>	44,1	0,0	0,5	0,0
<i>sat19</i>	12,3	1,5	2,0	0,0
<i>sat20</i>	755,1	10,3	9,1	0,0
<i>sat21</i>	219,1	79,8	0,0	0,0

4.3. Atranoncluster 1

Die Gene des Atranoncluster 1 kodieren für Proteine, die zur Produktion von Atranonen benötigt werden. In Abbildung 38 und Tabelle 34 sind die Ergebnisse der Transkriptomanalyse als Balkendiagramm und in Tabellenform dargestellt. IBT 40288 (A) und IBT 42685 (H) zeigen in allen Atranongenen ein ähnlich hohes Expressionsmuster. Diese beiden Isolate sind jeweils signifikant höher exprimiert als CBS 324.65 (H) und IBT 40293 (S). Bei dem Isolat IBT 40293 (S) sind eigentlich keine Reads zu erwarten, da dieser Stamm keine Atranongene besitzen sollte. Jedoch liegt die Expression der Atranongene von IBT 40293 (S) zwischen Null und 15,1 normalisierten Readcounts.

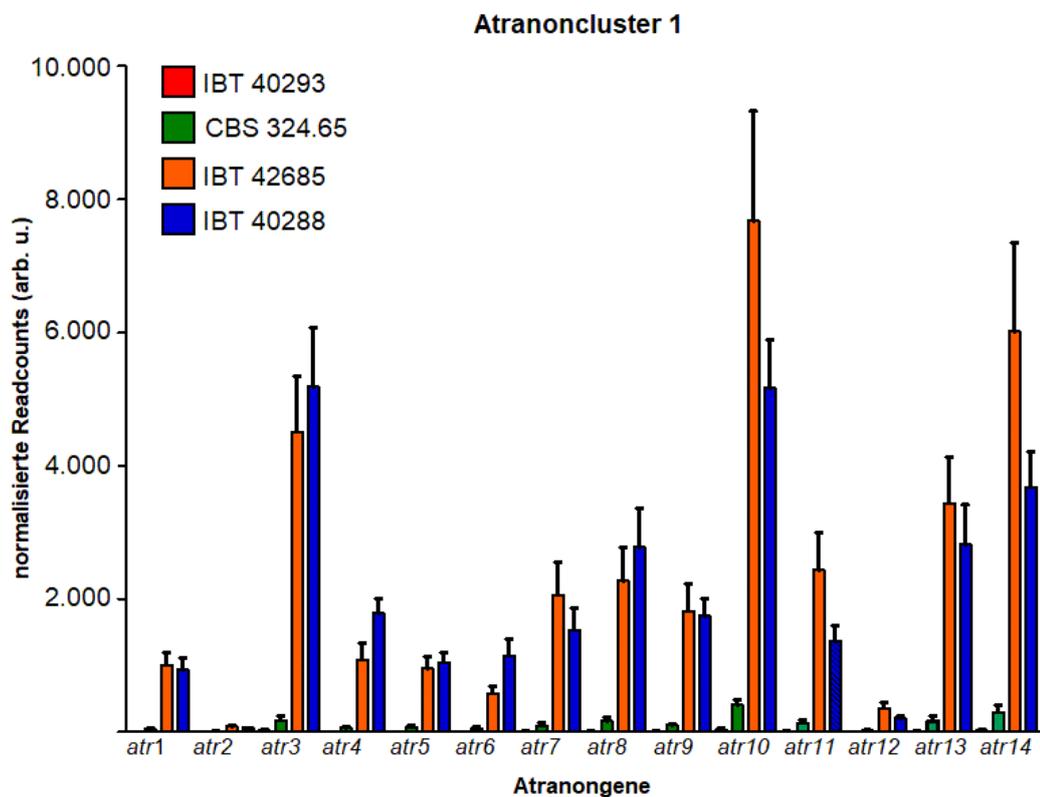


Abbildung 38: Reads der Atranongene (*atr1* bis *atr14*) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) mit Standardabweichung (arb. u. = normalisierte Readcounts).

Tabelle 34: Durchschnittliche Reads der Atranogene (*atr1* bis *atr14*) von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) im Vergleich

Atranogene	IBT 40293	CBS 324.65	IBT 42685	IBT 40288
<i>atr1</i>	1,7	41,6	1008,0	931,3
<i>atr2</i>	0,0	12,0	87,9	61,0
<i>atr3</i>	23,7	180,6	4509,4	5191,2
<i>atr4</i>	1,6	62,1	1091,3	1781,5
<i>atr5</i>	2,2	76,5	953,4	1046,1
<i>atr6</i>	1,9	58,0	577,8	1147,1
<i>atr7</i>	7,0	95,6	2054,7	1537,4
<i>atr8</i>	10,1	167,1	2267,5	2776,3
<i>atr9</i>	8,8	111,2	1818,0	1749,2
<i>atr10</i>	35,1	414,2	7675,7	5168,8
<i>atr11</i>	9,2	138,7	2436,3	1369,6
<i>atr12</i>	1,2	25,4	359,2	203,5
<i>atr13</i>	14,5	171,5	3440,9	2821,9
<i>atr14</i>	24,3	297,8	6019,6	3678,5

4.4. *tri*-Gene

Die *tri*-Gene liegen laut SEMEIKS et al. (2014) im Core Trichothecencluster (CTC). Ein Teil dieser Gene wird vermutlich benötigt, um die Trichothecenproduktion zu katalysieren. Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse ergaben, dass IBT 40293 (S) *tri3*, *tri5*, *tri11* und *tri14* signifikant mehr als die anderen drei Stämme exprimiert, dagegen zeigen *tri17* und *tri18* in allen Stämmen kaum Transkription mit normalisierten Readcounts unter 13 arb. u.. IBT 40288 (A) zeigt seine höchste Expression mit 1.782,1 arb. u. im *tri10*. Außer bei *tri6* und *tri10* zeigen die beiden H-Genotypen kaum Expression im CTC. Generell zeigt IBT 40293 (S) im Schnitt die höchsten Expressionswerte.

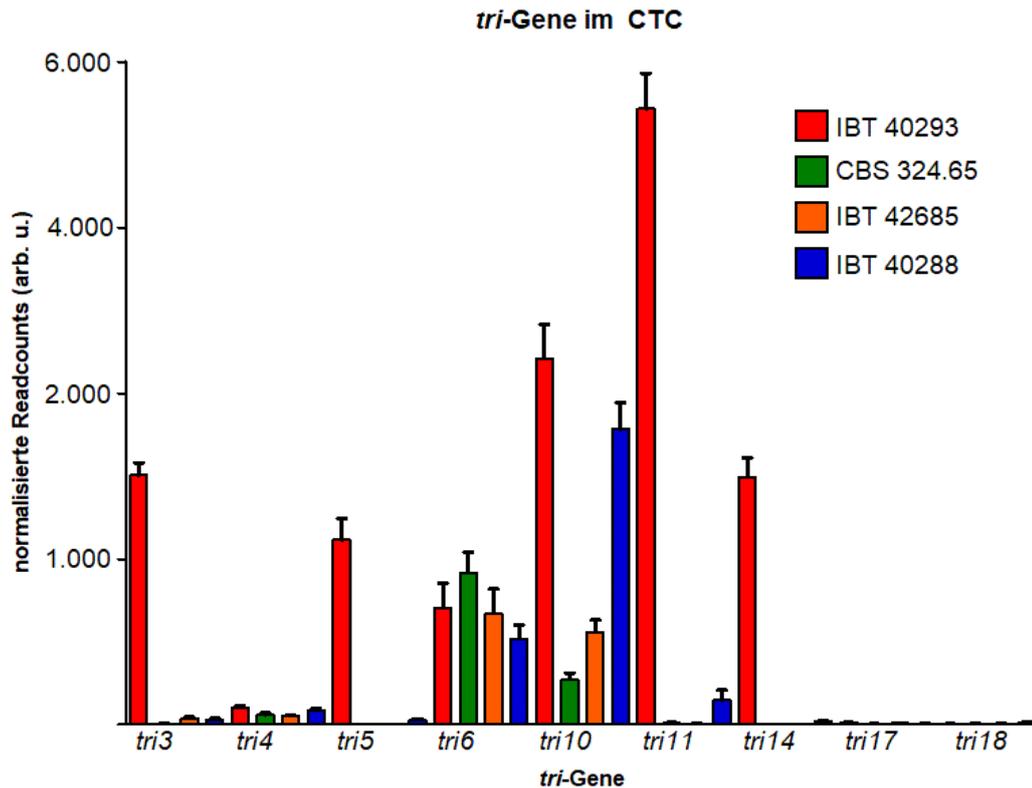


Abbildung 39: Reads der *tri*-gene (*tri3*, *tri4*, *tri5*, *tri10*, *tri11*, *tri14*, *tri17* und *tri18*) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) mit Standardabweichung (arb. u. = normalisierte Readcounts).

Tabelle 35: Durchschnittliche Reads der *tri*-gene (*tri3*, *tri4*, *tri5*, *tri6*, *tri10*, *tri11*, *tri14*, *tri17* und *tri18*) der drei biologischen Replikate von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) im Vergleich

Tri-Gene	IBT 40293	CBS 324.65	IBT 42685	IBT 40288
<i>tri3</i>	1.506,5	7,2	39,3	32,4
<i>tri4</i>	102,2	59,7	53,2	88,0
<i>tri5</i>	1.114,7	0,0	0,3	30,4
<i>tri6</i>	704,5	914,7	671,7	516,3
<i>tri10</i>	2.211,0	272,5	559,0	1.782,1
<i>tri11</i>	3.716,0	8,7	3,0	146,9
<i>tri14</i>	1.492,3	0,0	1,3	20,7
<i>tri17</i>	11,6	5,5	8,7	7,4
<i>tri18</i>	4,5	4,9	8,1	12,4

5. Zytotoxizitätstest mittels Zellkultur

Die Zytotoxizitätstests wurden durchgeführt, um den Einfluss der Toxinextrakte der verschiedenen Genotypen auf PK15-Zellen zu testen. Durch das Zellverhalten sowie die Viabilität der Zellen lässt sich so ein Rückschluss auf die Toxizität der jeweiligen Genotypen ziehen.

5.1. Zytotoxizitätstest

Bei diesem Zytotoxizitätstest wird der Einfluss der Toxinextrakte von IBT 40293 (S), IBT 42685 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) auf PK15-Zellen unspezifisch bestimmt. Da die Toxinextrakte in Methanol gelöst waren, wurde Methanol zusätzlich als Kontrolle eingesetzt, um auszuschließen, dass das Methanol bereits Einfluss auf die Zellen hat. Auf Bild a der Abbildung 40 kann man erkennen, dass die Zellen (ohne Methanol oder Toxinzugabe) nach 24 Stunden, wie für diese Zellen typisch, einen adhärenen Zellrasen gebildet haben. Auch durch eine Zugabe von 5 µl Methanol 100 % bildeten die PK15-Zellen, innerhalb von 24 Stunden Inkubationszeit, einen Zellrasen (siehe Abbildung 40, Bild b). Somit scheint das 100 %ige Methanol, in dem die Toxine der einzelnen Stämme gelöst sind, keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellen zu nehmen. Die PK15-Zellen (Bild c), die mit 5 µl des Toxinextraktes von IBT 40293 (S) versetzt wurden, zeigten die größten Veränderungen. Die Zellen waren nicht adhären und die einzelnen Zellen blieben in ihrer Form kugelig. Diesen kugeligen Charakter zeigen die Zellen ansonsten beispielsweise nach der Behandlung mit Trypsin, sobald sie vom Boden gelöst werden. Das Toxinextrakt von Genotyp S scheint die Zellen daran zu hindern einen Monolayer auszubilden. Bei Zugabe der Toxinextrakte der Stämme IBT 42685 (Bild d) und CBS 324.65 (Bild e), die dem Genotyp H zugeordnet werden, bildeten die Zellen nach 24 Stunden keinen konfluenten Zellrasen. Bild f zeigt PK15 Zellen, welche mit dem Toxinextrakt von Genotyp A (IBT 40288) versetzt wurden. Diese Zellen verhielten sich ähnlich wie die Zellen in Bild d und e, jedoch war der Zellrasen dichter ausgebildet als bei den beiden H- Genotypen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Toxinextrakt von Genotyp S die PK15-Zellen am stärksten in ihrem Verhalten beeinflusst hat, da die Zellen kugelförmig in Suspension blieben (Abbildung 40 Bild c). Die Zellen, die einem Toxinextrakt von Genotyp A oder H von *S. chartarum* ausgesetzt waren, waren in ihrem Wachstum inhibiert, da sie im Vergleich zum Negativ- und Kontrollansatz

(siehe Abbildung 40 Bild a und b) keinen konfluenten Zellrasen ausgebildet haben (Bild e bis f).

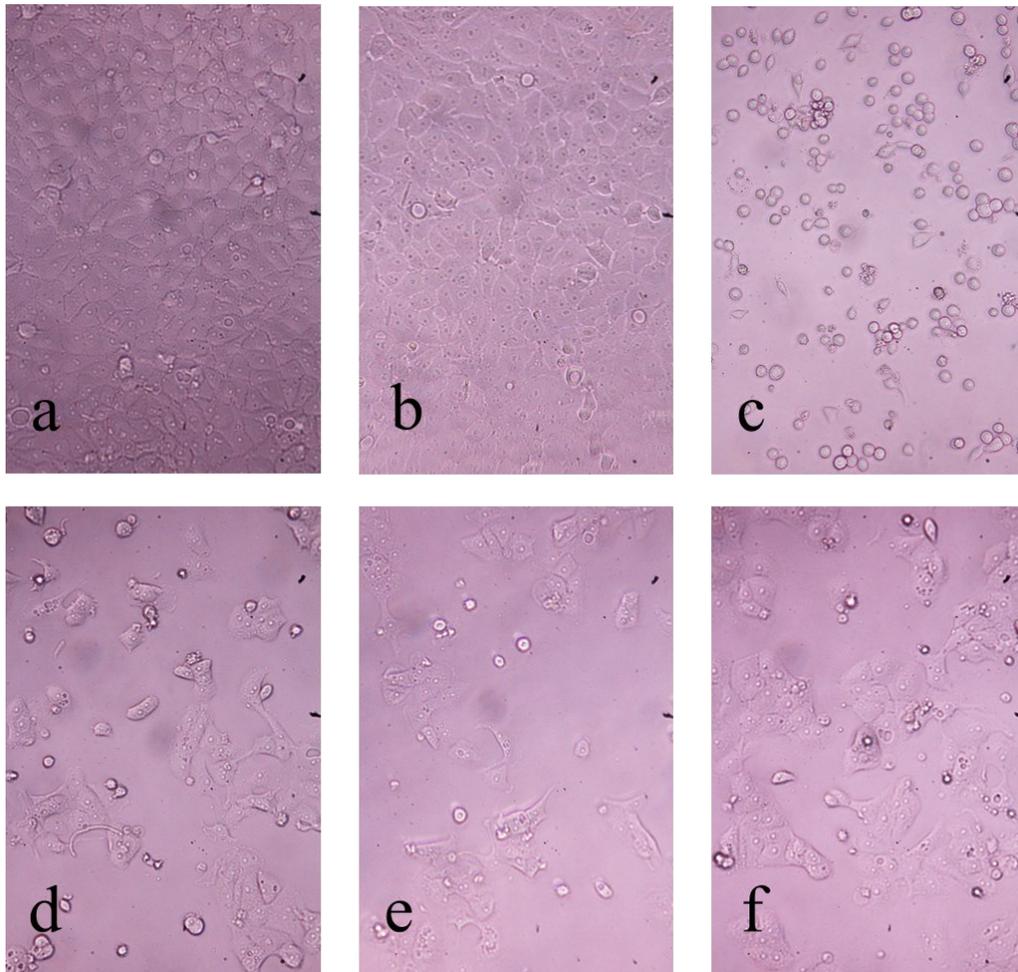


Abbildung 40: Ergebnisse des Zytotoxizitätstests mittels Zellkultur. a: Negativkontrolle; adhärente Zellen und konfluenter Zellrasen gebildet von PK15-Zellen ohne Zugabe von Methanol oder Toxinextrakt; b: PK15-Zellen 24 Stunden nach Zugabe von 5 µl Methanol; c - f: PK15-Zellen 24 Stunden nach Zugabe der verschiedenen Toxinextrakte; c: Toxinextrakt von IBT 40293; d: Toxinextrakt von IBT 42685; e: Toxinextrakt von CBS 324.65; f: Toxinextrakt von IBT 40288.

Bei dem vorangegangenen Versuch wurde deutlich, dass das Toxinextrakt von IBT 40293 (Genotyp S) den stärksten Effekt auf die PK15-Zellen genommen hat. Die Pilzkulturen wurden vor der Extraktion auf PDA angezüchtet. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte durch das verwendete Nährmedium hervorgerufen wurden, wurde IBT 40293 (S) auf Reis angezüchtet und extrahiert.

Die Zellen, die mit diesem Toxinextrakt der Reiskultur behandelt wurden, blieben ebenfalls in Suspension, waren kugelförmig und wurden nicht adhärent (siehe Abbildung 41).

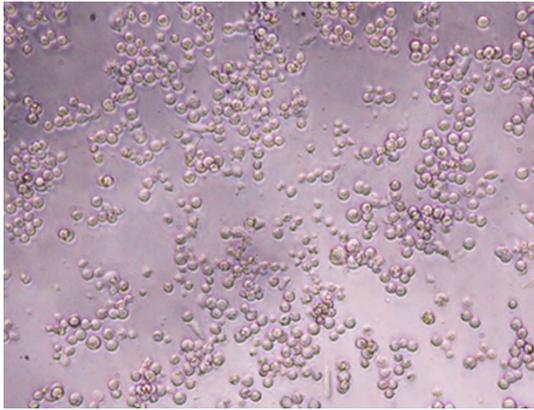


Abbildung 41: PK15-Zellen, 24 Stunden nach Zugabe von 5 µl Toxinextrakt von IBT 40293 von Reiskultur.

Da nach den oben durchgeführten Zytotoxizitätstests nicht ausgeschlossen werden konnte, dass andere Substanzen als makrozyklische Trichothecene für die oben beschriebenen Effekte verantwortlich sind, wurde im nächsten Schritt der Effekt reiner Toxinstandards makrozyklischer Trichothecene (Satratoxin G, Satratoxin H und Roridin L2) überprüft.

In Abbildung 42 lässt sich erkennen, dass auch die reinen Toxinstandards die Zellen an der Ausbildung eines Zellrasens hindern. In allen Fällen war der Großteil der Zellen nach 24 Stunden in einem kugelförmigen Zustand, der nicht für diese Zellen typisch ist. Lediglich ein kleiner Teil der Zellen zeigte Tendenzen zur Adhäsion am Boden der Wells.

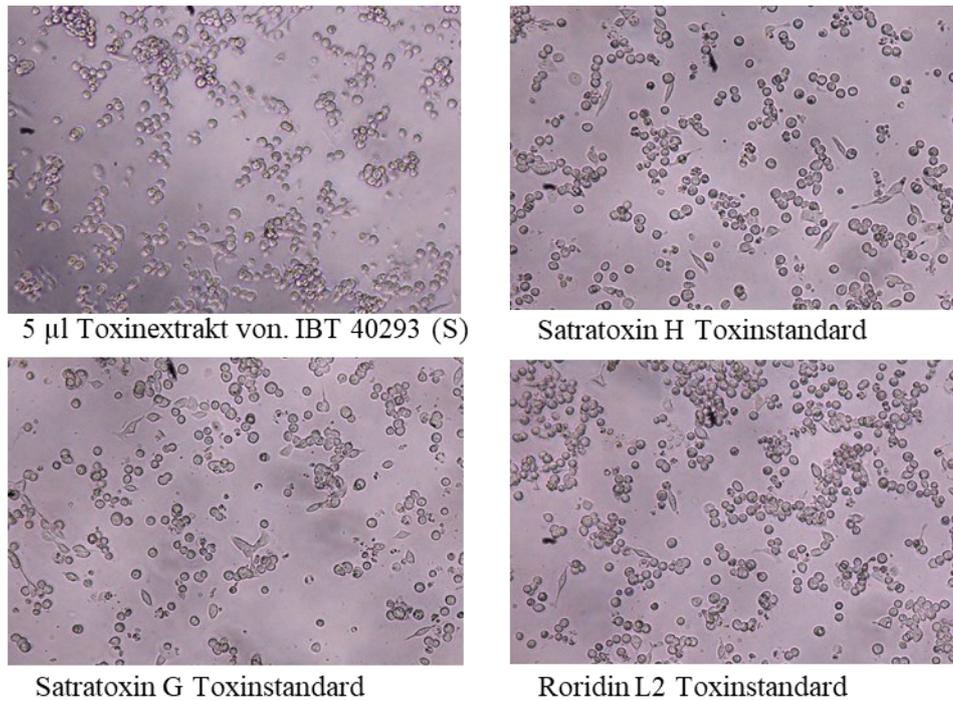


Abbildung 42: PK15-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 5µl Toxinextrakt von IBT 40293 und den Toxinstandards Satratoxin G, Satratoxin H und Roridin L2 (Endkonzentration jeweils 2 µg/ml).

5.1.1. Fähigkeit zur Adhärenz von PK15-Zellen nach Zugabe des Toxinextrakts von IBT 40293

Um zu überprüfen, ob die Zellen in Anwesenheit des Toxins von IBT 40293 (S) einen Zellrasen ausbilden, wurden die Zellen nach 0, 24 und 48 Stunden Inkubationszeit, nach Zugabe des Toxinextrakts, beurteilt (siehe Abbildung 43). Die Zellen blieben auch nach 48 Stunden in Suspension und bildeten keinen Zellrasen aus. Dadurch lässt sich darauf schließen, dass die Zellen ihre Fähigkeit zur Adhärenz bei Anwesenheit des Toxinextrakts von IBT 40293 (S) verlieren.

PK15-Zellen, die nicht diesem Toxinextrakt ausgesetzt waren, haben stattdessen einen dichten Zellrasen gebildet, wie in Abbildung 40, Bild a zu sehen ist.

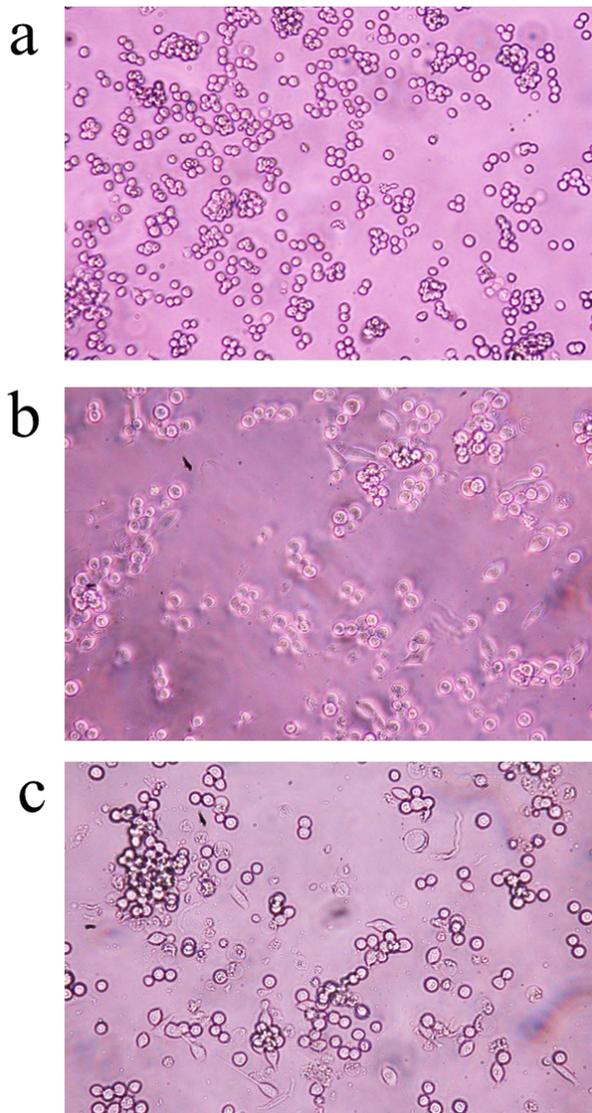


Abbildung 43: PK15-Zellen nach 0 (a), 24 (b) und 48 (c) Stunden Inkubation mit 5µl Toxinextrakt von IBT 40293 (S).

5.1.2. Morphologische Veränderungen von PK15-Zellen nach Zugabe des Toxinextrakts von IBT 40293

Die PK15-Zellen, die mit dem Toxinextrakt von IBT 40293 in Berührung kamen, zeigten außerdem eine veränderte Morphologie, wie in Abbildung 44 zu sehen ist. Die rot eingekreisten Zellen waren kugelig und befanden sich im Zellüberstand, sie legten sich nicht adhärent am Boden ab. Lediglich eine geringe Anzahl an Zellen (gelb eingekreist) zeigte Ansätze, dass sie sich am Boden festsetzen. Diese Zellen blieben jedoch einzeln und bildeten keinen Zellrasen aus. Einige Zellen, die blau eingekreist sind, haben ihre Zellstruktur fast vollständig verloren. Sie erschienen zerklüftet und zeigten einen körnigen Zellinhalt.

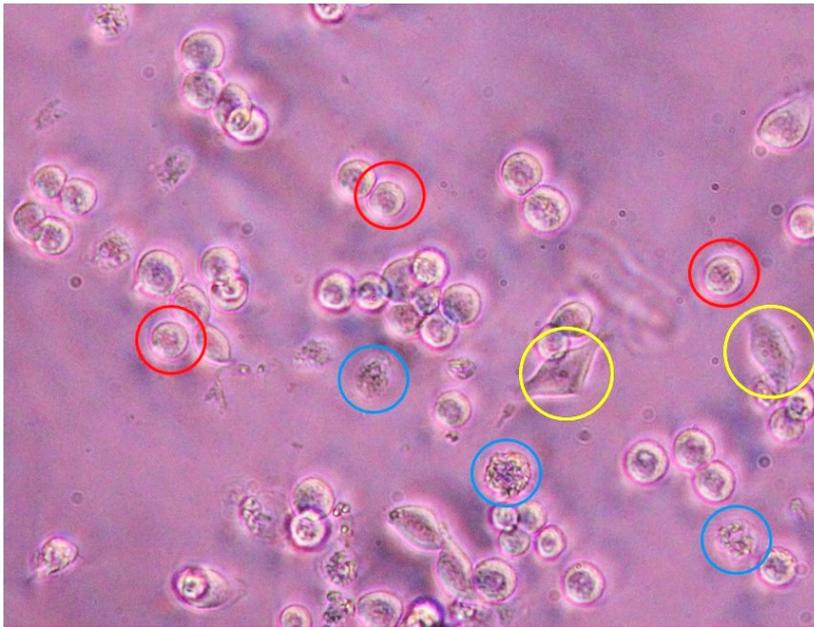


Abbildung 44: PK15-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit dem Toxinextrakt von IBT 40293. Einige Zellen zeigen erhebliche Zellschäden und verlieren ihre Zellstruktur (blauer Kreis), die meisten Zellen weisen einen kugeligen Charakter auf (roter Kreis), wenige Zellen haben die Fähigkeit zur Adhärenz behalten (gelber Kreis).

5.1.3. Überprüfung der Zell-Viabilität durch Trypanblaufärbung

Das Ziel der Färbung mit Trypanblau war es herauszufinden, ob die PK15-Zellen, die 24 Stunden mit dem Toxinextrakt von IBT 40293 (S) inkubiert wurden, noch eine intakte Zellmembran aufwiesen, wodurch Rückschlüsse auf die Viabilität gezogen werden können. In Abbildung 45 lässt sich erkennen, dass die meisten Zellen eine funktionstüchtige Zellmembran aufwiesen und Trypanblau nicht an Proteine der Zellen binden konnte.

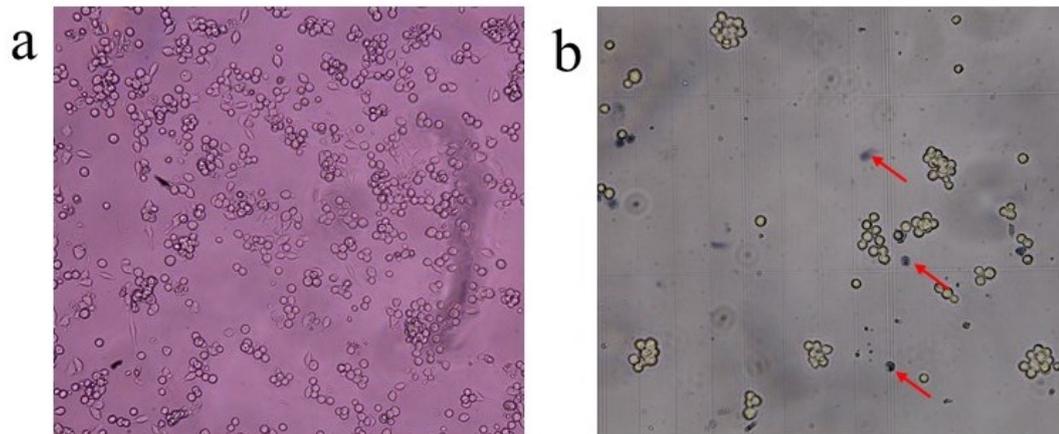


Abbildung 45: PK15-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit Toxinextrakt von IBT 40293 (S) und Färbung mit Trypanblau. Zellen, die blau angefärbt wurden, sind nicht vital (roter Pfeil). Zellen, die nicht angefärbt wurden, aufgrund von Zellvitalität oder zumindest der Funktionstüchtigkeit der Zellmembran, zeigten keine Aufnahme des Farbstoffs.

5.1.4. Überführen der Zellen in neues Medium nach Inkubation mit Toxinextrakt

Der Versuch mit dem Trypanblau (siehe IV.5.1.3) gab einen Hinweis darauf, dass die Zellen, welche dem Toxinextrakt von IBT 40293 ausgesetzt waren, noch lebendig sind. Deshalb wurden die Zellen nach 24stündiger Inkubation mit dem Toxinextrakt zuerst mit PBS, dann mit Medium gewaschen und zwischen den Waschschrritten abzentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin in frisches Medium überführt und nach 24 und 48 Stunden mikroskopisch beurteilt und fotografiert.

Bild a in Abbildung 46 zeigt die Zellen mit ihrem kugeligen Charakter nach 24 Stunden mit dem Toxinextrakt. Bild b zeigt diese Zellen 24 Stunden nach Waschung und dem Verbringen in frisches Medium. Man kann erkennen, dass sich der Großteil der Zellen erholte und erneut begann einen Zellrasen auszubilden, wie es für diese Zellen typisch ist. Bild c bestätigt dies, da auch nach 48 Stunden, die Zellen annähernd einen Monolayer gebildet hatten.

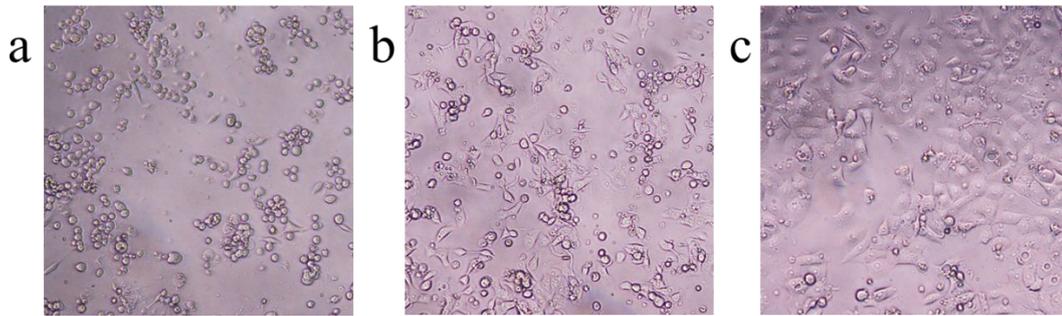
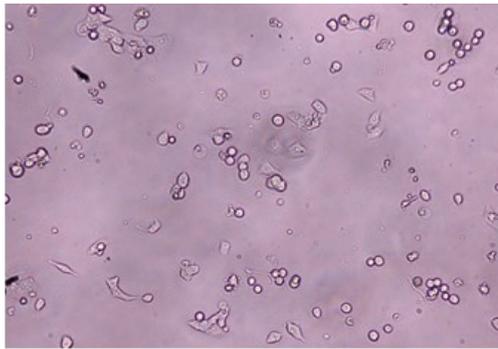
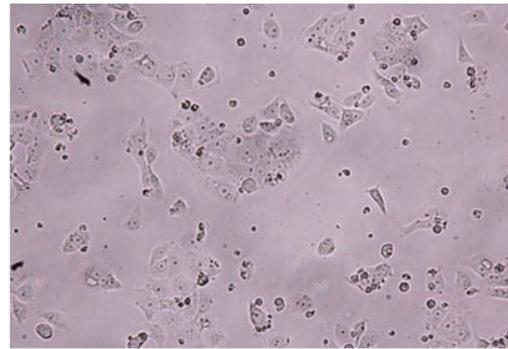


Abbildung 46: PK15-Zellen, die zunächst für 24 Stunden dem Toxinextrakt von IBT 40293 (Bild a) ausgesetzt waren, wurden gewaschen und in ein frisches Medium überführt. Diese Zellen wurden erneut nach 24-(Bild b) und 48-Stunden (Bild c) fotografiert.

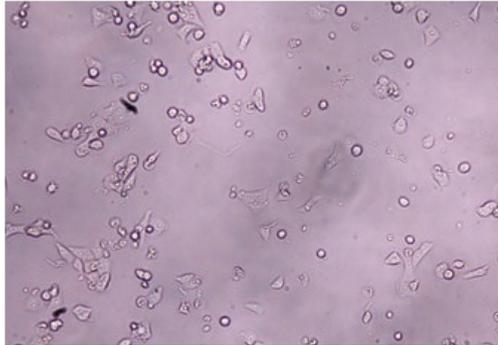
Derselbe Versuch wurde mit Zellen, die mit reinen Toxinstandards versetzt wurden, durchgeführt. Es zeigte sich, wie in Abbildung 47 zu sehen ist, dass die Zellen bereits nach 24 Stunden in frischem, toxinfreiem Medium ihre Fähigkeit zur Anlagerung am Zellboden wiedererlangten. Nach weiteren 24 Stunden war dieser Effekt noch stärker zu sehen. Besonders deutlich war dies bei den Zellen, die mit Satratoxin versetzt wurden. Nach 48 Stunden in frischem Medium hatten die Zellen einen nahezu vollständigen Zellrasen ausgebildet. Die Zellen, die dem Toxinextrakt von IBT 40293 (S) und Roridin L2 ausgesetzt waren, zeigten sich ebenfalls adhären, jedoch weniger dicht als bei Satratoxin G und H. Somit konnte der Effekt, der in Abbildung 46 zu sehen ist, bestätigt werden und ist daher auf die Toxinstandards übertragbar.



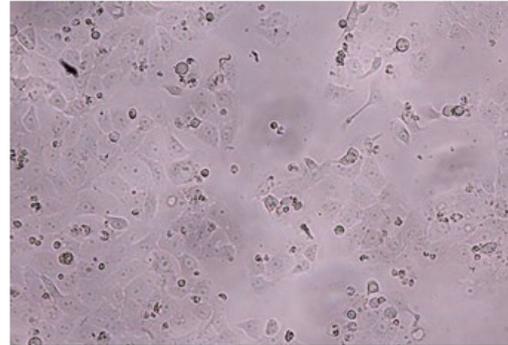
5 µl Toxinextract IBT 40293
nach 24 Stunden



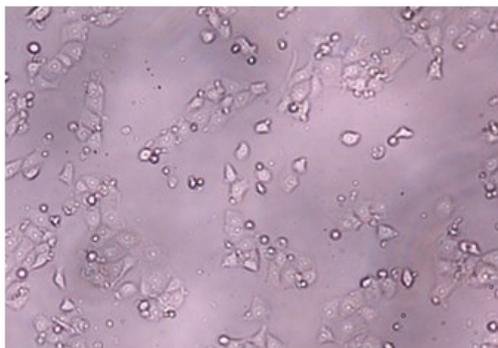
5 µl Toxinextract IBT 40293
nach 48 Stunden



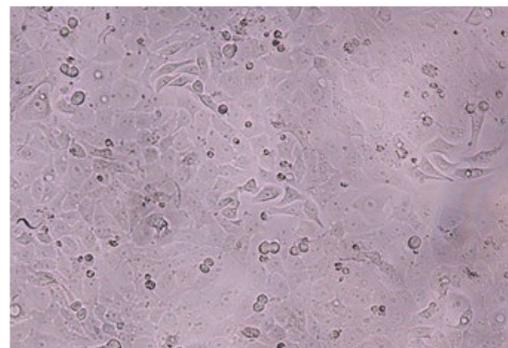
Satratoxin G nach 24 Stunden



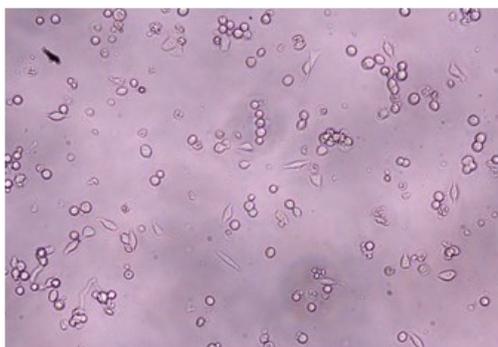
Satratoxin G nach 48 Stunden



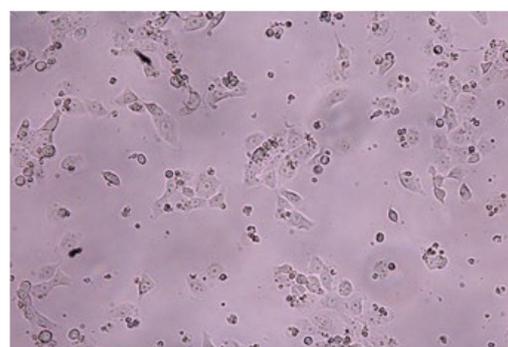
Satratoxin H nach 24 Stunden



Satratoxin H nach 48 Stunden



Roridin L2 nach 24 Stunden



Roridin L2 nach 48 Stunden

Abbildung 47: PK15-Zellen aus Abbildung 42 (Endkonzentration der Toxinstandards jeweils 2 µg/ml) nach Waschung und Aussäen in frischem Medium nach 24 und 48 Stunden Inkubation.

5.1.5. Zellkulturtest mit Toxinzugabe auf intakten Zellrasen

Die zuvor durchgeführten Zellkulturtests wurden mit noch nicht adhärenen PK15-Zellen durchgeführt. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt der Effekt des Toxinextrakts von IBT 40293 (S) auf einen Monolayer von PK15-Zellen geprüft. Nach 24 Stunden war zu erkennen, dass sich der Zellrasen an mehreren Stellen vom Boden gelöst hatte. Einige Zellen zeigten sich kugelig, wie unter IV.5.1.2 beschrieben wurde. Der Effekt, dass sich fast alle Zellen gleichzeitig in diesem kugeligen Zustand befanden, konnte zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht beobachtet werden. Das Toxinextrakt schien jedoch einen negativen Einfluss auf den Monolayer auszuüben, da sich der Zellrasen nach und nach auflöste (siehe Abbildung 48).

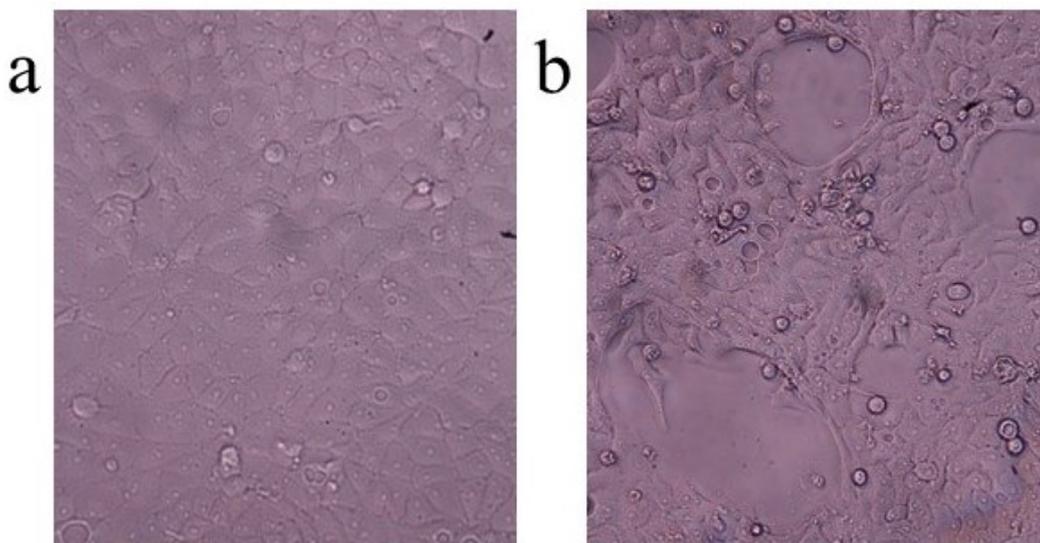


Abbildung 48: PK15-Zellrasen vor und nach Zugabe von Toxinextrakt von IBT 40293 (S). Bild a zeigt PK15-Zellen die nach 24 Stunden Inkubation einen intakten Zellrasen gebildet haben. Bild b wurde nach Zugabe von 5 µl Toxinextrakt von IBT 40293 (S) und weiteren 24 Stunden Inkubation aufgenommen.

5.1.6. Toxinhaltige Zellüberstände auf gesunde PK15-Zellen

Im Folgenden wurde überprüft, ob die Wirkung des Toxinextrakts von IBT 40293 (S) möglicherweise reduziert wird, wenn es vorher mit Medium auf einen adhärenen Zellrasen aufgetragen wurde. Dabei gab es zwei verschiedene Ansätze: Zum einen wurde das Toxinextrakt auf einen adhärenen Zellrasen aufgetragen. Zum anderen wurde das Toxin zu Zellen in Suspension gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und im zweiten Ansatz abzentrifugiert. Um zu überprüfen, ob die Toxinextrakte in einem der beiden Überstände reduziert oder

verbraucht wurden, wurden die Überstände mit frischen PK15-Zellen für 24 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse in Abbildung 49 lassen jedoch nicht darauf schließen, dass in einem der Fälle das Toxinextrakt seine Wirkung verändert oder reduziert. Beide Zellüberstände haben die gleiche Wirkung auf gesunde Zellen und hindern sie an der Ausbildung eines Monolayers.

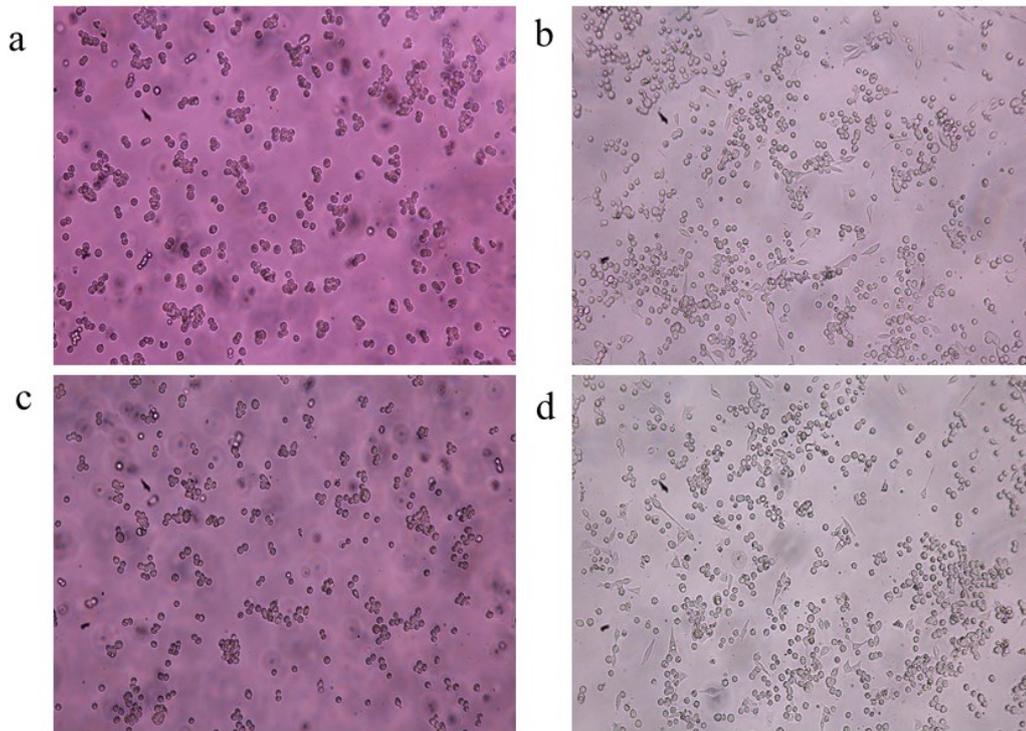


Abbildung 49: PK15-Zellen, versetzt mit dem toxinhaltigen Zellüberstand von adhärenz- und von kugelförmigen Zellen. Bild a zeigt die Zellen mit Zellüberstand, der zunächst auf adhärenz- Zellen war, Bild b zeigt diese nach 24 Stunden. Bild c zeigt Zellen mit dem Zellüberstand von kugelförmigen Zellen, Bild d zeigt diese nach 24 Stunden.

5.2. Färbung mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid

Die Färbung von Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) ermöglicht eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose.

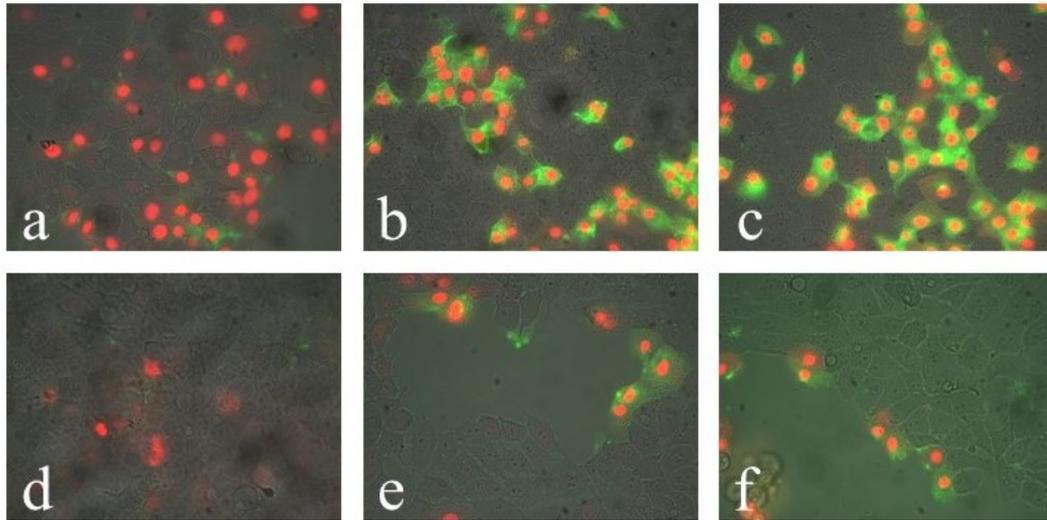


Abbildung 50: PK15-Zellen nach Färbung mit Annexin V (grün) und Propidiumiodid (rot). Die Zellen wurden mit 20 µl des Toxinextrakts von IBT 40293 (a), IBT 42685 (b), CBS 324.65 (c) und IBT 40288 (d), 20 µl Methanol (e) sowie keiner Zugabe (f) für fünf Stunden inkubiert.

In Abbildung 50, Bild a sind Zellen dargestellt, die mit dem Toxinextrakt vom Genotyp S (IBT 40293) versetzt wurden. Dieser Test wurde in einer 24-Wellplatte angesetzt. Da das Volumen des Mediums in einem Well einer 24-Wellplatte viermal so hoch gewählt wurde als in den vorherigen Tests, wurde die vierfache Menge des jeweiligen Toxinextrakts eingesetzt als zuvor.

Diese Zellen waren teilweise PI-positiv, jedoch nur minimal Annexin V-positiv. Diese Zellen weisen aufgrund der PI-Positivität Hinweise von Nekrose auf. Bild b und c zeigt Zellen, die dem Toxinextrakt des Genotyp H ausgesetzt waren. Auf beiden Bildern sind Teile der Zellen jeweils Annexin V- und PI-positiv, was auf die Nekrose dieser Zellen hinweist. Auf Bild d sind Zellen abgebildet, die mit dem Toxinextrakt von IBT 40288 (A) versetzt wurden. Sie scheinen keine erheblichen Schäden genommen zu haben. Es sind lediglich einige rote Bereiche erkennbar, welche für PI-Positivität sprechen. Zellen, die lediglich Methanol, dem Lösungsmittel der Toxine, ausgesetzt waren (Bild e), weisen nur an den Stellen des Monolayers Nekroseschäden auf, wo der Zellrasen Lücken aufweist. Denselben Effekt sieht man auf Bild f, hier wurde keine Substanz hinzugegeben.

6. LC-MS/MS

Die Stämme IBT 40293 (S), IBT 42684 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) wurden, wie in Kapitel III.7.3 beschrieben, auf das Bildungsvermögen von 6-Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on, 3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dien-on und Atranon A untersucht. Die LC-MS/MS-Ergebnisse in Tabelle 36 zeigen, dass beide H-Genotypen und Genotyp A in der Lage sind die genannten Substanzen zu bilden. Aufgrund fehlender Standardsubstanzen war eine Quantifizierung aber nicht möglich. Bei IBT 40293 (S), als Vertreter von Genotyp S, konnten diese Substanzen nicht detektiert werden. Dies bestätigt die bisherigen Ergebnisse, dass Genotyp S keine Atranone bilden kann.

Tabelle 36: Ergebnisse der LC-MS/MS-Messungen von 6-Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on, 3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dien-on und Atranon A

	Atranon A		3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dien-on		6-Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on	
	Quantifier	Qualifier	Quantifier	Qualifier	Quantifier	Qualifier
	417,3/ 357,2 Da	417,3/ 205,2 Da	319,2/ 221,1 Da	319,2/ 259,0 Da	303,2/ 205,1 Da	303,2/ 243,0 Da
IBT 40293	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IBT 42685	392.000*	295.000*	487.000*	148.000*	326.000*	78.600*
CBS 324.65	28.200*	21.100*	50.700*	14.800*	30.800*	6.830*
IBT 40288	491.000*	379.000*	349.000*	107.000*	230.000*	54.900*

n.d.: nicht detektiert, *Fläche des detektierten Peaks

Die Abbildung 51 bis Abbildung 54 zeigen die einzelnen LC-MS/MS-Chromatogramme eines jeden Stammes und der getesteten Substanzen. IBT 40293 (S) zeigt als einziger Stamm keine Peaks der Fragmentationen der getesteten Substanzen.

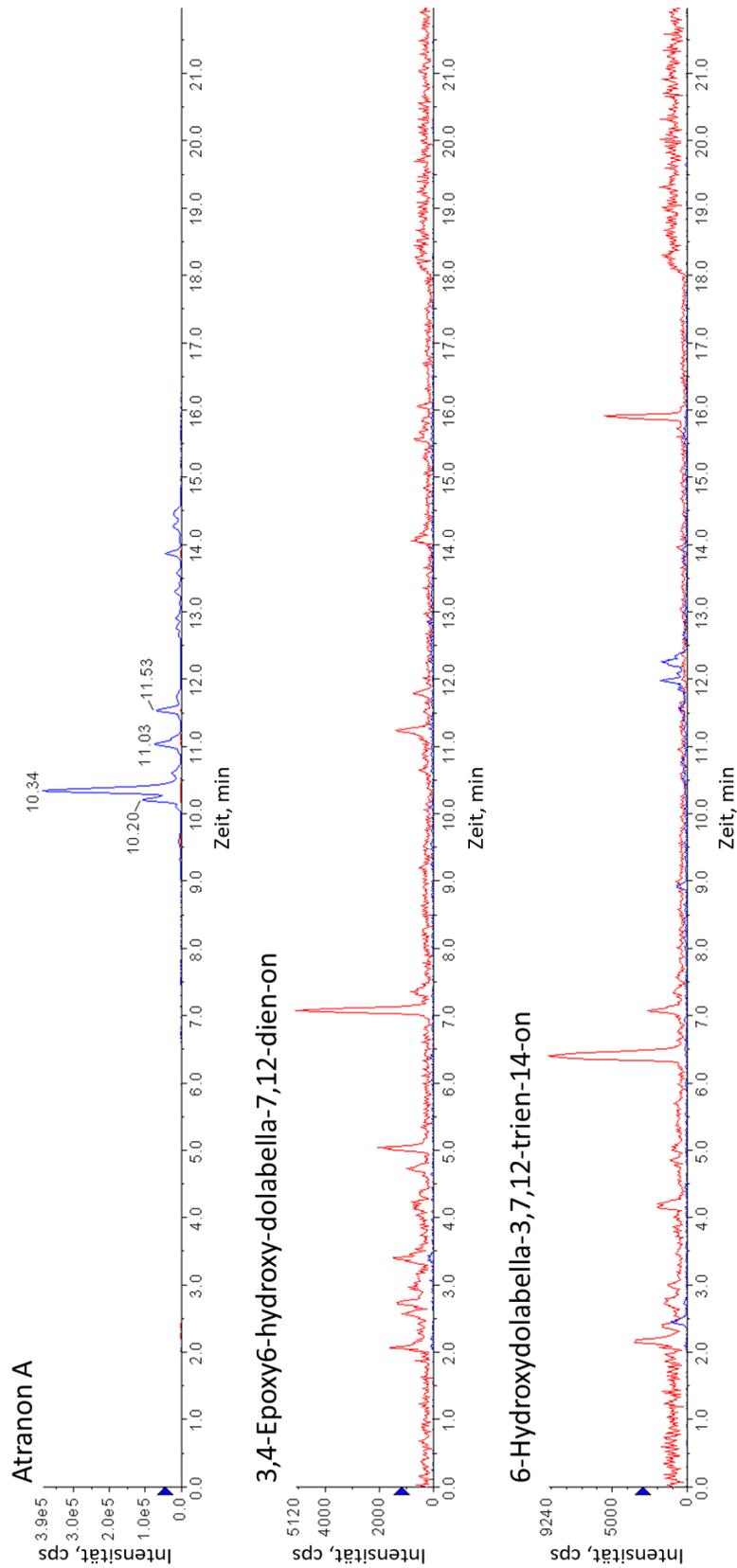


Abbildung 51: LC-MS/MS-Chromatogramme von Atraronen und/oder dessen Vorläufermolekülen für IBT 40293 (S) – nicht vorhanden, rotes und blaues Spektrum stehen für die Fragmentationen.

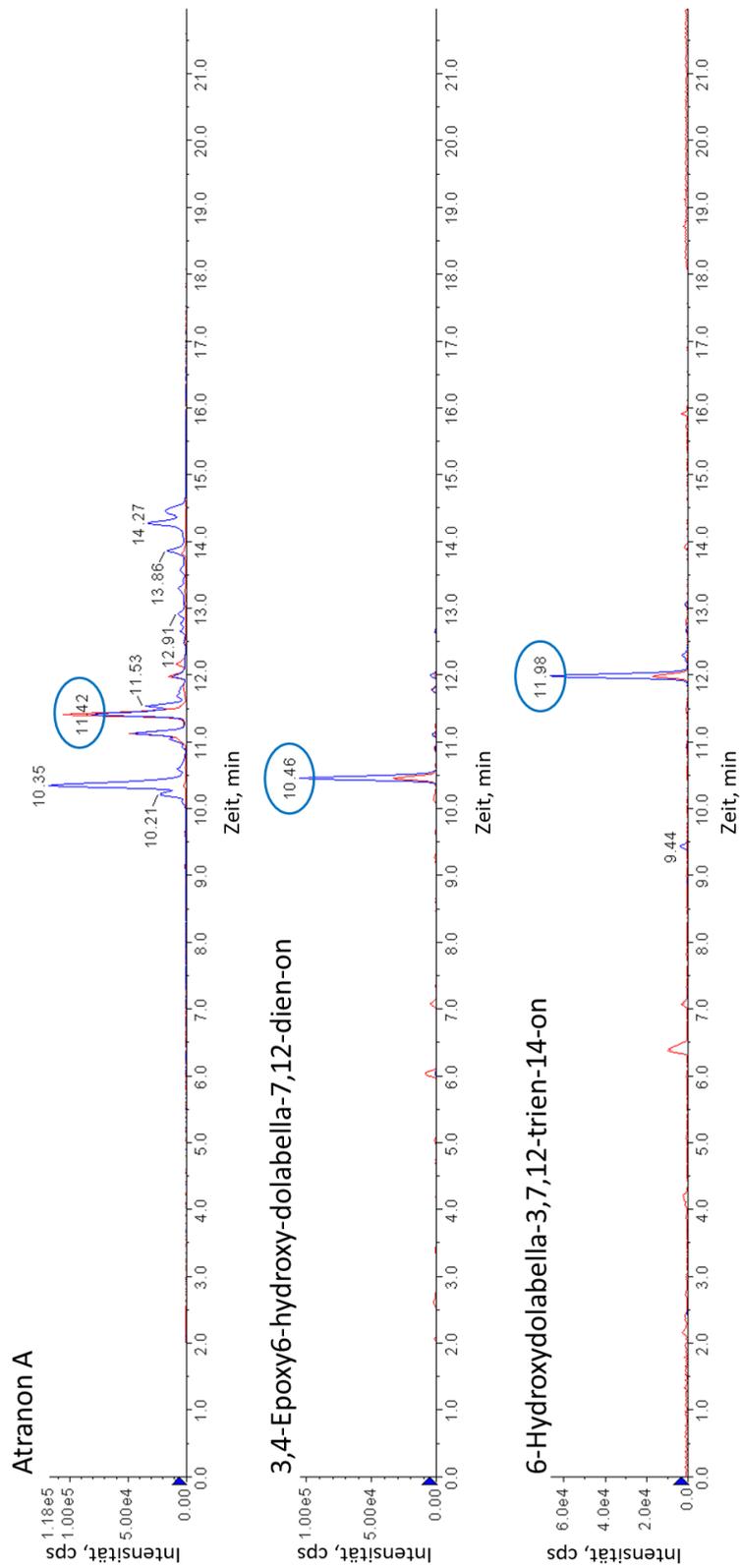


Abbildung 52: LC-MS/MS-Chromatogramme von Atraronen und dessen Vorläufermolekülen für IBT 42685 (H) – die jeweilige Retentionszeit der Fragmentationen ist blau umkreist. Blaues Spektrum = Quantifizier-Tochterion, rotes Spektrum = Qualifizier-Tochterion.

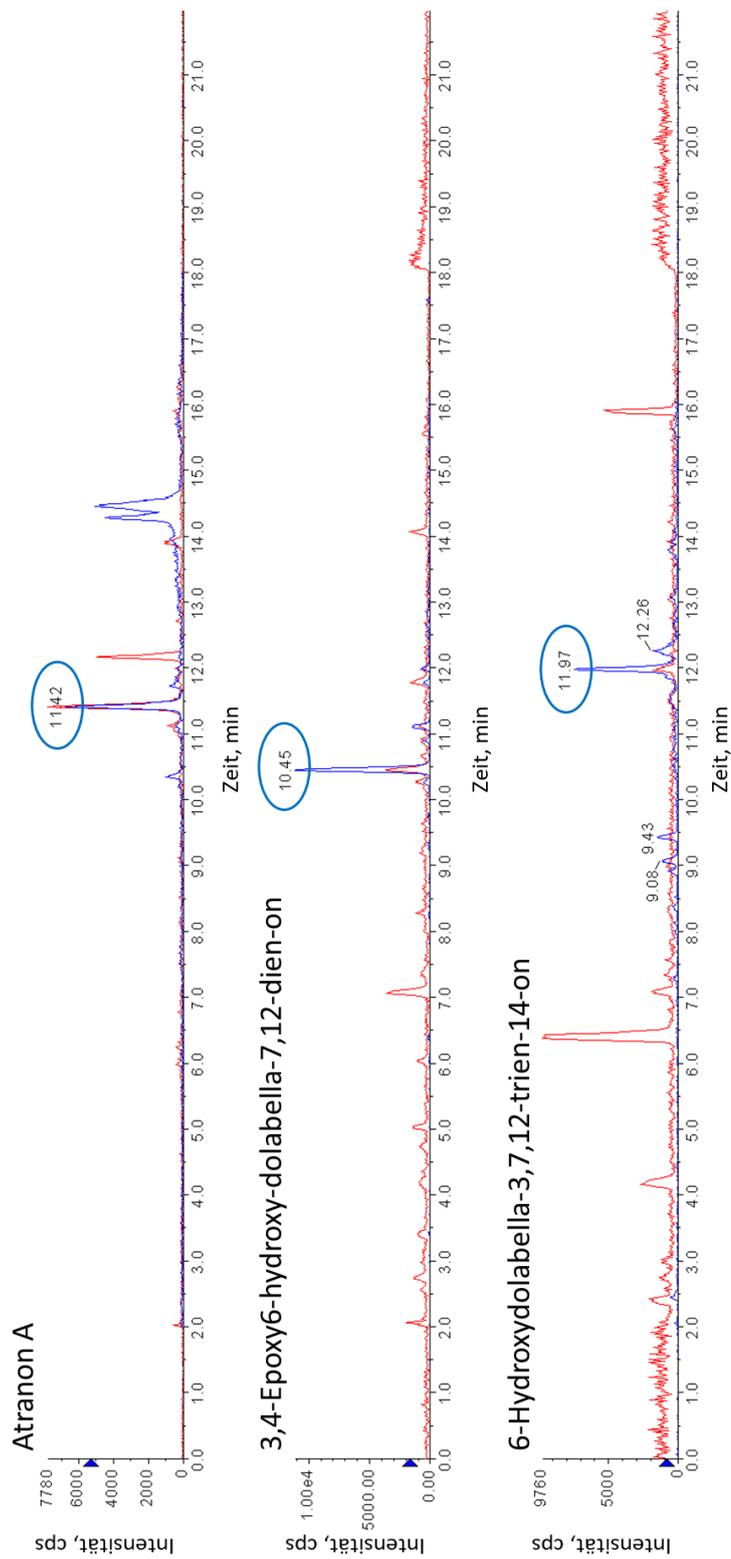


Abbildung 53: LC-MS/MS-Chromatogramme von Atranonen und dessen Vorläufermolekülen für CBS 324.65 (H) – die jeweilige Retentionszeit der Fragmentionen ist blau umkreist. Blaues Spektrum = Quantifier-Tochterion, rotes Spektrum = Qualifier-Tochterion.

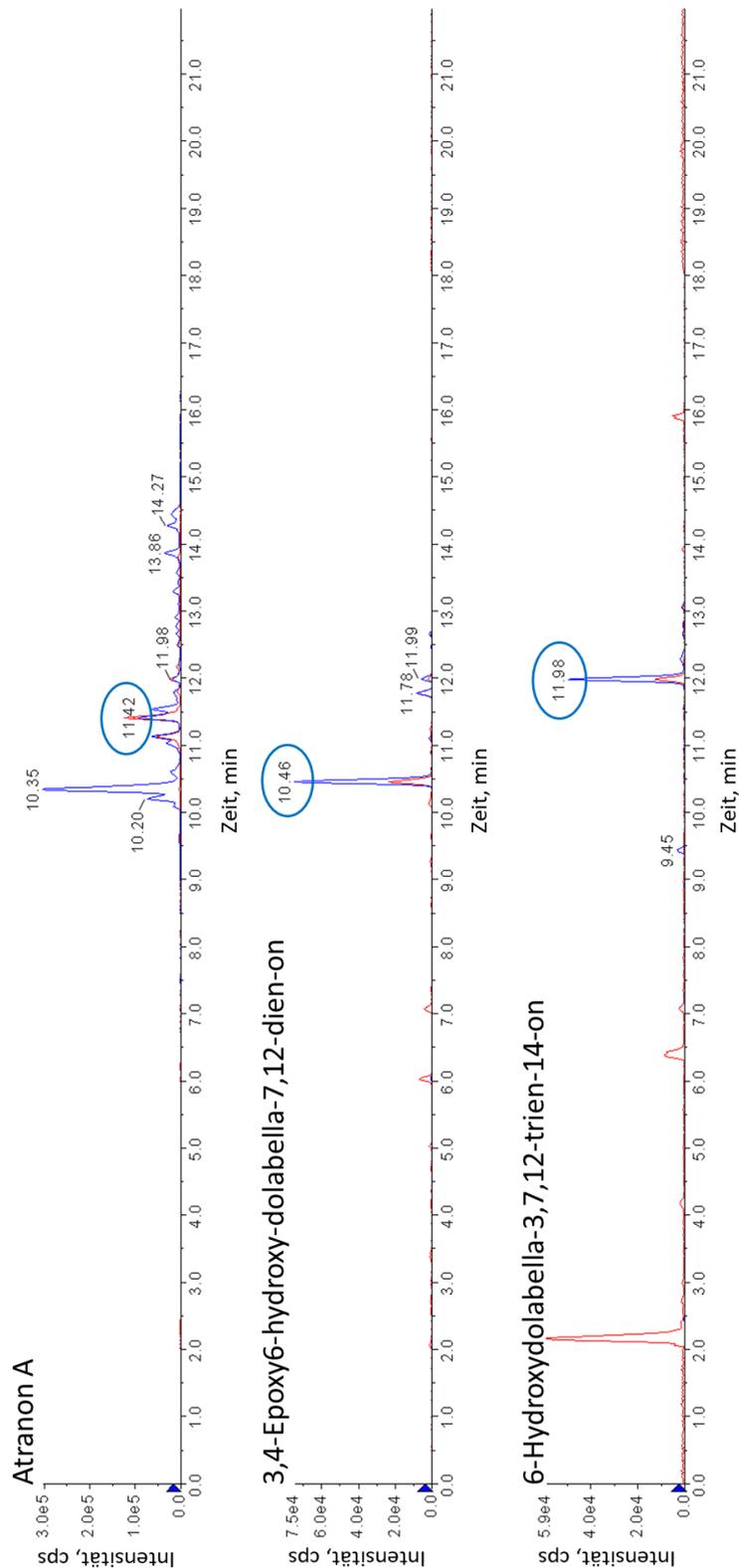


Abbildung 54: LC-MS/MS-Chromatogramme von Atranonen und dessen Vorläufermolekülen für IBT 40288 (A) – die jeweilige Retentionszeit der Fragmentionen ist blau umkreist. Blaues Spektrum = Quantifier-Tochterion, rotes Spektrum = Qualifier-Tochterion.

V. DISKUSSION

1. Sequenzanalyse

In dieser Arbeit wurden verschiedene Gencluster von *S. chartarum* Stämmen verglichen und auf mögliche Homologien überprüft, um so ein tieferes Verständnis über die Evolution in Richtung unterschiedlicher Stämme zu erlangen.

Innerhalb der Genotyp S Stämme (IBT 40293 und IBT 7711) konnte eine hohe Homologie sowohl innerhalb der Cluster als auch der umliegenden Gene nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die Lokalisation der jeweiligen Cluster identisch ist. Da jedoch keine Daten über die Position der Cluster auf den Chromosomen vorhanden ist, kann darüber keine definitive Aussage getroffen werden. Biosynthetische Gencluster sind hoch variabel und haben die Fähigkeit sich rasch zu wandeln und umzustrukturieren. Sie befinden sich oft auf akzessorischen Chromosomen oder an den Enden von Chromosomen (PALMER et al., 2010; HOOGENDOORN et al., 2018; ROKAS et al., 2020). Die vorhandenen Genome von *S. chartarum* sind nicht vollständig annotiert und sind lediglich als einzelne Scaffolds vorhanden. Somit kennt man die genaue Position der AC oder SC innerhalb des Scaffolds, jedoch gibt es keine Informationen über die Lokalisation auf den entsprechenden Chromosomen. Die meisten dieser Cluster befinden sich nicht am Ende des jeweiligen Scaffolds (SC1 bis SC3) und somit auch nicht direkt am Ende eines Chromosoms.

Das Genom vom Stamm 51-11 von *S. chartarum* weist die längsten zusammenhängenden, genomischen Sequenzen auf. Dies bietet die Möglichkeit, wie auch in dieser Arbeit erfolgt, in den anderen *S. chartarum* Stämmen zusammenhängende Sequenzen und benachbarte Scaffolds zu ermitteln. Ähnlichkeiten zwischen den Sequenzen von 51-11 und IBT 40288 (A) gaben den Hinweis dafür, dass der Scaffold 1, der den SC3 in IBT 40293 (S) beinhaltet, nicht randständig liegt. SC3 liegt am Ende des Scaffold 1 in IBT 40293 (S), doch mittels PCR konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass der Scaffold 1 benachbart zu Scaffold 1543 liegt. Für den Atrononcluster 1 kann man diese Aussage zum jetzigen Zeitpunkt aber nicht endgültig treffen, da upstream des AC1 nur eine kurze Gensequenz vorhanden ist.

Durch den Erwerb von DNA anderer Organismen kann es zu einem abweichenden GC-Gehalt im Vergleich zum restlichen Genom kommen (ALEXANDER et al., 2016). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit der GC-Gehalt der Gencluster und der angrenzenden Regionen in den Scaffolds verglichen. Alle Gencluster wiesen einen ähnlichen GC-Gehalt wie das restliche Genom auf. Lediglich die flankierenden Gene des SC2 bei 51-11 wiesen einen deutlich geringeren GC-Gehalt von 27 % auf. Dies konnte jedoch nicht weiter überprüft werden, da die flankierenden Regionen in den anderen Isolaten von IBT 7711 und IBT 40293 mit 772 – 886 bp sehr kurz waren.

Genotyp S zeichnet sich durch das Vorhandensein der SC1 bis SC3 und den fehlenden AC1 aus, was bisherige Ergebnisse bestätigt (SEMEIKS et al., 2014; ULRICH et al., 2020). Zu diesem Genotyp können IBT 40293 und IBT 7711 gezählt werden. Bis dato gab es nicht genügend Informationen über den Stamm 51-11: es sind keine Annotierungen für die hinterlegten Gensequenzen vorhanden, zudem ist nicht klar welche Mykotoxine von diesem Stamm gebildet werden. Aus diesen Gründen konnte 51-11 keinem bestimmten Geno- bzw. Chemotyp zugeordnet werden. In dieser Arbeit wurde der SC1 und SC2, aber kein AC1 und SC3 ausfindig gemacht. Beim Stamm 51-11 waren an dieser Stelle des SC3 die Gene, die sich bei den anderen S-Genotypen downstream des SC3 befinden. Das bedeutet, dass dieser Stamm die bisherigen Kriterien eines Genotyp S nicht exakt erfüllt (ULRICH et al., 2020). Daher könnte man den Stamm 51-11 als einen atypischen Genotyp S von *S. chartarum* bezeichnen. Die nähere Betrachtung der angrenzenden Regionen von SC1 bis SC3 weist auf dieselbe oder zumindest eine sehr ähnliche chromosomale Lokalisation hin. Dies bekräftigt somit vorausgegangene Ergebnisse (SEMEIKS et al., 2014; ULRICH et al., 2020). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen daher nicht darauf schließen, dass die Satratoxincluster besonders mobile Genelemente im Genom von *S. chartarum* darstellen.

Zu einem anderen Ergebnis kommt man aber, wenn man den AC1 betrachtet. Dieser Gencluster kommt sowohl in Genotyp A als auch in Genotyp H vor, nicht jedoch im Genom von Genotyp S (SEMEIKS et al., 2014; ULRICH et al., 2020). Bisherige Ergebnisse weisen darauf hin, dass der AC1 in den S Genotypen vorhanden war, da trunkierte *atr1* ausfindig gemacht wurden und benachbart ähnliche, flankierende Gensequenzen zu finden sind. Jedoch gelang es mittels PCR

bisher nicht, zu bestätigen, dass die mutmaßlich benachbarten Scaffolds tatsächlich nebeneinander liegen. Der AC2 hingegen ist in allen untersuchten S-Genotypen vorhanden, lediglich eines der sechs Gene des AC2, welches für das Protein S40288_09035 kodiert, fehlt in Genotyp S. Wie SEMEIKS et al. (2014) bereits vermuteten, scheint dieser Gencluster nicht in direktem Zusammenhang mit der Atranonproduktion zu stehen.

Der AC2 befindet sich je nach untersuchtem Stamm an unterschiedlichen Positionen im Genom. Die Sequenzen downstream sind zwar vorhanden, aber in bis zu drei unterschiedlichen Scaffolds positioniert. Daraus kann man schließen, dass der AC2 zu unterschiedlichen Ereignissen erworben wurde oder dass die Umgebung dieses Clusters nachträglich wesentliche Umordnung und Reorganisation erfahren hat.

Da laut den bisherigen Ergebnissen AC1 und SC2 jeweils exklusiv vorkommen, ist es denkbar, dass der Vorläuferstamm einen der beiden Cluster beinhaltet. Genotyp H besitzt sowohl Cluster, die in Genotyp S vorkommen (SC1 und SC3), als auch den AC1, der in Genotyp A präsent ist. Nach der Hypothese von SEMEIKS et al. (2014) ist der SC2 durch eine Duplikation des CTC entstanden. Nach der Duplikation des CTC könnte eine funktionale Divergenz stattgefunden haben, welche zur Bildung des SC2 und gleichzeitig zum Verlust des AC1 führte. Dies spricht dafür, dass Genotyp S entweder aus Genotyp H oder A entstammt. Die Tatsache, dass in IBT 40293 (S) und 51-11 Überreste des *atr1* zu finden sind, untermauert diese Hypothese. Es ist auch denkbar, dass sich der CTC in einem Ur-Stamm duplizierte, der ausschließlich den CTC beinhaltete – ein solcher Stamm wurde bisher jedoch nicht beschrieben. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse der Suche homologer Proteine mit Hilfe von BlastP interessant. Diese zeigten einen Gencluster in *Monosporascus*, dessen Gene für Proteine kodieren, die homolog zu den Proteinen sind, die von bestimmten Genen des SC2 kodiert werden, aber auch Trichodien-synthasen, die homolog zu Proteinen sind, die im CTC von *S. chartarum* kodiert sind. Diese Erkenntnis wird dadurch untermauert, dass kürzlich die Vermutung aufgestellt wurde, dass *Monosporascus* die Fähigkeit haben könnte, makrozyklische Trichothecene zu bilden (ZHU et al., 2020). Da *Monosporascus* ein wichtiger Erreger beim Verderb von Melonen ist (MARTYN, 2002), könnte diese Erkenntnis für potentielle Gesundheitsrisiken beim Menschen eine Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurde zudem die Region downstream des SC1 betrachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Region auch im IBT 40288 (A) gut konserviert ist. Allerdings ist das Gen direkt downstream des SC1 (SC1-down-1), welches für ein hypothetisches Protein kodiert, nur teilweise vorhanden. Statt des SC1 ist eine Gensequenz, die nicht bei den bekannten S-Genotypen vorkommt, aufzufinden. Daher kann man vermuten, dass das SC1-down-1 durch eine ungenaue Exzision des SC1 teilweise verloren gegangen ist. Dies weist darauf hin, dass Genotyp A aus einem Stamm stammen müsste, der den SC1 beinhaltet. Dies trifft auf Genotyp H und S zu.

Das *sat10* ist das letzte Gen im SC1 und somit endständig im Gencluster gelegen. Analysen mittels BlastN zeigten, dass die beiden *S. chartarum* Gene downstream des SC1 auch in *Purpureocillium lilacinum* gut konserviert vorkommen. Überdies zeigt das benachbarte Gen starke Homologien mit *sat10* und kodiert ebenfalls für ein Protein mit 16 Ankyrin Wiederholungen (siehe V.3); dieses Gen war jedoch kürzer, was eventuell auf ein Intron zurückzuführen ist. Außer in *Purpureocillium* konnten keine anderen homologen Sequenzen gefunden werden. Da diese drei Gene gut konserviert vorliegen und dieselbe Orientierung im Genom aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass diese Gengruppe eine Art genetisches Element darstellt. Dieses könnte entweder von *S. chartarum* an *P. lilacinum* oder umgekehrt übertragen worden sein. Diese Art von horizontalem Gentransfer wurde für andere Gene von Schimmelpilzen beschrieben. Dazu zählen zum Beispiel die Gene, die bei der Synthese von Sterigmatocystin bei *Aspergillus* spp. beteiligt sind (SLOT und ROKAS, 2011; SHEN et al., 2019). Ähnliche Mechanismen könnten zudem beim Transfer von Trichothecen-spezifischen Genen von oder zu *Myrothecium* Spezies beteiligt gewesen sein, die Gemeinsamkeiten mit *Stachybotrys* spp. zeigen (CASTLEBURY et al., 2004).

Sowohl Genotyp A (IBT 40288) als auch Genotyp H (siehe V.1) besitzen einen vollständigen AC1. Zudem weisen frühere Analysen darauf hin, dass Genotyp H genetisch heterogen ist und ihm oftmals eines oder mehrere Gene des SC1 und/oder SC3 fehlen (ULRICH et al., 2020; KÖCK et al., 2021). Die nicht komplett vorhandenen SC1 und SC3 weisen auf eine eingeschränkte Funktion der Cluster hin. Das teilweise Fehlen der Gene dieser Cluster spricht für einen destruktiven Prozess, bei dem die heute bekannten H-Genotypen aus einem Stamm hervorgingen, welcher noch intakte SC1 und SC3 aufwies.

Eine zentrale Frage, die durch die verschiedenen Genotypen von *S. chartarum* aufkommt, ist, wie diese durchaus verschiedenartigen Genotypen evolutionär in Verbindung stehen. Aufgrund der wenigen vorhandenen Genome von den jeweiligen Genotypen lässt sich dieser Zusammenhang jedoch nur schwer im Detail klären. Dennoch folgen einige Überlegungen, die mehr Einblicke in die evolutionäre Beziehung der drei Genotypen geben können. Aufgrund dieser Überlegungen kann zudem ein Modell über die evolutionären Zusammenhänge aufgestellt werden, das mit den bisherigen Ergebnissen in Einklang steht.

Alle bisher untersuchten Stämme von *S. chartarum* weisen entweder den AC1 und/oder mehrere Satratoxincluster auf; dies gilt gleichermaßen für Genotyp A, S und H (ULRICH et al., 2020). In einer größer angelegten Studie, die 105 Stämme von *S. chartarum* untersuchte, zeigte sich zudem bei keinem Stamm, dass AC1 und SC2 gleichzeitig vorhanden waren oder gleichzeitig fehlten, was die durchgeführten Genomanalysen bestätigen (KÖCK et al., 2021). Dies untermauert die Vermutung, dass AC1 und SC2 jeweils nur exklusiv vorkommen. Bisher gibt es keine Hinweise, dass ein Stamm von *S. chartarum* einen vollständigen SC2 und zur gleichen Zeit einen vollständigen AC1 – und umgekehrt – aufweist. Dies deutet darauf hin, dass das Vorhandensein eines der Gencluster immer mit dem Fehlen des anderen Clusters einhergeht. Zwar ist der genaue Biosyntheseweg der makrozyklischen Trichothecene oder der Atranone nicht abschließend geklärt, jedoch ist bekannt, dass in beiden Fällen Farnesylpyrophosphat der Ausgangsstoff beider Stoffwechselprozesse ist (UENO, 1983; HINKLEY et al., 1999). Auch DEGENKOLB et al. (2008) beschreibt Farnesylpyrophosphat als Ausgangssubstanz. Es scheint, als müsste jeder Stamm wählen, ob das Farnesylpyrophosphat für die Bildung von Atranonen oder Satratoxinen verwendet wird. Dies ist im Einklang mit den Genomdaten vom atypischen S-Genotyp 51-11, der SC2 aufweist, dem jedoch der AC1 und SC3 fehlen. Da der Stamm nicht in Kultur vorhanden ist, konnte keine Analyse der Sekundärmetaboliten erfolgen. Bisher veröffentlichte Daten zur Toxizität von 51-11 bieten lediglich den Hinweis für Zytotoxizität, aber keine konkreten Informationen über die Bildung von makrozyklischen Trichothecenen (VESPER et al., 1999). Es wäre eine interessante Erkenntnis, ob dieser Stamm die Fähigkeit besitzt, Satratoxine zu bilden und abzugeben, da der MFS-Transporter vermutlich im SC3 kodiert ist und somit fehlt. Dem 51-11 fehlt zudem neben dem SC3 zusätzlich fast das komplette *sat1* Gen.

Basierend auf den durchgeführten Analysen der Genomsequenzen konnte ein Modell zur evolutionären Entstehung der drei Genotypen von *S. chartarum*, welches in Abbildung 55 schematisch dargestellt ist, aufgestellt werden.

In diesem Modell wird Bezug auf vier verschiedene Aspekte genommen: Erstens auf den Überrest des *atr1* in Genotyp S. Zweitens auf die unvollständig vorkommenden SC1 und SC3 im Genotyp H. Drittens wurde auf das trunkierte SC1-down-1 in Genotyp A Bezug genommen. Viertens zeigt das Modell einen Erklärungsansatz für den atypischen S-Genotyp 51-11, dem SC3 fehlt, der aber einen Überrest des *atr1* aufweist. Daher kann man in dem beschriebenen evolutionären Modell (Abbildung 55) von einem Ur-Stamm mit intakten SC1 und SC3 ausgehen. Ein solcher Stamm ist beispielsweise CBS 324.65 (H), der in dieser Arbeit für Deep Resequencing – und Transkriptomanalysen herangezogen wurde.

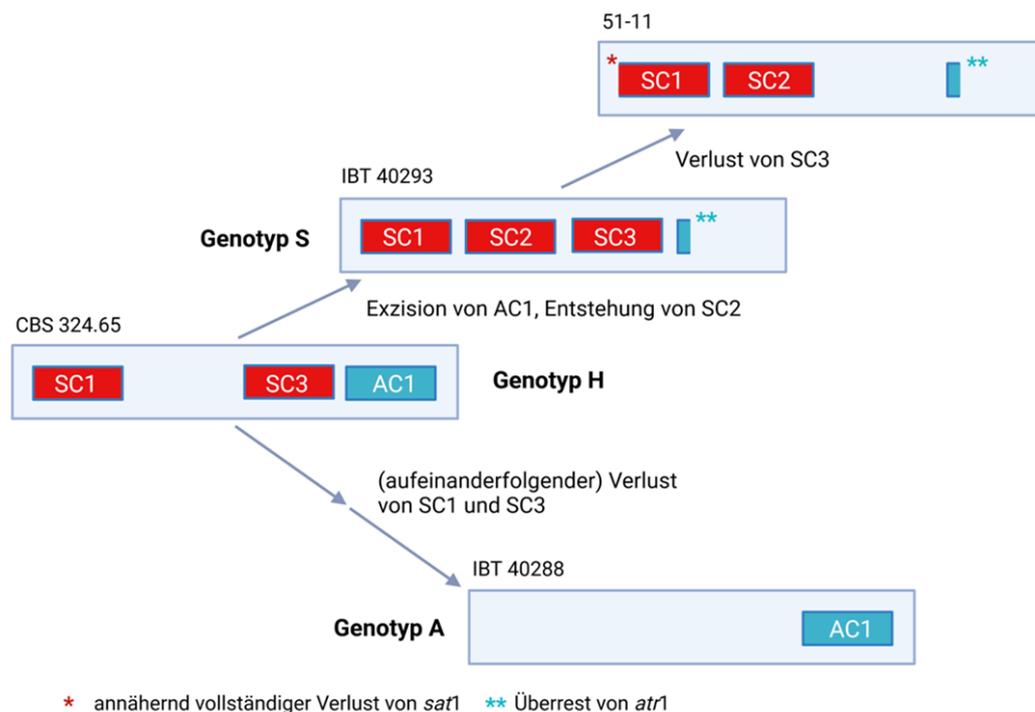


Abbildung 55: Schematische Darstellung des Modells zur Evolution der Genotypen S, A und H von *S. chartarum*. Die Satratoxincluster sind als rote und der AC1 als blauer Kasten dargestellt. Die Größe und Position der Cluster stimmen nicht mit den entsprechenden Clustern im Genom überein, nach ULRICH et al. (2022).

Eine andere Frage, die durch diese Arbeit aufkommt, ist, wie die verschiedenen Gencluster zusammenwirken, um die Mykotoxinproduktion (von Satratoxinen und

Atranonen) zu ermöglichen. Gencluster beinhalten sogenannte Backbone Biosynthesegene für die Produktion einzelner Mykotoxine. Zudem sind Gene, welche im selben Syntheseweg zusammenwirken, üblicherweise in Genclustern organisiert, die meist stabil und nur selten getrennt voneinander vorkommen (SIDHU, 2002; ALEXANDER et al., 2009). Bei *S. chartarum* sind drei Gencluster bekannt, die bei der Biosynthese von Satratoxinen beteiligt sein sollen. Diese Cluster sind jedoch im Genom verteilt aufzufinden. In *Fusarium sportrichioides* sind die Gencluster, die für die Biosynthese von dem strukturähnlichen T-2 Toxin benötigt werden, in ähnlicher Weise im Genom aufzufinden (PROCTOR et al., 2009; ROKAS et al., 2018). Wenn Gencluster an verschiedenen Positionen im Genom verteilt vorkommen, weist dies auf unterschiedliche Funktionen der Gencluster hin, synergistische Interaktionen werden aber nicht ausgeschlossen. Alle drei Satratoxincluster von *S. chartarum* beinhalten einen potentiellen Transkriptionsfaktor (SC1: Sat9, SC2: Sat15 und SC3: Sat20). Dies ist bei Clustern für Sekundärmetaboliten nicht unüblich und ermöglicht eine eigenständige Regulation dieser Gengruppe. Neben der Biosynthese müssen Mykotoxine zudem an die Umwelt freigegeben werden. Sogenannte MFS („Major Facilitator Superfamily“) Transporter sind an dieser Freisetzung beteiligt (COLEMAN und MYLONAKIS, 2009). Interessanterweise ist das einzige MFS Protein, welches von den Satratoxingenen kodiert wird, im SC3 (Sat21) gelegen. SEMEIKS et al. (2014) nahmen daher an, dass der SC3 eine bedeutende Rolle im Transport von Trichothecenen spielt. Diese Überlegung wird dadurch untermauert, dass sich der SC3 und CTC benachbart im Genom befinden. Da den Atranon produzierenden Stämmen entweder der SC3 (Genotyp A) oder oftmals das Gen *sat21* (Genotyp H) fehlt (KÖCK et al., 2021), deutet dies darauf hin, dass Atranone durch andere Mechanismen transportiert werden, welche Sat21 nicht benötigen. Dies wirft erneut die Frage auf, ob 51-11, der den SC3 nicht besitzt, in der Lage ist Satratoxine zu synthetisieren. Da 51-11 aktuell nicht in Kultur verfügbar ist, konnte sein Metabolitenprofil in dieser Arbeit nicht bestimmt werden, weshalb eine definitive Aussage nicht möglich ist.

Bis jetzt kann nicht geklärt werden, wie die Proteine, die in Satratoxinclustern kodiert sind, interagieren. Zudem ist nicht klar, ob die Mykotoxinbiosynthese im Zytoplasma, in Organellen oder in bestimmten intrazellulären Kompartimenten stattfindet. Lediglich die Lokalisation der makrozyklischen Trichothecene wurde in

einer Studie von GREGORY et al. (2004) in Sporen nachgewiesen. GREGORY et al. (2004) konnten nachweisen, dass Satratoxin G ins Zytoplasma gebildet wird und sich vor allem im äußeren Plasmalemma der Sporen befindet.

2. Deep Resequencing Analyse

Die Deep Resequencing Analyse wurde vor allem aufgrund fehlender Genomprojekte von H-Genotyp durchgeführt. Bei der Deep Resequencing Analyse können vergleichsweise kurze Reads mit passenden Referenzgenomen verglichen werden, wodurch genetische Variationen innerhalb von Spezies identifiziert werden können (BENTLEY et al., 2008). Die Coverage zeigt die durchschnittliche Anzahl an Sequenzierungen eines Nukleotids (LANDER et al., 2001). Durch die Sequenzierungen kann ein tiefgreifenderes Verständnis von Genomorganisation, genetischen Variationen und unterschiedlichen Aspekten der Genexpression erlangt werden (SIMS et al., 2014).

In dieser Arbeit wurden Deep Resequencing Analysen von den Stämmen IBT 40293 (S), IBT 42685 (H) und CBS 324.65 (H) durchgeführt. Mit Hilfe der Referenzgenome von IBT 40293 (S) und IBT 40288 (A) konnten somit die Scaffolds, die SC1 bis SC3 sowie AC1 und AC2 beinhalten, anhand ihrer Coverage verglichen werden.

Beide H-Genotypen zeigten eine vollständige Coverage der Scaffolds, die AC1 aufweisen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Ergebnissen von ULRICH et al. (2020). Dem gegenüber steht die Coverage des KL659150 von IBT 40293 (S). Die Analyse zeigte, dass der AC1 mit Ausnahme einer kurzen Teilsequenz von *atr1* nicht im Genom von IBT 40293 (S) vorkommt. Diese Tatsache könnte für eine unvollständige Exzision des AC1 im Laufe der Evolution von IBT 40293 als Vertreter von Genotyp S sprechen. Diese Exzision, die fast den ganzen Gencluster betrifft, könnte auf einen horizontalen Gentransfer dieser Sequenz hinweisen (FITZPATRICK, 2012). Der Vorgang von horizontalem Gentransfer von Genclustern von Sekundärmetaboliten zwischen Pilzen wurde bereits bei anderen Schimmelpilzspezies wie *Fusarium* beschrieben (PROCTOR et al., 2013). Dies steht zudem in Einklang mit den vorangegangenen genomischen Daten (siehe V.1), die darauf hinweisen, dass horizontaler Gentransfer zwischen *Stachybotrys* und *Purpureocillium* stattgefunden haben könnte.

Das Fehlen des Gens, welches für das hypothetische Protein S40288_11253 in IBT 40293 (S) kodiert, wirft die Frage auf, ob dieses ebenfalls Genotyp A spezifisch ist und somit mit der Atranonproduktion in Zusammenhang stehen könnte. Beide H-Genotypen weisen eine vollständige Coverage des AC1 auf und untermauern so vorangegangene Untersuchungen (SEMEIKS et al., 2014; ULRICH et al., 2020).

Der AC2 weist in allen untersuchten Stämmen ein ähnliches Muster auf, wobei die Coverage bei Genotyp H höher lag als bei Genotyp S. Dies weist darauf hin, dass der AC2 bei Genotyp H, welcher die Fähigkeit zur Produktion von Atranonen hat, eine essentiellere Rolle spielt, da bisherige Untersuchungen zu dem Ergebnis kommen, dass eine höhere Sequenzierungstiefe in Zusammenhang mit höherem Expressionslevel steht (WANG et al., 2011; SIMS et al., 2014).

Die Deep Resequencing Analyse der Satratoxincluster unterstützt die Hypothese, dass Stämme von *S. chartarum* nur zur Produktion von Satratoxinen fähig sind, wenn sie den SC2 mit den Genen *sat11* bis *sat16* aufweisen (ULRICH et al., 2020). Beiden H-Genotypen fehlt die Coverage des Scaffolds, der SC2 beinhaltet, und bestätigt somit erneut die bisherigen Teilgenesequenzierungen von ULRICH et al. (2020). Genotyp S besitzt laut der durchgeführten Analysen, wie nach ULRICH et al. (2020) zu erwarten war, alle drei Satratoxincluster.

2. Transkriptomanalyse

Dieser Teil der Arbeit fokussierte sich auf den Vergleich der unterschiedlichen Expressionslevels der Satratoxin-, Atranon- und Trichothecengene der vier untersuchten Stämme. Bisher lagen keine RNA-Seq Daten zu etwaigen *Stachybotrys* Spezies vor. Bei der RNA-Seq zeigte sich, dass die Readanzahl mit der Menge der Zieltranskripte linear in Verbindung steht (MORTAZAVI et al., 2008). Zwar zeigen Studien, dass die Transkriptomanalyse mittels NGS vergleichbare Ergebnisse wie bisherige Mikroarrays ermöglicht (MARIONI et al., 2008), es jedoch bei dieser Methode auch zu falsch-positiven Ergebnissen und Fehlcounts kommen kann (ANDERS & HUBER, 2010). Aus diesem Grund ist es essentiell, dass die Reads für die korrekte Bewertung normalisiert werden (ROBINSON und OSHLACK, 2010). Somit wurde der Fokus in dieser Arbeit auf die normalisierten Readcounts gelegt und zum Vergleich der Genexpression herangezogen.

Im Hauptkomponentenverfahren zeigten alle vier untersuchten Stämme (darunter 2 H- sowie ein S- und A-Genotyp) eine klare Separierung und Gruppierung. Obwohl IBT 42685 und CBS 324.65 jeweils zu Genotyp H gezählt werden, befinden sich die beiden Stämme im PCA-Plot nicht nah zusammen gruppiert. Dies zeigt, dass die beiden H-Stämme in ihrem Expressionsmuster heterogen sind, was mit bisherigen Daten von LOMBARD et al. (2016) in Einklang steht, die nachwiesen, dass sich das Genom von *Stachybotrys* als hoch-divers darstellt.

Wenn man die normalisierten Readcounts des SC1 betrachtet, zeigt sich ein ähnliches Expressionsmuster für Genotyp S und H. Die Gene, die am niedrigsten exprimiert werden, sind *sat1* und *sat9*. Da *sat1* in dem atypischen S-Stamm 51-11 fast vollständig verloren gegangen ist (siehe V.1), lässt sich daraus schließen, dass die Funktion von *sat1* nicht essentiell für die Satratoxincluster ist, da IBT 40293 trotz einer nicht nachweisbaren Expression dieses Gens Satratoxine produziert. Das Gen *sat10* wird von IBT 40293 (S) mit über 8.000 normalisierten Reads am meisten exprimiert. Somit ist Sat10 ein Protein, dem vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte. Es beinhaltet 16 Domänen mit Ankyrin-Wiederholungen. Dies spricht dafür, dass Sat10 ein Gerüstprotein ist, welches mit anderen Satratoxinproteinen interagiert, um deren Aktivitäten zu koordinieren. Bis dato ist nicht geklärt, welche Aufgabe die verschiedenen Satratoxingene bei den H-Genotypen spielen. Sie besitzen zwar SC1 und SC3, können aber keine Satratoxine produzieren, was die Frage aufwirft, ob diese Gene für Genotyp H andere Aufgaben erfüllen.

Der SC2 wird ausschließlich von IBT 40293 exprimiert, da er auch nur dort vorhanden ist (siehe V.1). Die Gene *sat11* bis *sat14* werden zudem mit 2.000 bis 5.300 normalisierten Reads recht hoch transkribiert. *Sat15* und *sat16* zeigen kaum Expression bei IBT 40293. Laut SEMEIKS et al. (2014) könnte der SC2 durch Sat15 (ein putativer Transkriptionsfaktor mit einer Zinkfingerdomäne) reguliert werden. Dieses Protein zeigt zudem Ähnlichkeiten mit einem Protein eines SMB Clusters des *Neotyphodium*, welcher zur Familie der Mutterkornpilzverwandten, gehört (SPIERING et al., 2005; SEMEIKS et al., 2014). Die Vermutung von SEMEIKS et al. (2014), dass das Zinkfingerprotein Sat15 den SC2 reguliert, konnte durch die geringe Readzahl aber nicht untermauert werden. Sat14 und Sat16 sind jeweils vollständige beziehungsweise trunkierte Paraloge der Acetyltransferase Tri3 (SEMEIKS et al., 2014). Da *sat16* mit 0,3 normalisierten Reads quasi nicht

exprimiert ist, kann vermutet werden, dass diese Aufgabe durch Sat14 übernommen wird.

Im SC3 werden vor allem *sat17*, *sat20* und *sat21* von IBT 40293 exprimiert. Sat17 ist vermutlich eine TauD Hydroxylase und Sat20 ein Cys6-Zinkfingerprotein (SEMEIKS et al., 2014). Durch die hohe Expression von *sat20* kann die Vermutung, dass das kodierte Zinkfingerprotein als Transkriptionsfaktor den SC3 reguliert, bestätigt werden (siehe auch V.1). Beide H-Genotypen haben mit 9,1 und 10,3 normalisierten Readcounts aber nur eine sehr geringe Expression dieser Gene. Dies spricht nicht dafür, dass dieses Protein in Genotyp H noch eine essentielle Funktion übernimmt. Das einzige MFS Protein, welches von den Satratoxingenen kodiert wird, ist Sat21 (SEMEIKS et al., 2014). Lediglich IBT 40293 (S) und CBS 324.65 (H) zeigen eine Expression dieses Gens. Die normalisierten Readcounts bei Genotyp S fallen mit 219,1 fast dreimal höher aus als bei Genotyp H. Dieser MFS Transporter könnte bei IBT 40293 (S) für die Freisetzung von Satratoxinen relevant sein. Da Genotyp H keine Satratoxine produziert, ist die Relevanz von *sat21* für diesen Genotyp fraglich.

Die Transkriptomanalyse des AC1 verdeutlichte, dass IBT 40288 (A) und IBT 42685 (H) ähnlich hohe Expressionslevel zeigen. Interessanterweise exprimiert IBT 42685 (H) signifikant mehr im AC1 als der zweite untersuchte H-Genotyp CBS 324.65. Diese Ergebnisse untermauern die bereits beschriebene Heterogenität in den unterschiedlichen *Stachybotrys* Isolaten (LOMBARD et al. (2016). Genotyp S sollte laut den hier durchgeführten Sequenz- und Deep Resequencing Analysen keine Atranongene aufweisen und somit eigentlich auch keine Expression der Atranongene zeigen. Die geringe Readanzahl von weniger als 36 arb. u. könnte daher als zu erwartende Fehlcounts angesehen werden.

Im CTC sollen *tri18* und *tri3* paralog zueinander sein (SEMEIKS et al., 2014). Da *tri18* in keinem der untersuchten Stämme eine nennenswerte Expression aufwies, scheint *tri3* eine wichtigere funktionale Rolle zu spielen. *Tri3* wurde jedoch, wie auch *tri5*, fast ausschließlich von IBT 40293 (S) transkribiert. Es wurde beschrieben, dass Tri11 und Tri4 verschiedene Reaktionen in *Fusarium* und *Trichoderma* katalysieren sollen (DEGENKOLB et al., 2008). Tri4 katalysiert vermutlich die Reaktion von Farnesylpyrophosphat zu Trichodien (MCCORMICK et al., 2011). SEMEIKS et al. (2014) beschrieb zudem einen möglichen

Biosyntheseweg, bei dem Tri4 Trichodien hydroxyliert und dadurch seine Derivate entstehen. Da in dieser Transkriptionsanalyse *tri4* aber kaum exprimiert wurde, ist fraglich, ob dieses Gen tatsächlich eine hohe Relevanz in der Biosynthese von Trichothecenen hat. Die höchsten normalisierten Readcounts zeigte IBT 40293 (S), wobei *tri11*, *tri10* und *tri14* die höchsten Expressionslevel aufwiesen. Es wird vermutet, dass Tri3 eine Acetyltransferase und Tri4 sowie Tri11 eine Hydroxylase ist, zudem könnte Tri10 ein Transkriptionsfaktor sein (SEMEIKS et al., 2014). Von *tri14* ist bislang nicht bekannt, welche Funktion es übernehmen könnte (SEMEIKS et al., 2014). Es wurde beschrieben, dass das *tri5* in IBT 40293 (S), IBT 7711 (S) und IBT 40288 (A) sehr ähnlich ist (ANDERSEN et al., 2003). Das *tri5* wurde in dieser Arbeit, außer von IBT 40293 (S), kaum exprimiert, was darauf hinweist, dass dieses Gen vor allem für Stämme wichtig ist, die Satratoxine produzieren.

Ein Abgleich der vorhergesagten Exons und Introns, die von SEMEIKS et al. (2014) ermittelt wurden, fand in dieser Arbeit nicht statt, ist aber für weitere Analysen über Genotyp H sinnvoll.

Um die Transkriptionsdaten zu bestätigen, ist die Untersuchung mittels qPCR zudem eine sinnvolle Ergänzung und könnte daher in zukünftigen Analysen über die Transkription von *S. chartarum* durchgeführt werden (KOZERA und RAPACZ, 2013).

3. Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizitätstests wurden durchgeführt, um den Einfluss der Toxinextrakte der verschiedenen Genotypen auf PK15-Zellen zu testen. Durch das Zellverhalten und die Zellviabilität lässt sich ein Rückschluss auf die Toxizität der jeweiligen Genotypen ziehen (SUNG et al., 2014).

In dieser Arbeit mit Zellkultur wurden kanzeröse PK15-Zellen verwendet. Diese Zellen sind im Vergleich zu anderen Zelllinien robust und zugleich besonders sensitiv gegenüber Mykotoxinen (GAREIS, 1994; GAREIS, 2006).

Die Zytotoxizitätstests mit den Toxinextrakten der drei Genotypen zeigten deutlich, dass Genotyp S die stärkste zelltoxische Wirkung hatte. Da die Bildung von den hochtoxischen makrozyklischen Trichothecenen bisher nur von Genotyp S bekannt ist, bestätigt dies frühere Untersuchungen (ANDERSEN et al., 2003). Zuvor durch Trypsinbehandlung abgerundete Zellen, die mit dem Toxinextrakt von Genotyp S versetzt wurden, waren nicht in der Lage, wie sonst für die Zellart typisch, einen Monolayer auszubilden, sich also an die Oberfläche des Kulturgefäßes anzuheften. Da die Zellen ihre kugelige Form beibehielten, kann davon ausgegangen werden, dass das Toxinextrakt die normale Funktion der Adhärenz verhindert, was auf einen Differenzierungsdefekt der Zellen hindeutet. Aufgrund dieses eindrucksvollen Effekts wurden mit dem Toxinextrakt von IBT 40293 (S) weitere Tests durchgeführt. Die Tests mit Trypanblau ergaben, dass sich die meisten Zellen nicht mit dem Farbstoff anfärbten und somit eine intakte Zellmembran aufwiesen. Aufgrund einer intakten Zellmembran kann indes nicht automatisch auf die Funktionstüchtigkeit der Organellen im Zellinneren geschlossen werden. Aus diesem Grund wurden die mit Toxinextrakt behandelten Zellen gewaschen und in frisches Medium ausgesät. Die Zellen begannen daraufhin wieder einen Zellrasen auszubilden; dies weist darauf hin, dass der beschriebene Effekt bei PK15-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden reversibel ist. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt durch makrozyklische Trichothecene in dem Toxinextrakt von IBT 40293 (S) hervorgerufen wurde, wurden Toxinstandards von Satratoxin G, Satratoxin H und Roridin L2 angewendet. Die Toxinstandards lösten dieselben Effekte wie das Toxinextrakt von IBT 40293 (S) aus und wiesen so darauf hin, dass makrozyklische Trichothecene dafür verantwortlich gemacht werden können.

Im Gegensatz dazu wurde in der Literatur mehrfach beschrieben, dass

makrozyklische Trichothecene irreversibel die Zellen schädigen, indem sie an die 60S Untereinheiten binden (UENO, 1977; HERNANDEZ und CANNON, 1982; UENO, 1985; FEINBERG und MACLAUGHLIN, 1989; ROCHA et al., 2005). Jedoch wurden in diesen Untersuchungen andere Methoden zur Untersuchung der Zytotoxizität mittels Zellkultur benutzt. Außerdem könnte die Dauer der Inkubation (hier 24 Stunden) einen Einfluss auf die Zytotoxizität haben. Im Gegensatz zu den vorher genannten Studien wurde in der vorliegenden Studie zudem das Toxin bereits vor der Entstehung eines Monolayers hinzugegeben. Beim Zytotoxizitätstest, bei dem das Toxinextrakt auf einen Monolayer gegeben wurde, bildeten sich im Monolayer zwar Lücken, die Zellen wurden jedoch nicht kugelförmig, wie oben beschrieben. Das lässt darauf schließen, dass die Zellen je nach Wachstumsphase unterschiedlich auf die Toxine reagieren.

Der Effekt der Zellen, der nach Zugabe des Toxinextrakts von IBT 40293 (S) gesehen werden konnte, könnte mit dem antikanzerogenen Effekt von makrozyklischen Trichothecenen auf verschiedene Krebszelllinien (DE CARVALHO et al., 2016; HAIDAR et al., 2021) in Verbindung stehen. Da dies eine neue Möglichkeit in der Krebstherapie ermöglicht (HAIDAR et al., 2021), könnte Genotyp S von *S. chartarum* zukünftig von größerem Interesse auf diesem Gebiet sein. Daher wären weiterführende Zellkulturtests mit den verschiedenen Toxinextrakten von *S. chartarum* sinnvoll, um auch eventuelle therapeutische Einsatzmöglichkeiten der Toxine zu erforschen.

Um zu überprüfen, ob und welche Art von Zelltod durch den Einsatz der unterschiedlichen Genotypen auf die PK-Zellen hervorgerufen wird, wurde eine Färbung mit Annexin V-FITC und PI durchgeführt. Eine lebende Zelle ist bei dieser Färbung Annexin V- und PI-negativ. Zellen, bei denen eine Apoptose vonstattengeht, ist Annexin V-positiv und PI-negativ. Nekrotische Zellen sind sowohl Annexin-V-positiv als auch PI-positiv. Die Kombination von PI-positiven und Annexin-negativen Zellen, wie sie bei dem Toxinextrakt von IBT 40293 (S) gesehen wurden, ist daher eher ungewöhnlich. Die beiden H-Genotypen zeigten sich an manchen Stellen nekrotisch, da sich diese Zellen mit beiden Farbstoffen anfärbten. Die Zellen, die nicht behandelt wurden oder mit Methanol überprüft wurden, zeigten sich an Stellen, wo der Monolayer Lücken aufwies, ebenfalls nekrotisch. Diese Schäden könnten auch durch das Handling des Objektträgers mit der Pinzette entstanden sein, also mechanische Schädigungen darstellen. Eine

andere Möglichkeit wäre, dass die Zellen an Stellen, wo der Monolayer nicht ganz geschlossen ist, mehr Angriffsfläche haben. Da diese nekrotischen Zellen aber auch bei den Zellen ohne jegliche Behandlung zu sehen waren, weist dies eher auf die Theorie mit der Beschädigung des Zellrasens durch die Pinzette hin.

4. LC-MS/MS

Da zum jetzigen Zeitpunkt *S. chartarum* nicht im MIBiG (Minimum Information about Biosynthetic Gene cluster) inbegriffen ist (MEDEMA et al., 2015), da eine funktionale Validierung der Satratoxin- und Atranoncluster noch aussteht, kann nicht endgültig geklärt werden, welche Aufgaben die verschiedenen Gencluster in *S. chartarum* haben. Bisher wurden diverse mögliche Mechanismen dieses Syntheseweges in der Literatur vorgeschlagen (UENO, 1983; DEGENKOLB et al., 2008; SEMEIKS et al., 2014). Um das Metabolitenprofil der untersuchten Stämme aus vorangegangenen Studien zu bestätigen (Andersen 2003) wurden IBT 40293 (S) und IBT 40288 (A) mittels LC-MS/MS analysiert. In dieser Studie konnten die Hypothesen von SEMEIKS et al. (2014) und ULRICH et al. (2020) über den Zusammenhang der Satratoxin- und Atranoncluster mit der Bildung dieser Sekundärmetaboliten weiter bestätigt werden.

Mittels LC-MS/MS wurden die Stämme IBT 40293 (S), IBT 42684 (H), CBS 324.65 (H) und IBT 40288 (A) auf ihre Bildungsfähigkeit von Atranon A und den beiden Vorstufen 6-Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on und 3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dien-on untersucht. Genotyp H besitzt den AC1, der laut SEMEIKS et al. (2014) für die Atranonbildung benötigt werden könnte. Bis zu dieser Untersuchung wurde die Bildung von Atranonen von Genotyp H jedoch nicht beschrieben (ULRICH et al., 2020). Die Messungen ergaben, dass sowohl Genotyp A als auch die beiden H-Genotypen in der Lage sind, die Substanzen zu produzieren. Die höheren Konzentrationen (siehe Tabelle 36) von IBT 42685 (H) im Vergleich zu CBS 324.65 (H) stehen zudem mit den höheren Expressionswerten der durchgeführten Transkriptionsanalyse in Einklang. IBT 40293 als Vertreter von Genotyp S war nicht in der Lage die genannten Substanzen zu synthetisieren. Da Dolabellan am Anfang des Biosynthesewegs von Atranonen gebildet wird (HINKLEY et al., 1999; HINKLEY et al., 2000; SEMEIKS et al., 2014), ist auch davon auszugehen, dass Genotyp S keine anderen Atranone bilden kann, wenn dieser die beiden Atranonvorläufer 6-Hydroxydolabella-3,7,12-trien-14-on und

3,4-Epoxy6-hydroxy-dolabella-7,12-dien-on nicht produziert.

Zwar stehen bisher keine Standardsubstanzen von Atranonen zur Verfügung, dennoch bietet die hier durchgeführte Methode erste Interpretationsmöglichkeiten. Durch eindeutig charakterisierte Standardsubstanzen wäre eine genauere Quantifizierung und eine fundiertere Identifikation der Metaboliten möglich.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Stachybotrys spp. ist ein ubiquitär vorkommender Schimmelpilz. Durch die Fähigkeit zur Bildung von hochtoxischen Sekundärmetaboliten rückte *Stachybotrys* spp. in der Human- und Tiermedizin immer wieder in den Fokus (HARRACH et al., 1983; DEARBORN et al., 2002). Vor allem nach Wasserschäden in Gebäuden kann es zum Befall mit *Stachybotrys* kommen (NIELSEN, 2003). In der Tiermedizin steht hingegen besonders der Schimmelbefall von Heu und Stroh im Vordergrund (EL-KADY und MOUBASHER, 1982).

S. chartarum kann in die drei Genotypen A, H und S unterteilt werden (ULRICH et al., 2020). Die Genotypen weisen verschiedene Gencluster auf, die vermutlich für die Bildung von Satratoxinen und Atranonen gebraucht werden (SEMEIKS et al., 2014; ULRICH et al., 2020). Besonders die von Genotyp S produzierten Satratoxine, die zu den makrozyklischen Trichothecenen gezählt werden, sind aufgrund ihrer hohen Zytotoxizität ein potentiell Gesundheitsrisiko (ANDERSEN et al., 2003; JARVIS, 2003).

Da über die Entstehungen in Richtung der verschiedenen Genotypen bislang nur Vermutungen aufgestellt wurden, lag ein Fokus dieser Arbeit auf der Analyse der unterschiedlichen Genotypen. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Satratoxin- und Atranoncluster gelegt.

Es wurden Sequenzanalysen unterschiedlicher Stämme, welche in der NCBI-Datenbank hinterlegt waren, vorgenommen und nach homologen Sequenzen in anderen Pilzspezies gesucht. Darüber hinaus wurden Deep Resequencing und Transkriptomanalysen von vier Stämmen durchgeführt, um bisherige Sequenzanalysen zu bestätigen und neue Erkenntnisse der drei Genotypen vor allem in Bezug auf die unterschiedlichen Gencluster zu erlangen. Durch die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben sich mehrere Hinweise, die es ermöglichten, ein Modell der Evolution der drei Genotypen aufzustellen. Laut Modell ist es wahrscheinlich, dass es einen Ur-Stamm gibt, der Genotyp H ähnlich ist und der sich zum einen in Richtung Genotyp S und zum anderen in Richtung des Genotyp A entwickelt hat. Die wichtigsten Ergebnisse waren dabei ein Überrest des *atr1* in Genotyp S, unvollständig vorkommende SC1 und SC3 in Genotyp H, ein trunkiertes SC1-down-1 Gen in Genotyp A und zuletzt das Fehlen des SC3 und ein

Überrest des *atr1* in dem atypischen Genotyp S-Stamm 51-11. Bislang wurden noch keine Transkriptomdaten zu *Stachybotrys* spp. veröffentlicht. Die Expressionsanalyse der beiden untersuchten H-Genotypen zeigte, dass IBT 42685 signifikant höhere Expression im AC1 als CBS 324.65 aufweist.

Um mehr Einblicke in die von Genotyp H produzierten Mykotoxine zu bekommen, wurden deren Toxinextrakt mittels LC-MS/MS auf Atranone und deren Vorläufermoleküle untersucht. Genotyp A und H, welche auch den Atranoncluster 1 aufweisen, waren im Gegensatz zu Genotyp S in der Lage die untersuchten Substanzen zu bilden.

Die Zytotoxizität der Stämme wurde durch Zellkulturtests mit PK15-Zellen ermittelt. Besonders eindrucksvoll war der Effekt des Toxinextrakts von Genotyp S, IBT 40293. Gab man, entgegen der bisherigen Studien, die Toxinextrakte vor der Bildung eines Monolayers hinzu, so blieb die Adhärenz und die Bildung von Zellrasen aus und die Zellen blieben kugelförmig in Suspension. Sobald die Zellen wieder in toxinfreies Medium überführt wurden, begannen die Zellen erneut einen Monolayer auszubilden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass *Stachybotrys chartarum* durch das Vorkommen der verschiedenen Gencluster in den unterschiedlichen Genotypen und die Fähigkeit zur Produktion der verschiedenen Mykotoxine gut als Modellorganismus zur Erforschung biosynthetischer Stoffwechselwege in Schimmelpilzen geeignet ist. Mit Hilfe von Sequenzanalysen wurde außerdem ein Modell zur möglichen Evolution in Richtung der unterschiedlichen Stämme aufgestellt, was Grundlage für weitere Studien sein kann.

VII. SUMMARY

Stachybotrys spp. is a fungus that occurs ubiquitously. Due to its ability to produce highly toxigenic secondary metabolites, *Stachybotrys* spp. received particular attention in human and veterinary medicine (HARRACH et al., 1983; DEARBORN et al., 2002). Mold growth with *Stachybotrys* emerged in particular after water damage in buildings (NIELSEN, 2003). In veterinary medicine, growth in hay and straw is more relevant (EL-KADY und MOUBASHER, 1982).

S. chartarum can be subclassified into the three genotypes A, H and S (ULRICH et al., 2020). These genotypes manifest themselves in different gene clusters, which are probably required for the production of satratoxins and atranones (SEMEIKS et al., 2014; ULRICH et al., 2020). Especially the satratoxins, which belong to the macrocyclic trichothecenes, are produced by genotype S and represent a health threat due to their high cytotoxicity (ANDERSEN et al., 2003; JARVIS, 2003).

The main focus of this thesis is the analysis of the different genotypes, since little was known about their development.

Sequence analysis of the different genomes present in the NCBI databank was conducted and homologous sequences were searched for in other fungal species. Deep Resequencing and transcriptome analysis were performed for four strains. These results confirmed the previous data and provided new information on the different genotypes, particularly with regard to the mycotoxin gene clusters. Due to the study results, some clues were obtained that allowed us to build a model for the evolution of the three genotypes. According to this model, an ancestor strain similar to an H-type strain existed that subsequently evolved either to genotype S or genotype A. The most important findings that led to this model are the remnant of *atr1* in genotype A, the truncated SC1 and SC3 clusters in genotype H, a truncated SC1-down-1 gene in genotype A and lastly the lack of SC3 and the *atr1* fragment in the atypical S-type strain 51-11. So far, no transcriptome data of *Stachybotrys* spp. had been released. The gene expression analysis of both H-type strains demonstrated that the expression levels of AC1 of IBT 42685 are significantly higher than the ones of CBS 324.65.

For more insight into the mycotoxins produced by genotype H, their toxin extracts were subjected to LC-MS/MS analysis of atranones and their precursors. Genotype

A and H, which also possess AC1 in contrary to genotype S, can produce the analyzed substances.

The cytotoxicity of the strains was detected using a cell-culture test with PK15-cells. The effect of the toxin extract of genotype S, IBT 40293 is particularly interesting. Contrary to previous studies, the toxin extract was added before the formation of a monolayer. The adherence and the formation of a cell layer were prevented by the extract. The cells stayed globular in suspension. As soon as the cells were transferred into a toxin-free medium the cells began to form a monolayer.

In summary, the presence of different set of gene clusters and its ability to produce the related mycotoxins makes *S. chartarum* an attractive model organism for research on biosynthetic pathways in fungi. Using sequence analysis, a model has been developed that describes a potential evolution of the different genotypes of *S. chartarum* and thereby provides a groundwork for further studies.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adan O (1994) On the fungal defacement of interior finishes. Dissertation. Technische Universiteit Eindhoven.
- Aditama TY, Andarini SL. (2002) Sick building syndrome. Medical Journal of Indonesia 11, 124-131.
- Aleksic B, Draghi M, Ritoux S, Bailly S, Lacroix M, Oswald IP, Bailly JD, Robine E. Aerosolization of mycotoxins after growth of toxinogenic fungi on wallpaper. Appl Environ Microbiol 2017; 83.
- Alexander NJ, Proctor RH, McCormick SP. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. Toxin Reviews 2009; 28: 198-215.
- Alexander WG, Wisecaver JH, Rokas A, Hittinger CT. Horizontally acquired genes in early-diverging pathogenic fungi enable the use of host nucleosides and nucleotides. Proc Natl Acad Sci U S A 2016; 113: 4116-21.
- Altman FP. Tetrazolium salts and formazans. Prog Histochem Cytochem 1976; 9: 1-56.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990; 215: 403-10.
- Andersen B, Nielsen KF, Jarvis BB. Characterization of *Stachybotrys* from water-damaged buildings based on morphology, growth, and metabolite production. Mycologia 2002; 94: 392-403.
- Andersen B, Nielsen KF, Thrane U, Szaro T, Taylor JW, Jarvis BB. Molecular and phenotypic descriptions of *Stachybotrys chlorohalonata* sp. nov. and two chemotypes of *Stachybotrys chartarum* found in water-damaged buildings. Mycologia 2003; 95: 1227-58.
- Andersen B, Frisvad JC, Sondergaard I, Rasmussen IS, Larsen LS. Associations between fungal species and water-damaged building materials. Appl Environ Microbiol 2011; 77: 4180-8.
- Andersen ME, Al-Zoughool M, Croteau M, Westphal M, Krewski D. The future of toxicity testing. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2010; 13: 163-96.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 1981; 290: 457-65.

- Andersson MA, Nikulin M, Koljalg U, Andersson MC, Rainey F, Reijula K, Hintikka EL, Salkinoja-Salonen M. Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 387-93.
- ANONYMUS. A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the Sequencing Quality Control Consortium. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 903-14.
- Arikan I, Tekin Ö F, Erbas O. Relationship between sick building syndrome and indoor air quality among hospital staff. *Med Lav* 2018; 109: 435-43.
- Arnemann J. DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Gressner AM, Arndt T, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2019: 719.
- Askalonov SP. Pathogenicity of *Stachybotrys alternans* fungus for cattle and laboratory animals. In *A new fungal disease of horses and humans. Stachybotryotoxicosis*. 1949; 37-47 nach Forgacs (1972).
- Ayerst G. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research* 1969; 5: 127-41.
- Bamburg J. Biological and biochemical actions of trichothecene mycotoxins. In: *Progress in molecular and subcellular biology*. Hahn F, Kopecko DJ, Müller WEG, eds.: Springer Berlin Heidelberg 1983: 41-110.
- Bao YR, Chen GD, Wu YH, Li XX, Hu D, Liu XZ, Li Y, Yao XS, Gao H. Stachybisbins A and B, the first cases of seco-bisabosquols from *Stachybotrys bisbyi*. *Fitoterapia* 2015; 105: 151-5.
- Bao YR, Feng HL, Yao XS. Stachybotranes A-D, phenylspirodrimanones from the wetland fungus *Stachybotrys chartarum* with cytotoxic activities. *Nat Prod Res* 2021: 1-7.
- Barthel J, Gottschalk C, Rapp M, Berger M, Bauer J, Meyer K. Occurrence of type A, B and D trichothecenes in barley and barley products from the Bavarian market. *Mycotoxin Res* 2012; 28: 97-106.
- Beadle GW, Tatum EL. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1941; 27: 499-506.
- Bentley D. Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 347-51.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Keira Cheetham R, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Humphray SJ, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H, Liu X,

- Maisinger KS, Murray LJ, Obradovic B, Ost T, Parkinson ML, Pratt MR, Rasolonjatovo IM, Reed MT, Rigatti R, Rodighiero C, Ross MT, Sabot A, Sankar SV, Scally A, Schroth GP, Smith ME, Smith VP, Spiridou A, Torrance PE, Tzonev SS, Vermaas EH, Walter K, Wu X, Zhang L, Alam MD, Anastasi C, Aniebo IC, Bailey DM, Bancarz IR, Banerjee S, Barbour SG, Baybayan PA, Benoit VA, Benson KF, Bevis C, Black PJ, Boodhun A, Brennan JS, Bridgham JA, Brown RC, Brown AA, Buermann DH, Bundu AA, Burrows JC, Carter NP, Castillo N, Chiara ECM, Chang S, Neil Cooley R, Crake NR, Dada OO, Diakoumakos KD, Dominguez-Fernandez B, Earnshaw DJ, Egbujor UC, Elmore DW, Etchin SS, Ewan MR, Fedurco M, Fraser LJ, Fuentes Fajardo KV, Scott Furey W, George D, Gietzen KJ, Goddard CP, Golda GS, Granieri PA, Green DE, Gustafson DL, Hansen NF, Harnish K, Haudenschild CD, Heyer NI, Hims MM, Ho JT, Horgan AM, Hoschler K, Hurwitz S, Ivanov DV, Johnson MQ, James T, Huw Jones TA, Kang GD, Kerelska TH, Kersey AD, Khrebtukova I, Kindwall AP, Kingsbury Z, Kokko-Gonzales PI, Kumar A, Laurent MA, Lawley CT, Lee SE, Lee X, Liao AK, Loch JA, Lok M, Luo S, Mammen RM, Martin JW, McCauley PG, McNitt P, Mehta P, Moon KW, Mullens JW, Newington T, Ning Z, Ling Ng B, Novo SM, O'Neill MJ, Osborne MA, Osnowski A, Ostadan O, Paraschos LL, Pickering L, Pike AC, Pike AC, Chris Pinkard D, Pliskin DP, Podhasky J, Quijano VJ, Raczy C, Rae VH, Rawlings SR, Chiva Rodriguez A, Roe PM, Rogers J, Rogert Bacigalupo MC, Romanov N, Romieu A, Roth RK, Rourke NJ, Ruediger ST, Rusman E, Sanches-Kuiper RM, Schenker MR, Seoane JM, Shaw RJ, Shiver MK, Short SW, Sizto NL, Sluis JP, Smith MA, Ernest Sohna Sohna J, Spence EJ, Stevens K, Sutton N, Szajkowski L, Tregidgo CL, Turcatti G, Vandevondele S, Verhovsky Y, Virk SM, Wakelin S, Walcott GC, Wang J, Worsley GJ, Yan J, Yau L, Zuerlein M, Rogers J, Mullikin JC, Hurles ME, McCooke NJ, West JS, Oaks FL, Lundberg PL, Klenerman D, Durbin R, Smith AJ. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008; 456: 53-9.
- Biermaier B, Gottschalk C, Schwaiger K, Gareis M. Occurrence of *Stachybotrys chartarum* chemotype S in dried culinary herbs. *Mycotoxin Res* 2015; 31: 23-32.
- Bills GF, Gloer JB. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiol Spectr* 2016; 4.
- Bisby GR. *Stachybotrys*. *Transactions of the British Mycological Society* 1943; 26: 133-43.
- Black JA, Dean TR, Foarde K, Menetrez M. Detection of *Stachybotrys chartarum* using rRNA, tri5, and beta-tubulin primers and determining their relative copy number by real-time PCR. *Mycol Res* 2008; 112: 845-51.
- Bloom E, Bal K, Nyman E, Larsson L. Optimizing a GC-MS method for screening of *Stachybotrys* mycotoxins in indoor environments. *J Environ Monit* 2007; 9: 151-6.

- Botha CJ, Naudé TW. Plant poisonings and mycotoxicoses of importance in horses in southern Africa. *J S Afr Vet Assoc* 2002; 73: 91-7.
- Brasel TL, Martin JM, Carriker CG, Wilson SC, Straus DC. Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 7376-88.
- Brenner S, Jacob F, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 1961; 190: 576-81.
- Buston HW, Basu SN. Some factors affecting the growth and sporulation of *Chaetomium globosum* and *Memnoniella echinata*. *Journal of General Microbiology* 1948; 2: 162-72.
- Carrel A. On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med* 1912; 15: 516-28.
- Castlebury LA, Rossman AY, Sung GH, Hyten AS, Spatafora JW. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycol Res* 2004; 108: 864-72.
- Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22: 3099-108.
- Cho MH, Niles A, Huang R, Inglese J, Austin CP, Riss T, Xia M. A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 1099-106.
- Chung YJ, Yang GH, Islam Z, Pestka JJ. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-2 and complement 3A receptor by the trichothecenes deoxynivalenol and satratoxin G. *Toxicology* 2003a; 186: 51-65.
- Chung YJ, Jarvis BB, Tak H, Pestka JJ. Immunochemical assay for satratoxin G and other macrocyclic trichothecenes associated with indoor air contamination by *Stachybotrys chartarum*. *Toxicol Mech Methods* 2003b; 13: 247-52.
- Cole RJ, Jarvis BB, Schweikert MA (2003) *Handbook of secondary fungal metabolites*, 3 edn. Academic Press, London.
- Coleman JJ, Mylonakis E. Efflux in fungi: la pièce de résistance. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000486.
- Corda ACJ. (1837) *Icones fungorum hucusque cognitorum*. In: *Historiae Naturalis Classica* (Reprint 1963). Cramer J, Swann HK, eds. New York: Wheldon & Wesley, LTD and Hafner Publishing Co. Codidote, Herts.

- Cox RJ. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Org Biomol Chem* 2007; 5: 2010-26.
- Crawford JE, Guelbeogo WM, Sanou A, Traoré A, Vernick KD, Sagnon N, Lazzaro BP. De novo transcriptome sequencing in *Anopheles funestus* using Illumina RNA-seq technology. *PLoS One* 2010; 5: e14202.
- Croft WA, Jarvis BB, Yatawara CS. Airborne outbreak of trichotecene toxicosis. *Atmospheric Environment* 1986; 20: 549-52.
- Crous PW, Shivas RG, Quaedvlieg W, van der Bank M, Zhang Y, Summerell BA, Guarro J, Wingfield MJ, Wood AR, Alfenas AC, Braun U, Cano-Lira JF, Garcia D, Marin-Felix Y, Alvarado P, Andrade JP, Armengol J, Assefa A, den Breeyen A, Camele I, Cheewangkoon R, De Souza JT, Duong TA, Esteve-Raventos F, Fournier J, Frisullo S, Garcia-Jimenez J, Gardiennet A, Gene J, Hernandez-Restrepo M, Hirooka Y, Hospenthal DR, King A, Lechat C, Lombard L, Mang SM, Marbach PA, Marincowitz S, Marin-Felix Y, Montano-Mata NJ, Moreno G, Perez CA, Perez Sierra AM, Robertson JL, Roux J, Rubio E, Schumacher RK, Stchigel AM, Sutton DA, Tan YP, Thompson EH, van der Linde E, Walker AK, Walker DM, Wickes BL, Wong PT, Groenewald JZ. Fungal Planet description sheets: 214-280. *Persoonia* 2014; 32: 184-306.
- Cruse M, Telerant R, Gallagher T, Lee T, Taylor JW. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 2002; 94: 814-22.
- Cruz-Perez P, Buttner MP, Stetzenbach LD. Specific detection of *Stachybotrys chartarum* in pure culture using quantitative polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 2001; 15: 129-38.
- Dankó G. Stachybotryotoxicosis and immunosuppression. *International Journal of Environmental Studies* 1975; 8: 209-11.
- de Carvalho MP, Weich H, Abraham WR. Macrocyclic trichothecenes as antifungal and anticancer compounds. *Curr Med Chem* 2016; 23: 23-35.
- Dearborn DG, Yike I, Sorenson WG, Miller MJ, Etzel RA. Overview of investigations into pulmonary hemorrhage among infants in Cleveland, Ohio. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107: 495-9.
- Dearborn DG, Smith PG, Dahms BB, Allan TM, Sorenson WG, Montana E, Etzel RA. Clinical profile of 30 infants with acute pulmonary hemorrhage in Cleveland. *Pediatrics* 2002; 110: 627-37.
- Degenkolb T, Dieckmann R, Nielsen K, Gräfenhan T, Theis C, Zafari D, Chaverri P, Ismaiel A, Brueckner H, Döhren H, Thrane U, Petrini O, Samuels G. The *Trichoderma brevicompactum* clade: A separate lineage with new species, new peptabiotics, and mycotoxins. *Mycological Progress* 2008; 7.

- Dill I, Trautmann C, Szewzyk R. [Mass development of *Stachybotrys chartarum* on compostable plant pots made from recycled paper]. *Mycoses* 1997; 40 Suppl 1: 110-4.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 2013; 29: 15-21.
- Drobotko V. (1945) Stachybotryotoxicosis. A new disease of horses and humans. *American review of Soviet medicine*; 2, 238-242 nach Forgacs (1972).
- Dupuis-Sandoval F, Poirier M, Scott MS. The emerging landscape of small nucleolar RNAs in cell biology. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2015; 6: 381-97.
- El-Kady IA, Moubasher MH. Toxicogenicity and toxins of *Stachybotrys* isolates from wheat straw samples in Egypt. *Experimental Mycology* 1982; 6: 25-30.
- Engvall K, Norrby C, Norback D. Sick building syndrome in relation to building dampness in multi-family residential buildings in Stockholm. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; 74: 270-8.
- Etzel R, Montana E, Sorenson WG, Kullman G, Miller JD, Jarvis B, Dearborn DG. Pulmonary hemosiderosis associated with exposure to *Stachybotrys Atra*: T 78. *Epidemiology* 1996; 7: S38.
- Etzel RA, Montana E, Sorenson WG, Kullman GJ, Allan TM, Dearborn DG, Olson DR, Jarvis BB, Miller JD. Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1998; 152: 757-62.
- Europäische Kommission. Entscheidung 2002/657/EG der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. 2002.
- Europäische Kommission (2021) Durchführungsverordnung (EU) 2021/808 der Kommission vom 22. März 2021 über Leistungskriterien für Analysemethoden für Rückstände pharmakologisch wirksamer Stoffe in zur Lebensmittelerzeugung genutzten Tieren und über die Auswertung von Ergebnissen sowie über die für Probenahmen anzuwendenden Methoden und zur Aufhebung der Entscheidungen 2002/657/EG und 98/179/EG.
- Feinberg B, MacLaughlin CS. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: *Trichothecene mycotoxin mycotoxins: pathophysiologic effects*. Beasley VR, ed.: CRC Press 1989: 27-36.
- Fitzpatrick DA. Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 329: 1-8.

- Forgacs J, Carll WT, Herring AS, Hinshaw WR. Toxicity of *Stachybotrys atra* for animals. Transactions of the New York Academy of Sciences 1958; 20: 787-808.
- Forgacs J (1972) Stachybotryotoxicosis. In Fungal Toxins. eds A. Kadis & A. J. L., Ciegler, New York, United States of America, Academic Press. 95 – 128.
- Frazer S, Magan N, Aldred D. The influence of water activity and temperature on germination, growth and sporulation of *Stachybotrys chartarum* strains. Mycopathologia 2011; 172: 17-23.
- Frazer S, Pestka J, Kim J, Medina A, Aldred D, Magan N. Impact of environmental factors on growth and satratoxin G production by strains of *Stachybotrys chartarum*. World Mycotoxin Journal 2012; 5: 37-43.
- Freshney RI (2015) Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons.
- Gareis M (1994) Cytotoxicity testing of samples originating from problem buildings. Fungi and Bacteria in Indoor Air Environments. Saratoga Springs, New York. 139-44.
- Gareis M. Diagnostischer Zellkulturtest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2006; 1: 354-63.
- Geris R, Simpson TJ. Meroterpenoids produced by fungi. Nat Prod Rep 2009; 26: 1063-94.
- Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. J Immunol Methods 1986; 94: 57-63.
- Gherbawy YA, Shebany YM, El-Dawy E. Detection of *Stachybotrys chartarum* isolates from faba beans dust during threshing. Arch Microbiol 2021; 203: 5591-8.
- Goldstein L, Plaut W. Direct Evidence for nuclear synthesis of cytoplasmic ribose nucleic acid. Proceedings of the National Academy of Sciences 1955; 41: 874-80.
- Gottschalk C, Bauer J, Meyer K. Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. Mycotoxin Res 2006; 22: 189-92.
- Gottschalk C (2009) LC-MS/MS-Nachweismethoden für Typ A, B und D Trichothecene in der Lebensmittel- und Umweltanalytik. In: Fakultät Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. TU München, München.

- Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 2009; 26: 1273-89.
- Gravesen S, Nielsen PA, Iversen R, Nielsen KF. Microfungal contamination of damp buildings--examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Perspect* 1999; 107 Suppl 3: 505-8.
- Graw J. Verwertung genetischer Informationen. In: *Genetik* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2015: 55-108.
- Gregory LG, Pestka JJ, Dearborn DG, Rand TG. Localization of Satratoxin-G in *Stachybotrys chartarum* Spores and Spore-Impacted Mouse Lung using Immunocytochemistry. *Toxicologic Pathology* 2004; 32:26-34.
- Gronenborn B, Messing J. Methylation of single-stranded DNA in vitro introduces new restriction endonuclease cleavage sites. *Nature* 1978; 272: 375-7.
- Grove JF, Reimann E, Roy S, Grovey JF. The trichothecenes and their biosynthesis. *Progress in the chemistry of organic natural products*. Herz W, Falk H, Kirby GW, eds.: Springer Vienna 2007: 63-130.
- Haidar S, Jürgens FM, Aichele D, Jagels A, Humpf HU, Jose J. Natural compounds isolated from *Stachybotrys chartarum* are potent inhibitors of human protein kinase CK2. *Molecules* 2021; 26.
- Hanas JS, Hazuda DJ, Bogenhagen DF, Wu FY, Wu CW. *Xenopus* transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene. *J Biol Chem* 1983; 258: 14120-5.
- Hanelt M, Gareis M, Kollarczik B. Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia* 1994; 128: 167-74.
- Harrach B, Bata A, Bajmocy E, Benko M. Isolation of satratoxins from the bedding straw of a sheep flock with fatal stachybotryotoxicosis. *Applied and Environmental Microbiology* 1983; 45: 1419-22.
- Harrach B, Bata A, Sandor G, Vanyi A. Isolation of macrocyclic and non-macrocyclic trichothecenes (*stachybotrys* and *fusarium* toxins) from the environment of 200 III sport horses. *Mycotoxin Res* 1987; 3: 65-8.
- Haslam E. Secondary metabolism--fact and fiction. *Natural Produkt Reports* 1986; 3: 217-49.
- Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D. The natural history of group I introns. *Trends Genet* 2005; 21: 111-9.

- Haugland RA, Heckman JL. Identification of putative sequence specific PCR primers for detection of the toxigenic fungal species *Stachybotrys chartarum*. Mol Cell Probes 1998; 12: 387-96.
- Heinemann IU, Söll D, Randau L. Transfer RNA processing in archaea: unusual pathways and enzymes. FEBS Lett 2010; 584: 303-9.
- Hernandez F, Cannon M. Inhibition of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by the 12,13-epoxytrichothecenes trichodermol, diacetoxyscirpenol and verrucarin A. Reversibility of the effects. Journal of antibiotics (Tokyo) 1982; 35: 875-81.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res 2007; 111: 509-47.
- Hibbett DS, Taylor JW. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? Nat Rev Microbiol 2013; 11: 129-33.
- Hinkley SF, Jiang J, Mazzola EP, Jarvis BB. Atranones: Novel diterpenoids from the toxigenic mold *Stachybotrys atra*. Tetrahedron Letters 1999; 40: 2725-8.
- Hinkley SF, Mazzola EP, Fettinger JC, Lam YF, Jarvis BB. Atranones A-G, from the toxigenic mold *Stachybotrys chartarum*. Phytochemistry 2000; 55: 663-73.
- Hinkley SF, Moore JA, Squillari J, Tak H, Oleszewski R, Mazzola EP, Jarvis BB. New atranones from the fungus *Stachybotrys chartarum*. Magnetic Resonance in Chemistry 2003; 41: 337-43.
- Hintikka E-L. The Genus *Stachybotrys*. In: Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicosis. An Encyclopedia Handbook. Wyllie TD, Morehouse LG, eds. New York, Basel: Marcel Dekker Inc. 1977: 91-8.
- Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI, Zamecnik PC. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. J Biol Chem 1958; 231: 241-57.

- Hoogendoorn K, Barra L, Waalwijk C, Dickschat JS, van der Lee TAJ, Medema MH. Evolution and Diversity of Biosynthetic Gene Clusters in *Fusarium*. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9.
- Hughes SJ. Conidiophores, conidia, and classification. *Canadian Journal of Botany* 1953; 31: 577-659.
- Hunter CA, Grant C, Flannigan B, Bravery AF. Mold in Buildings - the Air Spora of Domestic Dwellings. *International Biodeterioration* 1988; 24: 81-101.
- Illumina Inc. Images for General Use. <https://emea.illumina.com/company/news-center/multimedia-images.html>: 2022a: 02.03.2021.
- Illumina Inc. Sequencing: Introduction to Sequencing by Synthesis (SBS). 2022b: <https://www.youtube.com/embed/oIJAA6h2bFM?autoplay=1&rel=0>.
- Islam Z, Harkema JR, Pestka JJ. Satratoxin G from the black mold *Stachybotrys chartarum* evokes olfactory sensory neuron loss and inflammation in the murine nose and brain. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 1099-107.
- Islam Z, Shinozuka J, Harkema JR, Pestka JJ. Purification and comparative neurotoxicity of the trichothecenes satratoxin G and roridin L2 from *Stachybotrys chartarum*. *J Toxicol Environ Health A* 2009; 72: 1242-51.
- Jagels A, Lindemann V, Ulrich S, Gottschalk C, Cramer B, Hubner F, Gareis M, Humpf HU. Exploring secondary metabolite profiles of *Stachybotrys* spp. by LC-MS/MS. *Toxins (Basel)* 2019; 11: 133.
- Jagels A, Stephan F, Ernst S, Lindemann V, Cramer B, Hübner F, Humpf HU. Artificial vs natural *Stachybotrys* infestation-Comparison of mycotoxin production on various building materials. *Indoor Air* 2020; 30: 1268-82.
- Jarvis BB, Eppley RM, Mazzola EP. Chemistry of trichothecenes - Chemistry and bioproduction of macrocyclic trichothecenes. In: *Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Ueno Y, ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1983: 20-38.
- Jarvis BB, Midiwo JO, Bean GA, Aboul-Nasr MB, Barros CS. The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species. *J Nat Prod* 1988; 51: 736-44.
- Jarvis BB, Salemme J, Morais A. *Stachybotrys* toxins. 1. *Natural Toxins* 1995; 3: 10-6.
- Jarvis BB, Sorenson WG, Hintikka EL, Nikulin M, Zhou Y, Jiang J, Wang S, Hinkley S, Etzel RA, Dearborn D. Study of toxin production by isolates of *Stachybotrys chartarum* and *Memnoniella echinata* isolated during a study of pulmonary hemosiderosis in infants. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64: 3620-5.

- Jarvis BB. *Stachybotrys chartarum* : a fungus for our time. *Phytochemistry* 2003; 64: 53-60.
- Jia XN, Zhao JL, Feng JM, Chen RD, Xie KB, Chen DW, Li Y, Liu JM, Dai JG. Bistachybotrysin K, one new phenylspirodrimane dimer from *Stachybotrys chartarum* with potent cytotoxic activity. *J Asian Nat Prod Res* 2020; 22: 496-502.
- Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P. Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health* 1996; 68: 207-18.
- Johanning E, Gareis M, Yang Chin S, Hintikka E-L, Nikulin M, Jarvis B, Dietrich R. Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems (*Stachybotrys chartarum*). *Mycotoxin Research* 1998; 14: 60-73.
- Johanning E, Landsbergis P, Gareis M, Yang CS, Olmsted E. Clinical experience and results of a sentinel health investigation related to indoor fungal exposure. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107: 489-94.
- Jollès P (1999) Chitin and chitinases. Birkhäuser, Basel [u.a.].
- Jolliffe I. Principal Component Analysis. In: *International Encyclopedia of Statistical Science*. Lovric M, ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2011: 1094-6.
- Jong SC, Davis EE. Contribution to the knowledge of *Stachybotrys* and *Memnoniella* in culture. *Mycotaxon* 1976; 3: 409-85.
- Keller NP, Turner G, Bennett JW. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 937-47.
- Keller NP. Translating biosynthetic gene clusters into fungal armor and weaponry. *Nat Chem Biol* 2015; 11: 671-7.
- Keren H, Lev-Maor G, Ast G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 345-55.
- Klug A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys* 2010; 43: 1-21.
- Kluwe H (2006) Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Stachybotrys* spp. in Heu- und Strohproben aus Pferdeställen. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.

- Köck J, Gottschalk C, Ulrich S, Schwaiger K, Gareis M, Niessen L. Rapid and selective detection of macrocyclic trichothecene producing *Stachybotrys chartarum* strains by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal Bioanal Chem* 2021; 413: 4801-13.
- Korpinen E-L, Ylimäki A. Discovery of Toxigenic *Stachybotrys chartarum* Strains in Finland. *Experientia* 1971: 108-9.
- Koskinen O, Husman T, Hyvarinen A, Reponen T, Nevalainen A. Respiratory symptoms and infections among children in a day-care-center with mold problems. *Indoor Air-International Journal of Indoor Air Quality and Climate* 1995; 5: 3-9.
- Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 2013; 54: 391-406.
- Kriek NPJ, Marasas WFO. Field outbreak of ovine stachybotryotoxicosis in South Africa. In: *Trichothecenes - Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Ueno Y, ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V. 1983: 279-84.
- Kuhn DM, Ghannoum MA. Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: infectious disease perspective. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 144-72.
- Lambowitz AM, Zimmerly S. Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3: a003616.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield

- M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowki J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
- Lanier C, Andre V, Seguin V, Heutte N, El Kaddoumi A, Bouchart V, Picquet R, Garon D. Recurrence of *Stachybotrys chartarum* during mycological and toxicological study of bioaerosols collected in a dairy cattle shed. *Ann Agric Environ Med* 2012; 19: 61-7.
- Launer P, Drechsler H, Sowa M. Stachybotryotoxicosis in a horse herd. *Monatshefte für Veterinarmedizin* 1987; 42: 593-4.
- Leino M, Makela M, Reijula K, Haahtela T, Mussalo-Rauhamaa H, Tuomi T, Hintikka EL, Alenius H. Intranasal exposure to a damp building mould, *Stachybotrys chartarum*, induces lung inflammation in mice by satratoxin-independent mechanisms. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1603-10.
- Li DW, Yang CS. Taxonomic history and current status of *Stachybotrys chartarum* and related species. *Indoor Air* 2005; 15 Suppl 9: 5-10.
- Li S, Hartman GL, Jarvis BB, Tak H. A *Stachybotrys chartarum* isolate from soybean. *Mycopathologia* 2001; 154: 41-9.
- Li S, Jiang Z, Xu W, Xie Y, Zhao L, Tang X, Wang F, Xin F. FIP-sch2, a new fungal immunomodulatory protein from *Stachybotrys chlorohalonata*, suppresses proliferation and migration in lung cancer cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017; 101: 3227-35.
- Li Y, Wu C, Liu D, Proksch P, Guo P, Lin W. Chartarlactams A-P, phenylspirodrimanes from the sponge-associated fungus *Stachybotrys chartarum* with antihyperlipidemic activities. *J Nat Prod* 2014; 77: 138-47.

- Lichtenstein JH, Molina RM, Donaghey TC, Amuzie CJ, Pestka JJ, Coull BA, Brain JD. Pulmonary responses to *Stachybotrys chartarum* and its toxins: mouse strain affects clearance and macrophage cytotoxicity. *Toxicol Sci* 2010; 116: 113-21.
- Lindl T, Gstraunthaler G (2008) *Zell-und Gewebekultur: von den Grundlagen zur Laborbank*. Spektrum Akad. Verlag.
- Lodish UH, Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Kaiser C, Krieger M, Kaiser UCA, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H. *Molecular Cell Biology*: W. H. Freeman 2008: 285 ff.
- Löffler G (2007) *Biochemie und Pathobiochemie* Springer, Heidelberg.
- Lombard L, Houbraken J, Decock C, Samson RA, Meijer M, Réblová M, Groenewald JZ, Crous PW. Generic hyper-diversity in *Stachybotriaceae*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 2016; 36: 156-246.
- Lorenz W, Buhrmann C, Mobasheri A, Lueders C, Shakibaei M. Bacterial lipopolysaccharides form procollagen-endotoxin complexes that trigger cartilage inflammation and degeneration: implications for the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2013; 15.
- Lottspeich F, Engels JW, Solodkoff ZL (2012) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014; 15: 550.
- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res* 2008; 18: 1509-17.
- Marmot AF, Eley J, Stafford M, Stansfeld SA, Warwick E, Marmot MG. Building health: an epidemiological study of "sick building syndrome" in the Whitehall II study. *Occup Environ Med* 2006; 63: 283-9.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182: 1545-56.
- Martyn R. *Monosporascus Root Rot and Vine Decline of Melons (MRR/VD)*. Also referred to as sudden wilt, sudden death, melon collapse, *Monosporascus* wilt, and black pepper root rot. *The Plant Health Instructor* 2002;

- Matsuda Y, Abe I. Biosynthesis of fungal meroterpenoids. *Nat Prod Rep* 2016; 33: 26-53.
- Matsumoto M, Minato H, Uotani N, Matsumoto K, Kondo E. New antibiotics from *Cylindrocarpon* sp. *J Antibiot (Tokyo)* 1977; 30: 681-2.
- McCormick SP, Stanley AM, Stover NA, Alexander NJ. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. *Toxins (Basel)* 2011; 3: 802-14.
- McGinn S, Gut IG. DNA sequencing - spanning the generations. *N Biotechnol* 2013; 30: 366-72.
- McLafferty FW, Turecek F (1995) Interpretation von Massenspektren. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Würzburg.
- McQuade AB. Morphogenesis and nutrition in the *Memnionella-Stachybotrys* group of fungi. *J Gen Microbiol* 1963; 30: 429-35.
- Medema MH, Kottmann R, Yilmaz P, Cummings M, Biggins JB, Blin K, de Bruijn I, Chooi YH, Claesen J, Coates RC, Cruz-Morales P, Duddela S, Düsterhus S, Edwards DJ, Fewer DP, Garg N, Geiger C, Gomez-Escribano JP, Greule A, Hadjithomas M, Haines AS, Helfrich EJ, Hillwig ML, Ishida K, Jones AC, Jones CS, Jungmann K, Kegler C, Kim HU, Kötter P, Krug D, Masschelein J, Melnik AV, Mantovani SM, Monroe EA, Moore M, Moss N, Nützmann HW, Pan G, Pati A, Petras D, Reen FJ, Rosconi F, Rui Z, Tian Z, Tobias NJ, Tsunematsu Y, Wiemann P, Wyckoff E, Yan X, Yim G, Yu F, Xie Y, Aigle B, Apel AK, Balibar CJ, Balskus EP, Barona-Gómez F, Bechthold A, Bode HB, Borriss R, Brady SF, Brakhage AA, Caffrey P, Cheng YQ, Clardy J, Cox RJ, De Mot R, Donadio S, Donia MS, van der Donk WA, Dorrestein PC, Doyle S, Driessen AJ, Ehling-Schulz M, Entian KD, Fischbach MA, Gerwick L, Gerwick WH, Gross H, Gust B, Hertweck C, Höfte M, Jensen SE, Ju J, Katz L, Kaysser L, Klassen JL, Keller NP, Kormanec J, Kuipers OP, Kuzuyama T, Kyrpides NC, Kwon HJ, Lautru S, Lavigne R, Lee CY, Linqun B, Liu X, Liu W, Luzhetskyy A, Mahmud T, Mast Y, Méndez C, Metsä-Ketelä M, Micklefield J, Mitchell DA, Moore BS, Moreira LM, Müller R, Neilan BA, Nett M, Nielsen J, O'Gara F, Oikawa H, Osbourn A, Osburne MS, Ostash B, Payne SM, Pernodet JL, Petricek M, Piel J, Ploux O, Raaijmakers JM, Salas JA, Schmitt EK, Scott B, Seipke RF, Shen B, Sherman DH, Sivonen K, Smanski MJ, Sosio M, Stegmann E, Süssmuth RD, Tahlan K, Thomas CM, Tang Y, Truman AW, Viaud M, Walton JD, Walsh CT, Weber T, van Wezel GP, Wilkinson B, Willey JM, Wohlleben W, Wright GD, Ziemert N, Zhang C, Zotchev SB, Breitling R, Takano E, Glöckner FO. Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nat Chem Biol* 2015; 11: 625-31.
- Microsynth. White Paper RNA Sequencing. 2022: https://www.microsynth.com/files/Inhalte/PDFs/Next%20Generation%20Sequencing/WhitePaper_RNASeq.pdf. 02.03.2022.

- Miller JD, Rand TG, Jarvis BB. *Stachybotrys chartarum*: cause of human disease or media darling? *Med Mycol* 2003; 41: 271-91.
- Mommaerts K, Sanchez I, Betsou F, Mathieson W. Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions. *Anal Biochem* 2015; 479: 51-3.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 2008; 5: 621-8.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- Mou P, Zhang Q, Peng J, Jiang X, Zhang L, Zhou Z, Zhang C, Zhu Y. Antibacterial phenylspirodrimanes from the marine-derived fungus *Stachybotrys* sp. SCSIO 40434. *Fitoterapia* 2021; 152: 104937.
- Mussalo-Rauhamaa H, Nikulin M, Koukila-Kähkölä P, Hintikka E-L, Malmberg M, Haahtela T. Health Effects of Residents Exposed to *Stachybotrys* in Water-damaged Houses in Finland. 2010; 19, pp. 476-485.
- Mycobank Database.
<https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>.
07.03.2022.
- Nielsen KF, Hansen MØ, Larsen TO, Thrane U. Production of trichothecene mycotoxins on water damaged gypsum boards in Danish buildings. *International Biodeterioration & Biodegradation* 1998a; 42: 1-7.
- Nielsen KF, Thrane U, Larsen TO, Nielsen PA, Gravesen S. Production of mycotoxins on artificially inoculated building materials. *International Biodeterioration & Biodegradation* 1998b; 42: 9-16.
- Nielsen KF (2002) Mould growth on building materials: Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. Dissertation. Biocentrum-DTU Technical University of Denmark.
- Nielsen KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol* 2003; 39: 103-17.
- Niessen L, Vogel RF. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Int J Food Microbiol* 2010; 140: 183-91.
- Nikulin M, Pasanen A-L, Berg S, Hintikka E-L. *Stachybotrys atra* Growth and Toxin Production in Some Building Materials and Fodder under Different Relative Humidities. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 81,

3421-3424.

Novotny WE, Dixit A. Pulmonary hemorrhage in an infant following 2 weeks of fungal exposure. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154: 271-5.

Pabo CO, Sauer RT. Protein-DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 1984; 53: 293-321.

Palade GE. Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ. *J Biophys Biochem Cytol* 1955; 1: 567-82.

Palmer M, Menninger H, Bernhardt E. River Restoration, Habitat Heterogeneity and Biodiversity: A Failure of Theory or Practice? *Freshwater Biology* 2010; 55: 205-22.

Palyusik M. Experimental stachybotryotoxicosis of young chicks. *Sabouraudia* 1970; 8: 4-8.

Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* 2017; 14: 417-9.

Pestka JJ, Forsell JH. Inhibition of human lymphocyte transformation by the macrocyclic trichothecenes roridin A and verrucarin A. *Toxicol Lett* 1988; 41: 215-22.

Pestka JJ, Yike I, Dearborn DG, Ward MD, Harkema JR. *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building-related illness: new insights into a public health enigma. *Toxicol Sci* 2008; 104: 4-26.

Pieckova E, Hurbankova M, Cerna S, Liskova A, Kovacikova Z, Kollarikova Z, Wimmerova S. Inflammatory and haematotoxic potential of indoor *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) Hughes metabolites. *Arh Hig Rada Toksikol* 2009; 60: 401-9.

Proctor RH, McCormick SP, Alexander NJ, Desjardins AE. Evidence that a secondary metabolic biosynthetic gene cluster has grown by gene relocation during evolution of the filamentous fungus *Fusarium*. *Molecular Microbiology* 2009; 74: 1128-42.

Proctor RH, Van Hove F, Susca A, Stea G, Busman M, van der Lee T, Waalwijk C, Moretti A, Ward TJ. Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. *Mol Microbiol* 2013; 90: 290-306.

Proudfoot N. Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 290-3.

- Qin YD, Fang FM, Zhou JJ, Wang RB, Xu SX, Li LH, Zhang HL. Atranones from *Stachybotrys chartarum* and their antitumor activities in MG-63 human osteosarcoma cells. *Fitoterapia* 2020; 146: 104727.
- Rand TG, Flemming J, David Miller J, Womiloju TO. Comparison of inflammatory responses in mouse lungs exposed to atranones A and C from *Stachybotrys chartarum*. *J Toxicol Environ Health A* 2006; 69: 1239-51.
- Redlich CA, Sparer J, Cullen MR. Sick-building syndrome. *The Lancet* 1997; 349: 1013-6.
- Reed SM, Bayly WM, Sellon DC (2017) *Equine Internal Medicine-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Ren LY, Zhang S, Zhang YJ. Comparative Mitogenomics of Fungal Species in *Stachybotryaceae* Provides Evolutionary Insights into Hypocreales. *Int J Mol Sci* 2021; 22.
- Reponen T, Hyvarinen A, Ruuskanen J, Raunemaa T, Nevalainen A. Comparison of concentrations and size distributions of fungal spores in buildings with and without mold problems. *Journal of Aerosol Science* 1994; 25: 1595-603.
- Rio DC, Ares M, Jr., Hannon GJ, Nilsen TW. Enrichment of poly(A)+ mRNA using immobilized oligo(dT). *Cold Spring Harb Protoc* 2010; 2010: pdb.prot5454.
- Riss TL, O'Brien MA, Moravec RA, Kupcho K, Niles AL. Apoptosis marker assays for HTS. In: *Assay Guidance Manual*. Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, Baell J, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanarayan V, Foley TL, Glicksman M, Hall MD, Haas JV, Hoare SRJ, Inglese J, Iversen PW, Kales SC, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Saradjian P, Sittampalam GS, Tarselli M, Trask OJ, Jr., Wang Y, Weidner JR, Wildey MJ, Wilson K, Xia M, Xu X, eds. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences 2004.
- Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* 2010; 11: R25.
- Rocha O, Ansari K, Doohan FM. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Additives & Contaminants* 2005; 22: 369-78.
- Rokas A, Wisecaver JH, Lind AL. The birth, evolution and death of metabolic gene clusters in fungi. *Nature Reviews Microbiology* 2018; 16: 731-44.
- Rokas A, Mead ME, Steenwyk JL, Raja HA, Oberlies NH. Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity. *Nat Prod Rep* 2020; 37: 868-78.

- Romano G, Veneziano D, Acunzo M, Croce CM. Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis* 2017; 38: 485-91.
- Rosenblum Lichtenstein JH, Molina RM, Donaghey TC, Hsu YH, Mathews JA, Kasahara DI, Park JA, Bordini A, Godleski JJ, Gillis BS, Brain JD. Repeated Mouse Lung Exposures to *Stachybotrys chartarum* Shift Immune Response from Type 1 to Type 2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016; 55: 521-31.
- Rosenkranz R, Borodina T, Lehrach H, Himmelbauer H. Characterizing the mouse ES cell transcriptome with Illumina sequencing. *Genomics* 2008; 92: 187-94.
- Sabir M, Shashikiran U, Kochar SK. Building related illnesses and indoor air pollution. *The Journal of the Association of Physicians of India* 1999; 47: 426-30.
- Samson RA (2010) Food and indoor fungi. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977a; 74: 5463-7.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977b; 265: 687-95.
- Sanger F, Coulson AR. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett* 1978; 87: 107-10.
- Sanger F. The early days of DNA sequences. *Nat Med* 2001; 7: 267-8.
- Scharf DH, Heinekamp T, Brakhage AA. Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1003859.
- Scheel CM, Rosing WC, Farone AL. Possible sources of sick building syndrome in a Tennessee middle school. *Arch Environ Health* 2001; 56: 413-7.
- Scherrer K, Imaizumi-Scherrer MT, Reynaud CA, Therwath A. On pre-messenger RNA and transcriptions. A review. *Mol Biol Rep* 1979; 5: 5-28.
- Schneider DJ, Marasas WF, Dale Kuys JC, Kriek NP, Van Schalkwyk GC. A field outbreak of suspected stachybotryotoxicosis in sheep. *Journal of the South African Veterinary Association* 1979; 50: 73-81.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 6241-

6.

Schultes NP, Castañeda-Ruiz RF, Marra RE, Strzalkowski N, Li DW. Erratum: *Striatibotrys neoeucylindrosporus* sp. nov., a *Stachybotrys*-like fungus from North America. *Int J Syst Evol Microbiol* 2021; 71.

Segundo-Val IS, Sanz-Lozano CS. Introduction to the Gene Expression Analysis. *Methods Mol Biol* 2016; 1434: 29-43.

Semeiks J, Borek D, Otwinowski Z, Grishin NV. Comparative genome sequencing reveals chemotype-specific gene clusters in the toxigenic black mold *Stachybotrys*. *BMC Genomics* 2014; 15: 590.

Shen L, Porée FH, Gaslonde T, Lalucque H, Chapeland-Leclerc F, Ruprich-Robert G. Functional characterization of the sterigmatocystin secondary metabolite gene cluster in the filamentous fungus *Podospora anserina*: involvement in oxidative stress response, sexual development, pigmentation and interspecific competitions. *Environ Microbiol* 2019; 21: 3011-26.

Sidhu GS. Mycotoxin Genetics and Gene Clusters. *European Journal of Plant Pathology* 2002; 108: 705-11.

Sims D, Sudbery I, Illott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet* 2014; 15: 121-32.

Slot JC, Rokas A. Horizontal transfer of a large and highly toxic secondary metabolic gene cluster between fungi. *Curr Biol* 2011; 21: 134-9.

Spiering MJ, Moon CD, Wilkinson HH, Schardl CL. Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. *Genetics* 2005; 169: 1403-14.

Steinberg RA. Growth of Fungi in Synthetic Nutrient Solutions. *Botanical Review* 1939; 5: 327-50.

Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2015; 111: A3.B.1-a3.B.

Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. Application of an LC–MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. *Food Chemistry* 2010; 119: 408-16.

Sung JH, Srinivasan B, Esch MB, McLamb WT, Bernabini C, Shuler ML, Hickman JJ. Using physiologically-based pharmacokinetic-guided "body-on-a-chip" systems to predict mammalian response to drug and chemical exposure. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014; 239: 1225-39.

- Tantaoui-Elaraki A, Mekouar SL, el Hamidi M, Senhaji M. Toxigenic strains of *Stachybotrys atra* associated with poisonous straw in Morocco. *Vet Hum Toxicol* 1994; 36: 93-6.
- Trail F, Mahanti N, Rarick M, Mehigh R, Liang SH, Zhou R, Linz JE. Physical and transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 2665-73.
- Tripi PA, Modlin S, Sorenson WG, Dearborn DG. Acute pulmonary haemorrhage in an infant during induction of general anaesthesia. *Paediatr Anaesth* 2000; 10: 92-4.
- Trout D, Bernstein J, Martinez K, Biagini R, Wallingford K. Bioaerosol lung damage in a worker with repeated exposure to fungi in a water-damaged building. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 641-4.
- Ueno Y. Mode of action of trichothecenes. *Annales de la nutrition et de l'alimentation* 1977; 31: 885-900.
- Ueno Y (1983) *Trichothecenes - Chemical, biological and toxicological aspects*. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam.
- Ueno Y. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundamental and Applied Toxicology* 1984; 4: 124-32.
- Ueno Y. The toxicology of mycotoxins. *Crit Rev Toxicol* 1985; 14: 99-132.
- Ulrich S, Biermaier B, Bader O, Wolf G, Straubinger RK, Didier A, Sperner B, Schwaiger K, Gareis M, Gottschalk C. Identification of *Stachybotrys* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2016; 408: 7565-81.
- Ulrich S (2016) Charakterisierung ausgewählter Isolate von *Stachybotrys* spp. anhand kulturmorphologischer, molekularbiologischer und massenspektrometrischer Verfahren. Dissertation. In: Department of Veterinary Science. Ludwig-Maximilians University, Munich.
- Ulrich S, Niessen L, Ekruth J, Schafer C, Kaltner F, Gottschalk C. Truncated satratoxin gene clusters in selected isolates of the atranone chemotype of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes. *Mycotoxin Research* 2020; 36: 83-91.
- Ulrich S, Schäfer C. Toxin production by *Stachybotrys chartarum* genotype S on different culture media. *J Fungi (Basel)* 2020; 6.
- Ulrich S, Gottschalk C, Biermaier B, Bahlinger E, Twarużek M, Asmussen S, Schollenberger M, Valenta H, Ebel F, Dänicke S. Occurrence of type A, B

- and D trichothecenes, zearalenone and stachybotrylactam in straw. *Arch Anim Nutr* 2021; 75: 105-20.
- Ulrich S, Lang K, Niessen L, Baschien C, Kosicki R, Twarużek M, Straubinger RK, Ebel F. The evolution of the satratoxin and atranone gene clusters of *Stachybotrys chartarum*. *Journal of Fungi* 2022; 8.
- Van Reenen-Hoekstra ES, Samson RA, Verhoeff J, Van Wijnen H, Brunekreef B. Detection and identification of moulds in dutch houses and non-industrial working environments. *Grana* 1991; 30: 418-23.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51.
- Vesper SJ, Dearborn DG, Yike I, Sorenson WG, Haugland RA. Hemolysis, toxicity, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Stachybotrys chartarum* strains. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3175-81.
- Vesper SJ, Dearborn DG, Elidemir O, Haugland RA. Quantification of siderophore and hemolysin from *Stachybotrys chartarum* strains, including a strain isolated from the lung of a child with pulmonary hemorrhage and hemosiderosis. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2678-81.
- Vesper SJ, Magnuson ML, Dearborn DG, Yike I, Haugland RA. Initial characterization of the hemolysin stachylysin from *Stachybotrys chartarum*. *Infection and Immunity* 2001; 69: 912-6.
- Vesper SJ, Vesper MJ. Stachylysin may be a cause of hemorrhaging in humans exposed to *Stachybotrys chartarum*. *Infect Immun* 2002; 70: 2065-9.
- Vindeløv LL, Christensen IJ. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1990; 11: 753-70.
- Wang A, Xu Y, Gao Y, Huang Q, Luo X, An H, Dong J. Chemical and bioactive diversities of the genera *Stachybotrys* and *Memnoniella* secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews* 2014; 14: 1-33.
- Wang Y, Ghaffari N, Johnson CD, Braga-Neto UM, Wang H, Chen R, Zhou H. Evaluation of the coverage and depth of transcriptome by RNA-Seq in chickens. *BMC Bioinformatics* 2011; 12 Suppl 10: S5.
- Wang Y, Hyde KD, McKenzie EHC, Jiang Y-L, Li D-W, Zhao D-G. Overview of *Stachybotrys* (*Memnoniella*) and current species status. *Fungal Diversity* 2015; 71: 1-67.

- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 57-63.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis M, Gelfand D, Shinsky J, White T, eds.: Academic Press 1990: 315-22.
- Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3.
- Williams DH, Stone MJ, Hauck PR, Rahman SK. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod* 1989; 52: 1189-208.
- Woloshuk CP, Foutz KR, Brewer JF, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA. Molecular characterization of aflR, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 2408-14.
- Wu Q, Wang X, Nepovimova E, Miron A, Liu Q, Wang Y, Su D, Yang H, Li L, Kuca K. Trichothecenes: immunomodulatory effects, mechanisms, and anti-cancer potential. *Arch Toxicol* 2017; 91: 3737-85.
- Xavier JJM, Scussel VM. Development of an LC-MS/MS method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Brazil nut. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 2008; 88: 425-33.
- Yang B, He Y, Lin S, Zhang J, Li H, Wang J, Hu Z, Zhang Y. Antimicrobial dolabellanes and atranones from a marine-derived strain of the toxigenic fungus *Stachybotrys chartarum*. *J Nat Prod* 2019; 82: 1923-9.
- Yang B, Long J, Pang X, Lin X, Liao S, Wang J, Zhou X, Li Y, Liu Y. Structurally diverse polyketides and phenylspirodrimanones from the soft coral-associated fungus *Stachybotrys chartarum* SCSIO41201. *J Antibiot (Tokyo)* 2021; 74: 190-8.
- Yoshizawa T, Otsubo K, Sasaki T, Nakamura K. Acute toxicities of satratoxins G and H in mice. A histopathological observation with special reference to the liver injury caused by satratoxin G. *Maikotokishin (Tokyo)* 1986; 23: 53-7. Zitiert nach JARVIS, B.B. Macrocyclic Trichothecenes. In: SHARMA, R.P., SALUNKHE, D.K. 1991. *Mycotoxins and Phytoalexins*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 361-421.
- Zhang H, He L, Cai L. Transcriptome Sequencing: RNA-Seq. *Methods Mol Biol* 2018; 1754: 15-27.
- Zhao S, Zhang Y, Gordon W, Quan J, Xi H, Du S, von Schack D, Zhang B. Comparison of stranded and non-stranded RNA-seq transcriptome profiling and investigation of gene overlap. *BMC Genomics* 2015; 16: 675.

- Zhou G, Whong WZ, Ong T, Chen B. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. *Mol Cell Probes* 2000; 14: 339-48.
- Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv* 2012; 30: 1158-70.
- Zhu M, Cen Y, Ye W, Li S, Zhang W. Recent advances on macrocyclic trichothecenes, their bioactivities and biosynthetic pathway. *Toxins (Basel)* 2020; 12.
- Zuck KR. Isolates Intermediate between *Stachybotrys* and *Memnoniella*. *Mycologia* 1946; 38: 69-76.

IX. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Frank Ebel, für seine fachliche Unterstützung und stets ruhige Art.

Zudem möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Sebastian Ulrich bedanken. Von Anfang an hat er seine Begeisterung für sein Forschungsthema gezeigt und versucht jeden anderen damit anzustecken.

Ich danke sehr herzlich der Brigitte und Wolfram Gedek Stiftung für die großzügige finanzielle Unterstützung während meiner Promotion.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Straubinger bedanken. Er war mir nicht nur während der Zeit als Stipendiatin der Hanns-Seidel-Stiftung in der Zeit meines Studiums, sondern darüber hinaus, ein verständnisvoller Mentor.

Ein großer Dank gilt zudem all meinen lieben KollegInnen am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie. Ganz besonders möchte ich hier unsere tollen TAs Eva, Stephanie, Christoph und Astrid hervorheben: Sie hatten immer ein offenes Ohr und waren stets eine große Unterstützung im Laboralltag. Genauso bedanke ich mich bei meinen Mitdotorandinnen: Isabell, den beiden Kathas, Anna, Jasmin und Sophie. Jede war mir auf unterschiedlichste Weise eine Unterstützung: Gemeinsame Kaffee- und Mittagspausen sowie aufmunternde und beruhigende Gespräche kamen neben der Promotion nicht zu kurz.

Die wohl wichtigste Stütze in dieser Zeit waren meine Eltern: Ich danke ihnen für ihre bedingungslose Unterstützung. Mama, du bist die Powerfrau, die unsere Familie zusammenhält und gleichzeitig mein größtes Vorbild. Danke an meine Geschwister, die ihrer kleinen Schwester als seelische Unterstützung zur Seite standen. Ich danke Maria, die mir immer wieder hilfreiche Tipps für die Promotion auf den Weg gegeben hat. Mein Dank gilt Waqas, der mein Ruhepol in schwierigen Zeiten ist. Danke für alles!