

Entwicklung und Implementierung eines DNA-Mikroarrays zur Analyse von Genen der Mykotoxinbiosynthese

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Biologe Markus Schmidt-Heydt
aus Karlsruhe

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt, die wörtlich oder dem Inhalt nach aus fremden Arbeiten entnommenen Stellen, bildlichen Darstellungen und dergleichen als solche genau kenntlich gemacht und keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe. Die vorliegende Dissertation wurde weder anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Karlsruhe, Oktober 2007

Unterschrift.....Markus Schmidt-Heydt

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung	1
1.1 Grundlagen filamentöser Pilze	1
1.1.1 Vorkommen, Vorteile und Problematik	1
1.1.2 Metabolismus.....	3
1.2 Grundlagen Mykotoxine.....	3
1.2.1 Biosynthese	6
1.2.2 Giftwirkung	6
1.2.3 Einflussfaktoren und Regulation	8
1.2.4 Analytik	11
1.3 Zielsetzung der Arbeit	14
1.4 Vorarbeiten	15
2. Materialien und Methoden	19
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Verwendete Primerpaare	19
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Puffer und Lösungen	22
2.1.4 Medien	22
2.1.5 Kits	22
2.1.6 Primer und Oligonukleotidsynthese.....	22
2.1.7 Geräte.....	22
2.1.8 Verwendete Pilzstämme	22
2.2 Methoden	24
2.2.1 Methoden zur Herstellung und Anwendung des Mikroarray	24
2.2.1.1 Spotten des Mikroarrays	24
2.2.1.2 RNA Isolierung.....	24
2.2.1.3 Reverse Transkription der mRNA in cDNA und Markierung	25
2.2.1.4 cDNA Aufreinigung.....	26
2.2.1.5 Hybridisierung und Scannen des Mikroarrays.....	27

2.2.2	Molekularbiologische Standardmethoden	27
2.2.2.1	<i>Isolierung genomischer DNA aus dem Myzel von Schimmelpilzen</i>	27
2.2.2.2	<i>Spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der PCR</i>	28
2.2.2.3	<i>Bestimmung der Kopienzahl eines PCR-Produktes</i>	29
2.2.2.4	<i>Expand PCR</i>	29
2.2.2.5	<i>Quantitative Real Time PCR</i>	29
2.2.2.6	<i>Real Time PCR</i>	30
2.2.2.7	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	31
2.2.2.8	<i>Isolierung von PCR-Fragmenten aus dem Agarosegel</i>	31
2.2.2.9	<i>Southern Blot</i>	32
2.2.3	Mikrobiologische Standardmethoden	34
2.2.3.1	<i>Nährmedien und Wachstumsbedingungen</i>	34
2.2.3.1.1	<i>Modifikation der Nährmedien</i>	34
2.2.3.1.2	<i>Einstellen des pH im Medium</i>	35
2.2.3.1.3	<i>Einstellen der Temperatur im Medium</i>	35
2.2.3.1.4	<i>Einstellen der Wasseraktivität im Medium</i>	35
2.2.3.1.5	<i>Minimalnährmedien</i>	35
2.2.3.2	<i>Weitere Inkubationsbedingungen</i>	36
2.2.3.2.1	<i>Inkubation unter Licht verschiedener Wellenlänge</i>	36
2.2.3.2.2	<i>Inkubation im 24 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus</i>	37
2.2.3.3	<i>Infektion von Weizenpflanzen mit Fusarium unter kontrollierten Bedingungen</i>	38
2.2.3.4	<i>Probenahme, Toxinextraktion und Analytik</i>	39
2.2.3.4.1	<i>Penicillium/Ochratoxin</i>	39
2.2.3.4.1.1	<i>Ochratoxin A Bestimmung mittels Dünnschichtchromatographie</i>	39
2.2.3.4.1.2	<i>Ochratoxin Bestimmung mittels HPLC</i>	39
2.2.3.4.2	<i>Fusarium/Deoxynivalenol</i>	40
2.2.3.4.2.1	<i>Deoxynivalenolbestimmung mittels Dünnschichtchromatographie</i>	40
2.2.3.4.2.2	<i>Deoxynivalenolbestimmung mittels ELISA</i>	41
2.2.3.5	<i>Transformation</i>	41
2.2.3.5.1	<i>Bakterientransformation / Transformation von E. coli</i>	41
2.2.3.5.1.1	<i>Ligation mit T4-DNA-Ligase</i>	41
2.2.3.5.1.2	<i>Transformation kompetenter E. coli Zellen</i>	42
2.2.3.5.1.3	<i>Plasmidvermehrung in E. coli –Transformanten</i>	42
2.2.3.5.1.4	<i>Maxipräparation von Bakterien-DNA</i>	43
2.2.3.5.2	<i>Pilztransformation/Transformation von Penicillium</i>	43
2.2.3.5.2.1	<i>Herstellen von Protoplasten</i>	43

2.2.3.5.2.2	<i>Protoplastentransformation</i>	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Entwicklung und Validierung des Mikroarrays „Mycochip“	45
3.1.1	<i>Auswahl der Gensequenzen und Primerpaare</i>	45
3.1.2	<i>Ausarbeitung eines Layouts für den „Mycochip“</i>	45
3.1.3	<i>Auswahl eines geeigneten Bindesubstrates</i>	47
3.1.4	<i>Auswahl eines geeigneten Spott-Puffers für die Gensonden</i>	48
3.1.5	<i>Bestimmung der optimalen Druckbedingungen</i>	49
3.1.6	<i>Weitere Postprozessierungsschritte zur Optimierung</i>	50
3.1.7	<i>Normalisierung der Hybridisierungsdaten</i>	51
3.2	Testen der Funktionalität des Mikroarray „Mycochip“	53
3.3	Anwendung des Mycochip für verschiedene Fragestellungen.....	55
3.3.1	<i>Einfluss des Substrats auf Genexpression und Mykotoxinbiosynthese in Fusarium culmorum und Penicillium verrucosum</i>	55
3.3.1.1	<i>Einfluss des Substrats in Fusarium culmorum</i>	55
3.3.1.2	<i>Einfluss des Substrats in Penicillium verrucosum</i>	58
3.3.2	Analyse der differentiellen Genexpression in <i>Fusarium</i>	59
3.3.2.1	<i>Durchführung einer Genexpressionskinetik in F. culmorum</i>	59
3.3.3	Einfluss äußerer Faktoren auf Genexpression und Mykotoxin- bildung in <i>Fusarium culmorum</i> und <i>Fusarium graminearum</i>	61
3.3.3.1	<i>Einfluss des pH in Fusarium culmorum</i>	61
3.3.3.2	<i>Einfluss des pH in Fusarium graminearum</i>	63
3.3.3.3	<i>Einfluss der Wasseraktivität in Fusarium culmorum</i>	64
3.3.3.4	<i>Einfluss der Wasseraktivität in Fusarium graminearum</i>	66
3.3.3.5	<i>Einfluss der Temperatur in Fusarium culmorum</i>	68
3.3.3.6	<i>Einfluss der Temperatur in Fusarium graminearum</i>	70
3.3.3.7	<i>Einfluss einer Kombination von zwei Faktoren auf Genexpression und Mykotoxinbildung in F. culmorum und F. graminearum</i>	72
3.3.3.8	<i>Einfluss einer Kombination von drei Faktoren auf Genexpression und Mykotoxinbildung in Fusarium culmorum</i>	77
3.3.4	Analyse der differentiellen Genexpression in <i>Penicillium</i>	79
3.3.4.1	<i>Durchführung einer Genexpressionskinetik in P. nordicum</i>	79
3.3.5	Einfluss äußerer Faktoren auf Genexpression und Mykotoxin- bildung in <i>Penicillium nordicum</i> und <i>Penicillium verrucosum</i>	81
3.3.5.1	<i>Einfluss des pH in Penicillium nordicum</i>	81
3.3.5.2	<i>Einfluss des pH in Penicillium verrucosum</i>	83

3.3.5.3	<i>Einfluss der Wasseraktivität in Penicillium nordicum</i>	84
3.3.5.4	<i>Einfluss der Wasseraktivität in Penicillium verrucosum</i>	86
3.3.5.5	<i>Einfluss der Temperatur in Penicillium nordicum</i>	87
3.3.5.6	<i>Einfluss der Temperatur in Penicillium verrucosum</i>	88
3.3.5.7	<i>Einfluss einer Kombination von zwei Faktoren auf Genexpression und Mykotoxinbildung in P. nordicum und P. verrucosum</i>	91
3.3.5.8	<i>Einfluss einer Kombination von drei Faktoren auf Genexpression und Mykotoxinbildung in Penicillium nordicum</i>	95
3.3.6	Einfluss von Licht auf Genexpression und Toxinbiosynthese in Penicillium verrucosum	97
3.3.6.1	<i>Identifikation und Inaktivierung eines White-collar-1 Homolog in P. verrucosum</i>	99
3.3.6.2	<i>Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Lichtwellenlängen auf P. verrucosum</i>	102
3.3.6.3	<i>Untersuchung der Sensitivität des OTA-Moleküls gegen Blaulichtbestrahlung</i>	104
3.3.7	In vivo-Anwendungen des Mycochip	105
3.3.7.1	<i>Nachweis von Fusarium in Weizen mit Mikroarray und Real Time PCR</i>	105
3.3.7.2	<i>Nachweis von P. verrucosum in Weizen mit PCR, Real Time PCR und Mikroarray</i>	107
3.3.7.3	<i>Expressionsverlauf der Trichothecengene bei Wachstum von F. culmorum auf Weizen unterschiedlicher Resistenz gegen Fusarium</i>	113
3.3.8	Differenzierung zwischen unterschiedlichen DON-Chemotypen von Fusarium graminearum	117
4	Diskussion	121
5.	Anhang	143
6.	Literatur	153
Abbildungen	164
Tabellen	168
Danksagung	169
Publikationsliste	170
Lebenslauf	173

für meine liebe Frau, Romy

Zusammenfassung

Ein DNA-Mikroarray für die Analyse der differentiellen Expression und Regulation von Biosynthesegenen der wichtigsten lebensmittelrelevanten Mykotoxine Aflatoxin, Ochratoxin, Trichothecen und Fumonisin, konnte im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und erfolgreich angewandt werden. Der Mikroarray, „Mycochip“, trägt Sonden dieser geclustert vorliegenden Gene in der Reihenfolge der Biosyntheseschritte des jeweiligen Mykotoxins. Durch die Anwendung dieses „Mycochip“ konnten verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden, wie zum Beispiel die Identifikation von Geninduktionsmustern, die speziesspezifisch und für eine aktive Toxinbiosynthese indikativ waren. Des Weiteren konnte der Einfluss verschiedener extrinsischer Faktoren wie Substrat, pH, Wasseraktivität, Temperatur und Licht unterschiedlicher Wellenlänge auf die Expression der Biosynthesegene und deren Korrelation zur Mykotoxinbildung in repräsentativen Feld- und Lagerpilzen analysiert werden. So konnten Funktionalität, Sensitivität und Spezifität des Mycochips validiert werden. Im Verlauf der Experimente konnte beobachtet werden, dass die Induktion der Mykotoxinbiosynthesegene vornehmlich unter physiologischen Stressbedingungen erfolgt. Hierbei kam es jeweils zur Ausprägung eines Hauptinduktionspeaks nahe dem Wachstumsoptimum des untersuchten Pilzstammes, sowie eines weiteren Nebenpeaks kurz vor der Inaktivierung. Zudem konnten oszillierende Schwankungen in der Genexpression beobachtet werden, die zum einen endogen basiert scheinen und zum anderen durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge beeinflusst werden. Durch die Anwendung des Mycochip war es weiterhin möglich, eine Infektion von Weizenpflanzen mit unterschiedlicher Resistenz gegen *Fusarium* über den Zeitraum von der Anzucht bis zur Ernte auf transkriptionaler Ebene in *F. culmorum* zu monitoren und mit der Mykotoxinbiosynthese zu korrelieren. Als Identifikations- und Differenzierungstool konnte der Mycochip eingesetzt werden um Infektionen von Weizen mit *Penicillium* und *Fusarium* nachzuweisen und um unterschiedlich auftretende Mykotoxin-Chemotypen von *F. graminearum* zu diskriminieren.

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
cDNA	copy DNA (engl.)
Cy	Cyanin-Derivat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.)
dNTP	desoxy-Nukleotid-tri-Phosphat
DON	Deoxynivalenol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IPTG	Isopropyl-thio- β -D-galactosidase
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LB	Luria-Bertani-Medium
MG	Malz-Glucose-Medium
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIV	Nivalenol
OTA	Ochratoxin A
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	NaCl-Na ₃ Citrat
TBE	Tris-buffered-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1 Grundlagen filamentöser Pilze: Die Bezeichnung „Pilz“ leitet sich ursprünglich von den Hutpilzen ab (*lat.* fungus; *gr.* Mykes), was per Definitionem für eine Gruppe chlorophyllfreier, heterotropher, eukaryontischer Organismen steht. Die Zahl der bis zum heutigen Zeitpunkt beschriebenen Pilzarten beläuft sich auf ungefähr 120.000 wobei die tatsächliche Anzahl jedoch eher bei über 300.000 Pilzspezies liegt und somit diejenige der Samenpflanzen bei weitem übersteigt (Campbell, 2000). Pilze treten als Saprophyten, Symbionten und Parasiten auf. Saprophytische Pilze leben in und auf abgestorbenen organischen Substraten und beziehen notwendige Kohlenstoffverbindungen mittels oxidativen Abbaus. Biotrophe Pilze hingegen sind als Symbionten oder Parasiten auf direkten Kontakt mit Pflanzen, Tieren, Algen, Protozoen oder Bakterien angewiesen. Flechten (*Lichenes*) sind nur ein Beispiel für eine erfolgreiche Symbiose zwischen Pilz und in diesem Falle einer photosynthetisch aktiven Grün- oder Blaualge. Zu einer chemoorganoheterotrophen Ernährung sind Pilze durch ein Arsenal von Enzymen befähigt. Es wird vermutet, dass Pilze schon seit 800-1000 Millionen Jahren existieren, ein Fund aus 850 Millionen Jahre altem Schiefergestein in Kanada wird als Pilzfossil gedeutet, der erfolgreiche Landgang der Pflanzen wäre zudem nach heutigen Erkenntnissen ohne Pilzsymbiosen vermutlich nicht möglich gewesen (dies belegen u.a. neuere Untersuchungen der AG Kottke und Weiß; Universität Tübingen).

1.1.1 Vorkommen, Vorteile und Problematik: Es gibt wohl keinen Bereich in unserem Leben, in dem wir nicht bewusst oder unbewusst Umgang mit Mikromyceten haben. Ebenso vergeht kein Tag, an dem wir nicht Nutzen oder Schaden aus ihnen ziehen, was die folgenden Beispiele verdeutlichen: Neun von zehn Landpflanzen leben in Symbiose mit Pilzen, die sich an ihren Wurzeln angesiedelt haben. Hefepilzkulturen von *Saccharomyces cerevisiae* werden zur Brotherstellung eingesetzt, der Pilz wandelt hier in einer chemischen Reaktion die Stärke im Mehl zu Zucker und schließlich in Kohlendioxid um, welches den

Teig „aufgehen“ lässt; unter anaeroben Bedingungen hingegen wird der Fruchtzucker der Weintrauben während des Gärprozesses zu Alkohol umgesetzt und Geschmackstoffe freigesetzt. Käsen wie Camembert und Roquefort verdanken den Schimmelpilzkulturen *Penicillium camembertii* und *Penicillium roquefortii* ihren Geschmack. Schimmelpilze der Gattungen *Rhizopus*, *Mucor* und *Aspergillus* werden außerdem in Asien zur Herstellung zahlreicher fermentierter Lebensmittel verwendet, wie zum Beispiel von Sojabohnenprodukten. Toxine des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* werden hingegen aus Fermenterkulturen von *Claviceps*-Myzel gewonnen, um in der Geburtshilfe zur Verringerung von Gebärmutterblutungen eingesetzt zu werden, bzw. finden als Blutdrucksenker und Migränetherapeutikum Verwendung. Der Schimmelpilz *Aspergillus niger* wird darüber hinaus zur großtechnischen Herstellung des Antioxydations- und Konservierungsmittels Zitronensäure eingesetzt, die er aus zuckerhaltigen Abfallstoffen produziert. Allgemein finden filamentöse Pilze Verwendung bei der biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren, Zuckern, Vitaminen und Hormonen. Nachteil einiger Schimmelpilze ist zum Beispiel das allergene Potential der Schimmelpilzsporen und die Unmöglichkeit, eine Exposition mit diesen zu vermeiden. Die Oberflächen der meisten Substrate sind mit Sporen kontaminiert und es ist extrem schwer bis unmöglich, eine Kontamination von Lebensmitteln oder Wohnräumen mit Sporen zu verhindern bzw. alle Sporen zu entfernen oder zu deaktivieren. Außer dem allergenen Gefährdungspotential kommt hinzu, dass einige Spezies unter den Schimmelpilzen in der Lage sind, so genannte Mykotoxine zu bilden. Mykotoxine tangieren die Menschheit schon seit Beginn des organisierten Nahrungsmittelanbaus. Der Ergotismus, eine Krankheit die nach dem Verzehr von Mutterkorn auftritt, wird bereits in der Bibel als so genanntes Antoniusfeuer beschrieben. Die Sklerotien des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* produzieren Toxine wie das Ergotamin, das schwere Vergiftungen und Nierenschäden verursacht, wenn die Mutterkörner mit dem Getreide zermahlen werden, und so das Gift in die Nahrung gelangt. (Penny *et al.*, 1979).

1.1.2 Metabolismus: Bei filamentösen Pilzen kann zwischen zwei wichtigen metabolischen Phasen unterschieden werden. Zum einen der Trophophase (exponentielle Phase), sowie zum anderen der Idiophase (stationäre Phase). Die exponentielle Phase zeichnet sich durch eine konstante, minimale Generationszeit aus. Die Substratkonzentration nimmt ab, die Biomasse zu und Stoffwechselprodukte des Primärstoffwechsels sammeln sich in der Zelle an. Im Primärstoffwechsel werden Makromoleküle und Lipide synthetisiert sowie Energie und Grundbausteine für den Stoffumsatz geliefert. Zu den Primärmetaboliten zählt man beispielsweise Aminosäuren, Vitamine und Nukleotide, sowie Zwischenprodukte des Intermediärstoffwechsels (z. B. die Säuren des Zitronensäurezyklus). Die stationäre Phase hingegen ist gekennzeichnet durch eine Verarmung des Nährstoffangebotes. Die Zellen wachsen in dieser Phase kaum mehr. Die stationäre Phase kann jedoch auch durch eine Änderung der Umweltbedingungen oder Akkumulation von toxischen Stoffwechselprodukten eingeleitet werden. In diesem Fall werden spezifische Enzyme aktiviert, die diese in sekundäre Metabolite umwandeln können, welche u.a. in das umgebende Medium ausgeschieden werden. Der Vorgang der Sekundärmetabolitbildung wird äußerlich meist von der Sporenbildung begleitet (Rudolph, 1962; Panasenko, 1967). Im Gegensatz zum Primärmetabolismus ist der Sekundärmetabolismus für den Organismus nicht essentiell (Czapek, 1925). Es existiert aktuell keine allgemeingültige Theorie, sondern nur Erklärungsansätze zur Aufgabe des Sekundärstoffwechsels, wie beispielsweise die Verwertung überschüssiger Stoffwechselprodukte, Entgiftungsreaktionen im Stoffwechsel, Abwehrwirkung nach außen durch Hemmung von Konkurrenten oder Fraßschutz. Die Metabolite des Sekundärstoffwechsels, zu denen unter anderen Antibiotika, Farbstoffe und auch die Mykotoxine zählen, variieren in Abhängigkeit von der Pilzart.

1.2 Grundlagen Mykotoxine: Mykotoxine werden definiert als sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die auf Menschen, Tiere und Pflanzen akut oder chronisch toxisch einwirken (Cast, 2003). Über 400 Mykotoxine sind bis heute bekannt, diese werden von ungefähr 120

Schimmelpilzgattungen produziert. Die Mehrzahl der Mykotoxinbildner gehört den Deuteromyceten an, Ascomyceten ohne sexuelle Hauptfruchtform. Die Lebensmittel relevanten Mykotoxine werden dabei vor allem von drei Hauptgattungen produziert. Zum einen von *Penicillium*, der auf Obst, Gemüse und Getreide vorkommt; *Aspergillus* auf ölhaltigen Samen, zuckerhaltigen Früchten und Getreide, sowie *Fusarium* auf Getreide, Obst und Gemüse. Von allen genannten Gattungen existieren Mykotoxinbildner und -Nichtbildner, möglich ist auch die Bildung mehrerer Toxine oder Derivate. Zwischen Bildner und Nichtbildner sowie zwischen unterschiedlichen Chemotypen ist keine Unterscheidung anhand morphologischer Merkmale möglich. Nur auf genetischer und analytischer Ebene kann eine Identifizierung und Differenzierung erfolgen. Ein weiterer Unsicherheitsfaktor ist die Möglichkeit der Anastosomenbildung zwischen Myzelfäden nahe verwandter Arten. Über diese können Zellkerne und Plasma ausgetauscht werden und damit beispielsweise die Fähigkeit, ein bestimmtes Toxin zu bilden. Mykotoxine werden bereits auf der Kulturpflanze auf dem Feld von dem jeweiligen Kontaminanten gebildet, wie zum Beispiel im Fall von *Fusarium*, oder sie entstehen bei Lagerung, Verarbeitung oder während des Transports der Nahrungs- oder Futtermittel zum Verbraucher beispielsweise durch *Penicillium*. Von den bekannten Mykotoxinen besitzen hauptsächlich Relevanz unter dem Aspekt der Nahrungsmittelsicherheit vor allem die Aflatoxine (Abb. 1) (Gong *et al.*, 2002),

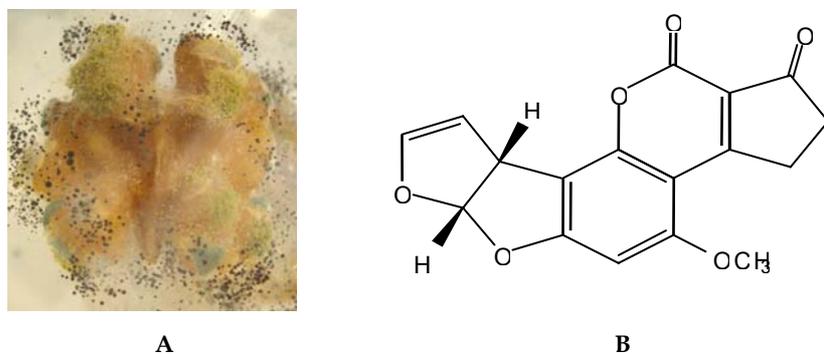


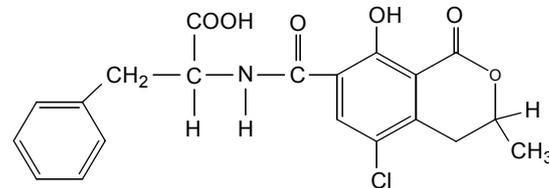
Abb. 1: *Aspergillus* sp. **A** verschiedene *Aspergillus* auf einer Walnuss, **B** Molekülstruktur Aflatoxin B1.

mit über 20 verschiedenen Derivaten, deren Grundgerüst ein Difuran-Cumarinbaustein ist; Ochratoxin (Abb. 2), (Zeljetic *et al.*, 2006), dessen

Grundgerüst ein Methylisocumarinbaustein ist, der über eine Amidbindung mit Phenylalanin verbunden ist;



A



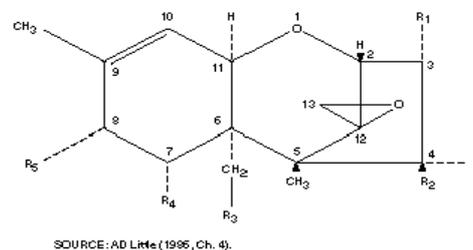
B

Abb. 2: *Penicillium* sp. **A** *P. verrucosum* auf Weizenkörnern, **B** Molekülstruktur Ochratoxin A.

sowie die Fusarientoxine (Abb. 3), (Desjardins *et al.*, 1993). Zu diesen gehören u.a. die Trichothecene T-2, Deoxynivalenol, Nivalenol sowie Zearalenon und Fumonisin.



A



SOURCE: AD LITE (1986, Ch. 4).

B

Abb. 3: *Fusarium* sp. **A** Mit *Fusarium* infizierte Getreideähre, **B** Grundstruktur Trichothecene.

Trichothecene lassen sich aufgrund ihrer funktionellen Gruppen in 2 Haupttypen unterteilen. Zum einen in die Typ-A-Trichothecene, diese werden durch eine von einer Carbonylfunktion abweichende, zumeist sauerstoffhaltige Gruppe am C-8 charakterisiert (Ueno, 1977), sowie die Typ-B-Trichothecene die sich durch eine Carbonylfunktion in der C-8-Position auszeichnen. Das am häufigsten natürlich auftretende Fusarientoxin, Deoxynivalenol (DON), wurde 1972 erstmals in Japan von Morooka *et al.* (1972) aus Getreide isoliert, das mit *F. roseum* kontaminiert war. Es wurde unter dem Namen Vomitoxin in den USA charakterisiert (Wolff, 1995). Von einigen Mykotoxinen existieren mannigfaltige Derivate, zum Beispiel

die an unterschiedlichen C-Atomen acetylierten DON-Subtypen, 3-Acetyldeoxynivalenol und 15-Acetyldeoxynivalenol. Andere toxisch wirkende Sekundärmetabolite sind das Patulin, welches als Hydroxypyrofuran vorkommt und das Nierengift Citrinin, eine Benzopyrancarbonsäure. Citrinin wird von mehreren *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten gebildet und wirkt im gleichen Maße sowohl toxisch als auch antibiotisch, so dass eine eindeutige Unterscheidung zwischen Toxin und Antibiotikum nicht immer möglich ist. Durch moderne Verarbeitungsmethoden haben die Mutterkornalkaloide (Wolff *et al.*, 1988) zumindest in Industrieländern keine signifikante Bedeutung mehr als Lebensmittelkontaminanten.

1.2.1 Biosynthese: Die Biosynthese der Mykotoxine erfolgt durch verschiedene Stoffwechselwege, wobei Essigsäure in Form von Acetyl-CoA in den meisten Fällen eine signifikante Rolle spielt. Über den Polyketidweg werden durch Kondensation von Acetyl-CoA mit Malonyl-CoA (ähnlich der Fettsäuresynthese) u.a. Aflatoxin, Patulin und Ochratoxin gebildet. Die Trichothecene werden hingegen über Essigsäure und Mevalonsäure synthetisiert. Einige Toxine enthalten auch Aminosäuren, wie zum Beispiel Cyclopiazonsäure die Aminosäure Tryptophan, oder Ochratoxin die Aminosäure Phenylalanin.

1.2.2 Giftwirkung: Einige Mykotoxine zählen zu den giftigsten bekannten Verbindungen. Sie sind üblicherweise stabile, niedermolekulare Stoffe, gegen die der Organismus im Allgemeinen keine Antikörper bildet, da er sie aufgrund deren meist geringen Molekulargewichts nicht als Antigen identifizieren kann. Sie werden außerdem meist durch den Körper akkumuliert, wodurch sie sich bei fast jedem Menschen in Blut oder Fettgewebe nachweisen lassen (Aksenov *et al.*, 2007) und dort, je nach chronischer oder akuter Aufnahmemenge, zu mehr oder minder schweren Erkrankungen führen können. Die Aufnahme der Mykotoxine erfolgt hierbei vor allem mit der Nahrung, aber auch durch die Inhalation kontaminierter Stäube, oder „Carry over“ über tierische Erzeugnisse. Mykotoxine wirken auf unterschiedliche Weise toxisch auf den Organismus. Im Fall von

Aflatoxin wird das Toxinmolekül im menschlichen und tierischen Organismus durch oxidative Enzyme epoxidiert. Trichothecene hingegen beinhalten schon eine Epoxidgruppe in der Grundstruktur. Diese Epoxide führen im weiteren Verlauf zu DNA-Addukten und so zu Mutationen, oder sie binden an Proteine, wobei sich weitere giftige Stoffwechselprodukte bilden. Die toxische Wirkung beruht bei subletalen Mengen außerdem auf einer Hemmung des Immunsystems durch Inhibierung der Lymphozytenaktivität (Sharma, 1993), sowie einer Behinderung der Bildung von Immunglobulinen und Makrophagen (Corrier, 1991). Dadurch kann das Entstehen von Infektionskrankheiten gefördert werden (Kolb, 1984). Ferner greifen viele Toxine Leberzellen an, verursachen Hautirritationen, sind nephrotoxisch oder sie sind Nervengifte (Reiß, 1970).

Die Kontamination von Lebens- und Futtermitteln mit Mykotoxinen war und ist ein weltweites Problem. Nach Einschätzung der UN Food and Agriculture Organization (FAO), sind bis zu 25 % der Weltproduktion an Nahrungsmitteln mit Mykotoxinen verunreinigt. Etwa 20 % allein der Zerealienenernte der EU enthalten messbare Kontaminationen an Schimmelpilzen oder deren toxische Stoffwechselprodukte. Folgende geschichtliche Schlaglichter repräsentieren die Signifikanz der durch Schimmelpilztoxine verursachten Epidemien, die in ihren Auswirkungen den durch herkömmliche Erreger ausgelösten Krankheiten in nichts nachstehen:

- 430 v. C.: Rätselhafte Massenerkrankung der Spartaner während des Krieges gegen Athen, begründet durch Ergotaminvergiftung.
- 857 n. C.: Berichte über eine europäische Ergotamin-Epidemie (Bove, 1970).
- 1910: *Aspergillus flavus* ist toxisch und kommt häufig auf Paranüssen vor (Hugo Kühl).
- 1928: Balkan-Nephropathie, verursacht durch Ochratoxin A von *A. ochraceus*; Larsen beschreibt eine „Danish Porcine Nephropathy“ genannte Nierenerkrankung beim Schwein in Zusammenhang mit der Verfütterung von verschimmeltem Roggen (Larsen).

- 1930: Pferdesterben in der Ukraine aufgrund Stachybotryotoxin.
- 1942: Alimentäre Toxische Aleukie verursacht durch das Trichothecen T-2 von *F. sporotrichioides* in Winterweizen, tausende Menschen sterben.
- 1943: Patulin wird erstmals isoliert aus *Penicillium patulum*.
- 1948: Freeman und Morrison isolieren T-2 Toxin aus *Trichothecium roseum* (Freeman *et al.*).
- 1962: „Turkey X“-disease, Truthahnsterben in Großbritannien nach Verfütterung von mit Aflatoxin belasteten Erdnussmehl (Nesbitt *et al.*).
- 1965: Asoa *et al.* isolieren Aflatoxin B1.
- 1975: Morooka *et al.* isolieren und charakterisieren Deoxynivalenol.
- 1975: Yellow Rain Trichothecen Biowaffeneinsatz in Vietnam (Mirocha *et al.*, 1983).
- 1988: Identifikation von Fumonisin B1 als Ursache der Leukoencephalomalazie der Equiden (Gelderblom *et al.*).

1.2.3 Einflussfaktoren und Regulation: Welche Toxinmenge jeweils synthetisiert wird, kann von unterschiedlichen extrinsischen Faktoren abhängen, die auf den physiologischen Status des filamentösen Pilzes einwirken. Zu diesen gehören zum Beispiel pH-Wert (O'Callaghan *et al.*, 2006), Temperatur und relative Luftfeuchte (Belli *et al.*, 2006; Ramirez, 2006). Auch die Substratzusammensetzung des Nährmediums hat einen Einfluss (Skrinjar und Dimic, 1992). Wie breit das Wachstumsspektrum von einigen filamentösen Pilzen z. B. im Vergleich zu pathogenen Bakterien ist, zeigen die folgenden zwei Abbildungen im Fall der zum Leben im jeweiligen Habitat vorhandenen Wasseraktivität (Abb. 4) bzw. der Temperatur (Abb. 5):

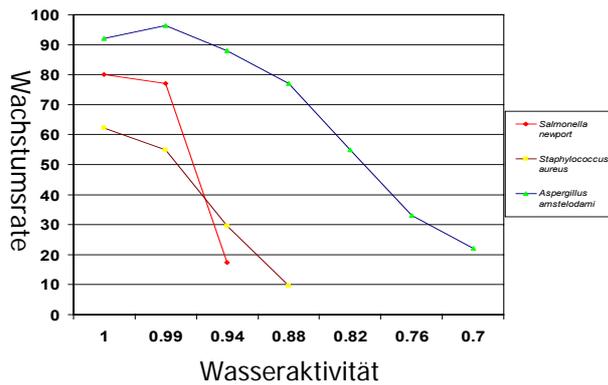


Abb. 4: Wachstumstoleranz verschiedener MO bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten. Beispiele für die Wachstumstoleranz von *A. amstelodami* im Vergleich zu zwei repräsentativen Bakterienarten.

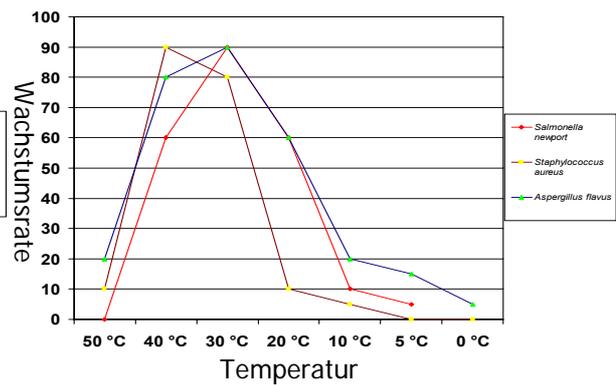


Abb. 5: Wachstumstoleranz verschiedener MO bei unterschiedlichen Temperaturen. Beispiele für die Wachstumstoleranz von *A. flavus* im Vergleich zu zwei repräsentativen Bakterienarten.

Deutlich erkennbar ist der größere Toleranzbereich der Schimmelpilzspezies *Aspergillus* bezüglich Wasseraktivität und Temperatur im Vergleich zu den Bakterienbeispielen. Zusätzlich spielt der momentane Ernährungsstatus der Zelle eine Rolle (Pardo *et al.*, 2006), bzw. die Wachstumsphase (Belli *et al.*, 2006). Die Toxinbiosynthese wird dabei auf transkriptionaler Ebene reguliert. Üblicherweise spricht eine Expression der meist geclustert vorkommenden Mykotoxingene für eine aktive Mykotoxinbildung (Geisen, 2004). Die Gencluster der wichtigsten Mykotoxine sind bekannt und in Abbildung 6 A-D dargestellt.

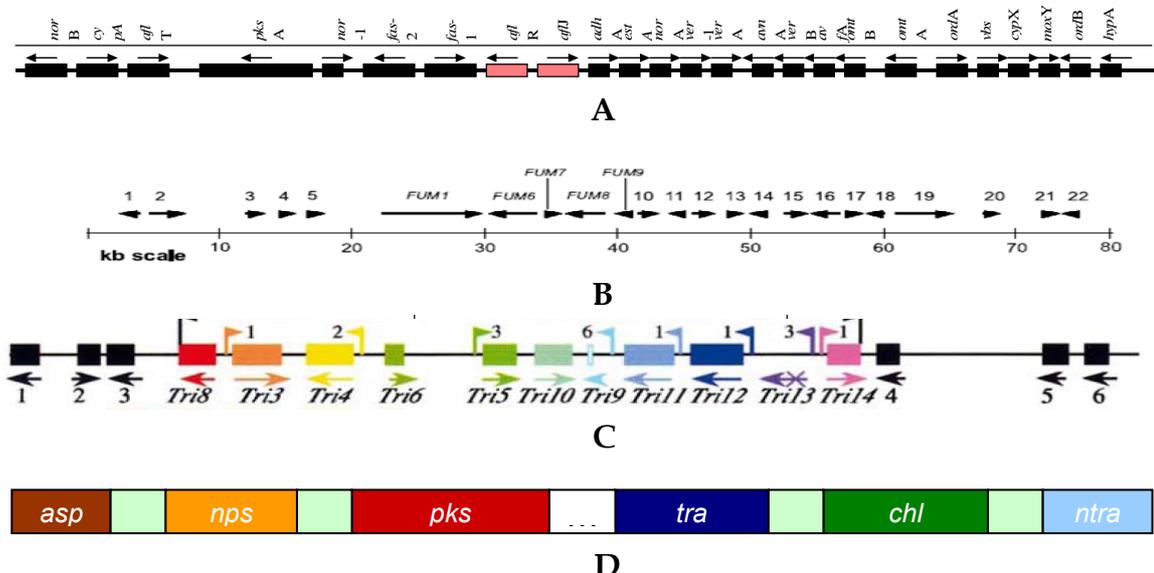


Abb. 6: Die Gencluster der wichtigsten Mykotoxine. A, Aflatoxincluster; B, Fumonisincluster; C, Ochratoxincluster; D, Trichothecenencluster.

6A zeigt den Aflatoxincluster von *Aspergillus* (Yu *et al.*, 2004), 6B den Fumonisingencluster von *F. verticillioides* (Proctor *et al.*, 2003) und 6C den

Trichothecen Gencluster von *Fusarium* (Desjardins *et al.*, 1993). Die Gene des Clusters der Ochratoxinbildung in *Penicillium nordicum*, 6D, konnten im Vorlauf dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert werden (Karolewicz und Geisen 2005; Geisen, Schmidt-Heydt und Karolewicz, 2006). Durch die geclusterte Anordnung können zusammengehörige Gene eventuell besser koreguliert werden. Eine solche Regulationsfunktion ist in jüngster Zeit für das Gen *laeA* beschrieben worden. Dieses Gen kodiert für eine Methyltransferase, die über eine Methylierung der Histonproteinkomplexe die Transkription von Genen innerhalb des Clusters steuert (Bok *et al.*, 2006). Abbildung 7 verdeutlicht den typischen Aufbau eines Mykotoxingenclusters mit hierarchisch vorgeschaltetem regulatorischen Gen, im Falle des Aflatoxin-Genclusters das *aflR/aflJ* -Gen (Price *et al.*, 2006), bzw. die Gene *tri6* und *tri10* im Falle des Trichothecengenclusters (Yu und Keller, 2005).



Abb. 7: **Genereller Aufbau eines Mykotoxin-Genclusters.** Dargestellt sind die geclustert angeordneten Gene mit vorgeschaltetem Kontrollgen, welches wiederum durch spezifische Transkriptionsfaktoren in seiner Aktivität beeinflusst wird.

Über diesen Kontrollgenen können noch globale Regulatorgene oder Transkriptionsfaktoren stehen, wie das *pacC/pal* System in *Aspergillus nidulans* (Ehrlich *et al.*, 2002; Ehrlich und Cotty, 2002; Yu und Keller, 2005), das die Expression verschiedener Gene in Abhängigkeit von einem veränderten pH-Wert des Substrats kontrolliert, oder die Gene *creA* (Tudzynski *et al.*, 2000) bzw. *areA* (Mihlan *et al.*, 2003), welche in Abhängigkeit vom Ernährungsstatus der Zelle andere Gene downstream regulieren. Ein Verständnis der Regulation der Mykotoxinbildung auf genetischer Ebene, beeinflusst durch die verschiedenen extrinsischen und intrinsischen Parameter, sowie synergistischer Effekte aus Kombinationen dieser Parameter, kann daher zu Maßnahmen führen, die es erlauben, durch geeignete Steuerung der Bedingungen während der

Verarbeitung, des Transports, oder der Lagerung die Mykotoxinbildung zu vermindern.

1.2.4 Analytik: Der Ursprung der Mykotoxinanalytik lag in der Suche nach der Ursache einzelner, endemisch auftretender menschlicher oder tierischer Erkrankungen, für deren Vorkommen man keine Auslöser wie Mikroorganismen, Pflanzengifte, Schwermetalle oder Pestizidrückstände finden konnte. Schritt für Schritt wurde klar, dass mit Schimmelpilzen kontaminierte Futtermittel verantwortlich für eine Reihe von Erkrankungen bei Nutztieren sind, wie z.B. das Östrogensyndrom bei Schweinen, Futterverweigerung oder Erkrankungen bei Truthähnen, die „Turkey X Disease“ (Nesbitt *et al.*, 1962). Dass diese Verbindungen ebenso in menschlichen Nahrungsmitteln vorhanden sein und Krankheiten verursachen könnten, zeigte sich erst, nachdem die Analysemethoden genauer wurden und man in der Lage war, eine Vielzahl von Lebensmitteln und Lebensmittelbestandteilen zu untersuchen. Seither gab und gibt es viele Fortschritte in der molekularbiologischen Diagnostik und Methodik, wie die erste DNA Isolierung 1869 von Friedrich Miescher; E. Southern gelingt es 1975 erstmals, Nukleinsäure spezifisch nachzuweisen. Den Durchbruch ins Genomzeitalter des 20. Jahrhunderts brachte dann die maschinelle DNA-Sequenzierung (Sanger, 1977). Jetzt wurden auch Untersuchungen im großen Maßstab möglich. Das erste vollständig sequenzierte Genom in der Größenordnung von 5.375 kb war das des Bakteriophagen phi-174 (Sanger *et al.*, 1977). Die Anwendung dieser Techniken machte es möglich, Gene zu identifizieren und die Mengen an gebildeter RNA in Korrelation zu deren Aktivität zu setzen. Dies wirkte sich auch auf die Erforschung von Genregulationsmechanismen in Mikromyzen aus, ebenso wie die fortschreitende Entwicklung von Identifikations- und Trennverfahren für die unterschiedlichen Sekundärmetabolite, wie die Dünnschichtchromatographie 1901, von dem russischen Botaniker M. Tswett erstmals beschrieben, sowie die Weiterentwicklung zur hochsensitiven Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC, 1970er Jahre). Außerdem wurden viele Identifikations- und

Analyseschritte wesentlich erleichtert durch die Entwicklung von Polymerasekettenreaktion (1983, Mullis), Magnetresonanzspektroskopie und Gaschromatographie. Mykotoxine können mit diesen analytischen Methoden in Lebensmittelproben bereits mit großer Genauigkeit nachgewiesen werden. Zudem führten diese und andere Entwicklungsfortschritte in der Toxinanalytik und deren Anwendung in der mykologischen Forschung zu grundlegenden Erkenntnissen. So zum Beispiel, dass vom Vorhandensein pathogener Pilze nicht zwangsläufig auf eine Mykotoxinkontamination geschlossen werden kann. Ein Fusarienbefall in einem Getreide- oder Maisfeld äußert sich beispielsweise im Normalfall durch verschiedene makroskopische und mikroskopische Auffälligkeiten und Veränderungen an der Pflanze, bzw. der Frucht. Dazu gehören die Taub- oder Weißährigkeit, hell- oder dunkelrot-violett gefärbte Körner, sowie im Extremfall deutlich sichtbares Pilzmyzel auf Stängel und Kolben. Aber auch so eindeutig sichtbare Hinweise müssen nicht zwangsläufig eine Mykotoxinbelastung bedeuten. So waren die im Rahmen einer Studie untersuchten Proben von Wintergerste aus einer Ernte von 1998 frei von den Fusarientoxinen Zearalenon und Deoxynivalenol, obwohl mikrobiologisch ein hoher Besatz mit Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* nachzuweisen war (Lufa der Landwirtschaftskammer Weser-Ems, 1998). Ein weiteres Beispiel ist, dass selbst unter toxinbildenden Vertretern wie z. B. *Aspergillus flavus* nur ca. 40 % tatsächlich das Toxin Aflatoxin synthetisieren. Die toxinbildenden Stämme einer Art sind bisher weder biochemisch noch morphologisch von den harmlosen zu unterscheiden. Zudem bilden Schimmelpilze, wie im vorherigen Abschnitt erläutert wurde, nur unter bestimmten Bedingungen Toxine (Ueno *et al.*, 1970). Die Milieubedingungen, die bei einem potentiell toxigenen Stamm die Toxinbildung auslösen oder hemmen, können sehr unterschiedlich und variabel sein und sind für jedes Toxin und jede Pilzart anders. Daraus ergibt sich, dass Bedingungen, die eine Induktion der Mykotoxinbiosynthesegene erlauben und die Rückschlüsse auf die Regulation der Gene zulassen, nicht durch analytische Methoden ermittelt werden können die eine Endpunktkontrolle darstellen, sondern nur durch molekularbiologische Methoden auf Transkriptionsebene. Mit

den „klassischen“ molekularbiologischen Methoden lassen sich dabei Veränderungen in der Expression einzelner Gene nachweisen (Northern Blot Hybridisierung/Real Time PCR) und einzelne Gene identifizieren (Differential Display PCR). Mayer *et al.* (2003) beschrieben ein RT Real Time PCR System, welches auf dem *nor-1* Gen der Aflatoxinbiosynthese basiert. Mittels solcher Reaktionen kann die Expression einzelner Gene verfolgt werden. Vergleichbare Systeme existieren für andere Spezies. Zum Beispiel für *P. nordicum*, einem Ochratoxinbildner (Geisen *et al.*, 2004). Hier beruht die Messung auf dem *otapksPN*-Gen das für eine Polyketidsynthase kodiert. Eine Korrelation der Expression der Mykotoxinbiosynthesegene mit einer aktiven Mykotoxinbiosynthese ist jedoch nicht im Fall aller Gene gegeben. Vielmehr sind nur einzelne „Schlüssel“-Gene des jeweiligen Clusters direkt mit der momentanen Mykotoxinbildung gekoppelt. Bezüglich der Aflatoxinbiosynthese sind dies die Gene *nor-1*, *omtA* und *omtB* (Scherer *et al.*, 2005). Die übrigen Gene zeigen eine wesentlich weniger stringente Assoziation mit der phänotypischen Toxinbiosynthese. Ein umfassendes, detailliertes Bild der Veränderungen im Genexpressionsmuster von sich beispielsweise im Wachstum unter unterschiedlichen Bedingungen befindlichen Organismen, erlauben diese Methoden nicht und das Wissen um die Funktion einzelner Gene reicht nicht aus, um die globalen regulatorischen Zusammenhänge zu erkennen. Möchte man also komplexere gengesteuerte Vorgänge analysieren, sind standardisierte Parallelmesstechniken unerlässlich. Hierfür bietet sich die Verwendung von DNA basierten Mikroarrays an, mittels denen man die Genexpression quantitativ auf genomischer Ebene erfassen kann (Brown und Botstein, 1999). Bei Verwendung von DNA-Mikroarrays beruht die Expressionsanalyse nicht nur auf einem Zielgen, vielmehr kann die Expression eines ganzen Genclusters auf einmal analysiert werden, wodurch auftretende Unterschiede zwischen den Expressionsstärken der jeweiligen Gene ausgeglichen werden. Das Prinzip eines Mikroarray-Experiments besteht darin, alle auf dem DNA-Array befindlichen, immobilisierten Gensonden gleichzeitig gegen ein Nukleinsäuretarget zu hybridisieren und beruht damit funktionell auf dem von E. Southern

entwickelten Southern-Blot. Bei diesem werden einzelne markierte DNA-Stränge mit komplementären DNA-Strängen hybridisiert, die in Form von Gesamt-DNA auf einer soliden Matrix fixiert sind. Bei einem Mikroarray werden vorhandene DNA-Proben mit Hilfe von speziellen Spottern, z.B. mittels Metallnadeln, so genannten split-pins, welche die DNA-Lösung über Kapillarkräfte aufnehmen und bei Kontakt mit der Glasoberfläche des Chips wieder abgeben, auf vorbehandelte Glasobjektträger aufgebracht und dort immobilisiert. Hybridisiert wird fluoreszenzmarkierte *c*DNA, die durch reverse Transkription aus der zu untersuchenden *m*RNA Probe gewonnen wurde. Das parallele Hybridisieren einer Nukleinsäureprobe gegen eine Vielzahl von komplementären Genproben auf einem DNA-Array, führt letztlich zu einem probenspezifisch charakteristischen Genexpressionsprofil (Schena *et al.*, 1995). Besonders interessant ist auch die Möglichkeit die Interaktion verschiedener Gene zu untersuchen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit: Ein solcher DNA-Mikroarray sollte in dieser Arbeit zur Analyse von Mykotoxinbiosynthesegenen zum ersten Mal entwickelt und eingesetzt werden. Dabei sollte an den aktuellen Forschungsstand angeknüpft werden (Magan *et al.*, 1984; Marin *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1998; Hallsworth und Magan, 1999; Marin *et al.*, 1999; Hope und Magan, 2003; Arroyo *et al.*, 2005, Cairns-Fuller *et al.*, 2005; Hope *et al.*, 2005; Magan *et al.*, 2006). In diesen Publikationen werden die Auswirkungen einzelner Einflussfaktoren auf Wachstum und Toxinbiosynthese in Schimmelpilzen auf phänotypischer Ebene beschrieben. Die in dieser Arbeit mit dem entwickelten Mikroarray durchgeführten Untersuchungen sollten noch weiter gehen und eine Korrelation zwischen Wachstum, Expression der Mykotoxingene im Kontext zum jeweiligen Biosynthesecluster und Toxinbiosynthese analysieren. Die aus den Messungen resultierenden Daten sollten zur Erstellung von Modellsystemen verwendet werden. Mittels solcher Systeme wäre es möglich die Mykotoxinbiosynthese unter bestimmten Voraussetzungen vorherzusagen und auf Grundlage dieser Erkenntnisse Vermeidungsstrategien zu entwickeln, die sich auf

Produktionsprozesse wie Ernte und Lagerung von Lebensmitteln anwenden lassen. Als Versuchsstämme für die im weiteren Verlauf durchgeführten Experimente wurden zwei Vertreter der Gattung *Fusarium*, *F. culmorum* und *F. graminearum*, ausgewählt. Es handelt sich hierbei um eine Pilzgattung, die üblicherweise schon auf dem Feld die Wirtspflanze infiziert (Davari *et al.*, 2006) und in der Lage ist, das Typ-B-Trichothecen Deoxynivalenol zu synthetisieren (Llorens *et al.*, 2006). Als typische Lagerpilze wurden die Ochratoxin-bildenden Penicillien, *P. nordicum* und *P. verrucosum* verwendet (Larsen *et al.*, 2001; Castella *et al.*, 2002; Torelli *et al.*, 2006).

1.4. Vorarbeiten: Voraussetzung für die Entwicklung dieses Mikroarrays, der die Gene der Biosynthesewege aller wichtigen Mykotoxine enthalten sollte, war die Identifikation der Gene des Ochratoxinbiosyntheseclusters in *Penicillium*. Während die Gene der übrigen Mykotoxincluster bereits in Datenbanken frei verfügbar sind, waren diese Gene bisher nicht identifiziert worden. Ochratoxin A ist ein Mykotoxin, das wie bereits einleitend beschrieben, nephrotoxisch und hepatotoxisch wirkt. OTA-bildende Penicillien kommen vor allem auf fermentierten Fleisch, Obst, Gemüse und Getreide vor. Bekannt sind 2 stabile Formen von Ochratoxin. Zum einen Ochratoxin B, welches am 5`C-Atom des Methylisocumarinrestes ein Wasserstoffatom trägt, und zum anderen das um den Faktor 100 toxischere Ochratoxin A, bei dem das Wasserstoffatom durch ein Chloratom substituiert ist. Die Gene des Ochratoxinclusters wurden auf zwei verschiedenen Wegen identifiziert. Zum einen wurde eine Lambda-Genbank erstellt. Die aus dem nachfolgenden Screening mit spezifischen Gensonden resultierenden Klone wurden dann auf Positive untersucht. Dies gelang (Karolewicz und Geisen, 2005) und es konnte ein 10 kb großer Abschnitt gefunden werden (Genbank Accession: [AY557343](#)), auf dem eine Polyketidsynthase (*otapksPN*) und eine nichtribosomale Peptidsynthetase (*npsPN*) liegen. Außerdem wurde eine nicht in die OTA-Synthese involvierte, alkalische Serinprotease auf dem Sequenzabschnitt identifiziert der den Cluster nach 5' abgrenzt (*aspPN*) und ein durch Stickstoff reguliertes Gen, *nreg*, außerhalb des

Genclusters. Dieser, in Abbildung 8 gezeigte, Abschnitt wurde sequenziert, die entsprechenden Gene konnten mittels Datenbankabgleich und Geninaktivierung funktionell zugeordnet werden.

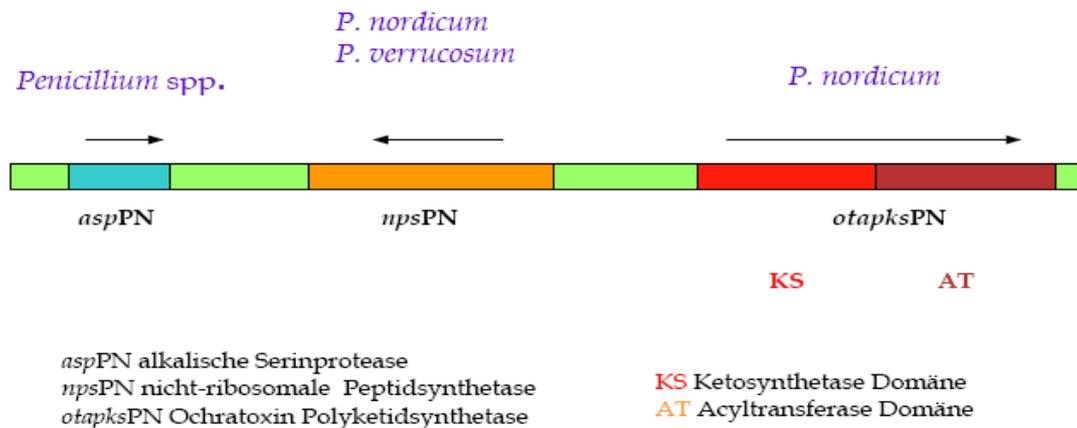


Abb. 8: 10kb Abschnitt des Ochratoxin Genclusters. Abgegrenzt wird der Cluster 5' durch eine alkalische Serinprotease, *aspPN*. Darauf folgen die Gene *npsPN*, welches für eine nichtribosomale Peptidsynthetase kodiert, sowie *otapksPN*, welches für eine Polyketidsynthetase kodiert.

Betrachtet man das in Abbildung 9 dargestellte Ochratoxin A Molekül genauer, so fällt auf, dass weitere Gene vonnöten sind, um ein vollständiges OTA-Gerüst zu synthetisieren.

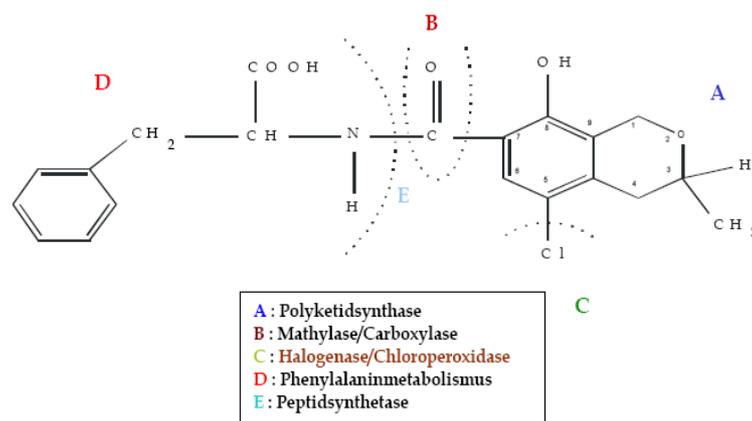


Abb. 9: Molekülstruktur des Ochratoxin A. A bis E kennzeichnen die jeweils für den Syntheseschritt erforderlichen Enzyme.

Bekannt waren nun die Polyketidsynthase (A) und die Peptidsynthetase (E). Da auf dem herkömmlichen Weg keine weitere Gene gefunden werden konnten, wurde auf anderem Wege die Identifizierung weiterer Gene verfolgt. Es wurde

eine Differential Display PCR durchgeführt (Geisen und Färber, 2004). Hierbei wurden die in der nachfolgenden Abbildung (10) aufgeführten Sequenzfragmente von Genen identifiziert, die nur unter Ochratoxin A Bildungsbedingungen transkribiert werden.

Table 1. Homology of sequenced DDRT-PCR fragments at the protein level

DDRT-PCR fragment no:	Direction of DNA sequence		Putative function:	Class:*	DDRT-PCR fragment no:	Direction of DNA sequence		Putative function:	Class:*
	forward:	reverse complement:				forward:	reverse complement:		
T-01/A	no sequence homology detected	non-ribosomal peptide synthetase [<i>Hypocrea virens</i>]	- secondary metabolism - OTA biosynthesis	A	T-20/B	putative DNA-binding protein [<i>Dendrobium grex</i>]	no sequence homology detected	- general regulatory protein - OTA specific regulatory protein	A / C
T-02/B	no sequence homology detected	phenylalanyl-tRNA synthetase [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	- primary metabolism - precursor for OTA biosynthesis	B	T-21/A	no sequence homology detected	no sequence homology detected
T-03/B	ammonium transporter AmtC [<i>Dictyostelium discoideum</i>]	polyketide synthase [<i>Cordyceps brongniartii</i>]	- transport	C	T-22/B	no sequence homology detected	acyl-CoA synthetase [<i>Plasmodium falciparum</i>]	- primary metabolism - precursor for OTA biosynthesis	B
T-04/B	no sequence homology detected	putative non-ribosomal peptide synthetase [<i>Actinomyces</i> sp.]	- secondary metabolism - OTA biosynthesis	A	T-23/A	no sequence homology detected	no sequence homology detected
T-05/B	no sequence homology detected	K ⁺ channel [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	- transport	C	T-24/A	no sequence homology detected	ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Vibrio cholerae</i>]	- transport of secondary metabolites	A / C
T-06/B	acetyl-CoA synthetase [<i>Enterococcus nidulans</i>]	no sequence homology detected	- primary metabolism - precursor for OTA biosynthesis	B	T-25/B	no sequence homology detected	succinyl-CoA synthetase [<i>Plasmodium falciparum</i>]	- primary metabolism	C
T-07/A	putative DNA-binding protein [<i>Dendrobium grex</i>]	no sequence homology detected	- general regulatory protein - OTA specific regulatory protein	A / C	T-26/A	no sequence homology detected	polyketide synthase [<i>Mycobacterium tuberculosis</i>]	- secondary metabolism - OTA biosynthesis	A
T-08a/B	tryptophan halogenase [<i>Caulobacter crescentus</i>]	no sequence homology detected	- secondary metabolism - OTA biosynthesis	A	T-27/B	no sequence homology detected	ammonium transporter [<i>Bacillus halodurans</i>]	- transport	C
T-08b/B	methyltransferase [<i>Bacillus anthracis</i>]	no sequence homology detected	- primary metabolism - OTA biosynthesis	A / C					
T-08c/B	no sequence homology detected	translation elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha) [<i>Aspergillus oryzae</i>]	- general gene expression	C					
T-09a/A	non-ribosomal peptide synthetase [<i>Pseudomonas syringae</i>]	no sequence homology detected	- secondary metabolism - OTA biosynthesis	A					
T09c/A	acetyl-CoA carboxylase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	no sequence homology detected	- primary metabolism	C					
T-10/A	no sequence homology detected	decarboxylase [<i>Streptomyces</i> sp.]	- primary metabolism	C					
T-11/A	no sequence homology detected	no sequence homology detected					
T-12/A	no sequence homology detected	ammonia monooxygenase [uncultured soil bacterium]	- primary metabolism	C					
T-13/B	no sequence homology detected	ABC-type transmembrane transport protein [<i>Campylobacter jejuni</i>]	- transport of secondary metabolites	A / C					
T-14/B	NADH dehydrogenase, subunit F [<i>Chromotopsis heterophylla</i>]	no sequence homology detected	- primary metabolism	C					
T-15/B	no sequence homology detected	no sequence homology detected					
T-16/B	no sequence homology detected	no sequence homology detected					
T-17/A	peptide ABC transporter [<i>Vibrio cholerae</i>]	no sequence homology detected	- transport	C					
T-18/A	no sequence homology detected	no sequence homology detected					
T-19/A	polyketide synthase, type I [<i>Streptomyces avermitilis</i>]	no sequence homology detected	- secondary metabolism - OTA biosynthesis	A					

Abb. 10: Sequenzfragmente der DDRT-PCR. Die dargestellten Gene wurden nur unter Toxinbildungsbedingungen exprimiert. Das rote Rechteck kennzeichnet ein Fragment mit Homologie zu einer Halogenase.

Die funktionelle Zuordnung erfolgte über den Vergleich mit sequenzhomologen Genen bekannter Funktion (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Unter anderem wurde mit dieser Methode ein DDRT-Fragment identifiziert, welches eine hohe Homologie mit einer Halogenase aufzeigte (Abbildung 10, rotes Rechteck). Eine Halogenase, genauer eine Chloroperoxidase, wird während der OTA-Biosynthese benötigt, um das Wasserstoffatom am C5' des Methyl-

isocumarinrestes mit einem Chloratom zu substituieren. Hierdurch wird das Ochratoxin B-Molekül zu Ochratoxin A halogeniert. Um dieses Gen in *P. nordicum* zu identifizieren, wurde der kurze DDRT-Sequenzabschnitt als Sonde verwendet und mit dieser eine Southern-Blot-Hybridisierung mit restriktiv geschnittener genomischer DNA von *P. nordicum* durchgeführt. Das zur Sonde homologe DNA-Fragment in *P. nordicum* wurde in einen Vektor kloniert und in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Der positive Transformant wurde mittels PCR identifiziert und das Insert sequenziert. Aus der erhaltenen Sequenz wurden wiederum jeweils in 5'- und 3'-Richtung Primer generiert, um so das vollständige Gen zu erhalten. Die Sequenz dieses für eine Halogenase kodierenden Gens umfasst 951 bp (Genbank Accession: [DQ100374](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ100374)). Die Funktionalität wurde mittels Geninaktivierung validiert, d.h. die knock-out-Transformante bildet ausschließlich Ochratoxin B. Außerdem konnte auf diese Weise upstream ein Ochratoxin A Transporter identifiziert werden (*otatra*PN), sowie downstream ein nicht in die OTA-Synthese involvierter Nitrattransporter (*ntra*PN). Der aktuelle Ochratoxin A Gencluster sieht wie folgt aus (Abb. 11) (Geisen, Schmidt-Heydt und Karolewicz, 2006):

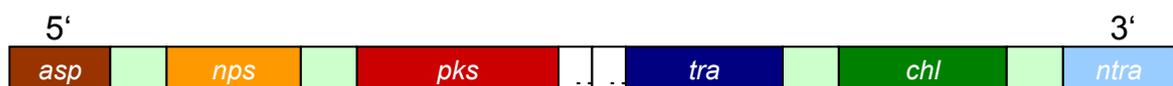


Abb. 11: Gencluster der Ochratoxinbiosynthese in *P. nordicum*. Der Cluster besteht aus zwei Blöcken von 10 kb, sowie 3,5 kb. Die Gene *otanps*PN, *otapks*PN und *otachl*PN sind nachweislich in die Biosynthese des Ochratoxin A involviert.

Mit den nun vollständig verfügbaren Genen der wichtigsten Mykotoxinbiosynthesecluster wurde im weiteren Verlauf der DNA-Chip entwickelt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Primerpaare

Tab. 1: Verwendete Primerpaare

Primername	Tm / °C	Länge/bp	Sequenz 5' -> 3'	Funktion
Subarray OTA-Cluster				
T09cA_for	53	27	taa ccc tca cta aat gct gta tgt atg	Primer spezifisch für DDRT-Fragmente
T09cA_rev	65	21	ggg cga att ttt agc ggc cgc	
T26A_for	53	27	taa ccc tca cta aat gct gta tgt atg	
T26A_rev	56	20	acg gaa gag tgg cgg aag ac	
T08aB_for	58	25	gct ggt ggc aag aag aag aga aag t	
To8aB_rev	54	21	tgc gac agc cat aga aag gac	
T09bB_for	51	17	agc gcc tga cga gtg gt	
T09bB_rev	57	22	ata cgc ctt tac aac ggg atg c	
otapksPV_for	60	22	ccg cag gaa gga tca cga aga a	Polyketidsynthase PV
otapksPV_rev	61	24	tga ttt gca gca ggg gaa gta gga c	
otatransPN_for	63	20	tgg tcc ccg ggg cat cct ta	OTA-transporter
otatransPN_rev	61	24	gct gaa tcc cgc tct gaa cac aaa	
npsPN_for	65	23	cag agg gcg gct tcg tgt tgt cc	n.ribos.Peptidsynth.
npsPN_rev	67	24	tgt cca tgt gcc ggg ctg ata cga	
nitrattransPN_for	57	21	tca ggg aat cga tgc gta tgc	Nitrattransporter
nitrattransPN_rev	65	22	cga ggc gga gtt ggg ggt gaa g	
aspPN_for	65	23	tgg cgt cga cac cgg gat tga ta	alkal.serin.Protease
aspPN_rev	62	24	tcg cac taa ggg aga ggg gga act	
chlPN_for	63	24	ctt tcg gca tgg cag tgg ctt tac	Chloroperoxidase
chlPN_rev	63	23	gct tgg cag gtg gac gag gaa tc	
otapksPN_for	65	25	tcc tcg ctg gtt gct gtt cat ctc g	Polyketidsynthase PN
otapksPN_rev	69	25	ata aag cca acc gcg cca gca cca g	
Circadiane Rhythmik / Screeningprimer				
wc1_NC_for	67	20	cgc cgt cag gtg gag gag cg	White-Collar1 NC
wc1_NC_rev	67	24	cga ctt ctc gat gaa ggg gcg acg	
wc2_NC_for	69	21	gcc gcc gcc gtc tac acc tgc	White-Collar 2 NC
wc2_NC_rev	66	25	ctg tat ata ggc caa tgc gcc gag c	
frq_clock_NC_for	71	22	gcg cga cac gcc cga tgg cct g	Frequency <i>N. crassa</i>
frq_clock_NC_rev	69	23	cgg tga cgg ctg cca atg ggc tg	
wc1_NC_for2	56	22	gcc ctg att ttc ttt ctc ttt c	White-Collar1 NC2
wc1_NC_rev2	67	23	gcg aat agt gtc gag tcc ggc cg	

wc2_NC_for2	67	22	gcc agg gac agt cga cag tgg c	White-Collar 2 NC2
wc2_NC_rev2	67	24	gcc ctg cgc gcc tac ctc ata atc	
frq_NC_for2	64	22	gcg cga gat act agc agc aga g	Frequency <i>N. crassa</i> 2
frq_NC_rev2	65	20	cgg gcg tgt cgc gca gat ag	
Vektorprimer pGEM-Teasy System				
pGEM-Tfor	64	21	ggg taa cgc cag ggt ttt ccc	Vektorprimer
pGEM-Trev	60	22	cag cta tga cca tga tta cgc c	

Primername	Tm / °C	Länge	Sequenz 5' -> 3'	Funktion
Primer für Real Time PCR Expressionsmessung <i>Penicillium</i>				
chlPN2-SYBR_for	61	24	atg gtt tcg gat agg ttg aga gtc	Chloroperoxidase
chlPN2-SYBR_rev	60	18	gag cgg cgg gtt tcc aga	
otatransPN-SYBR_for	58	18	ttc tgg aac tgg cgc tgc	OTA Transporter
otatransPN-SYBR_rev	59	21	tga ggt aca cta gcc aac gca	
nitTraPN-SYBR_for	59	20	tca agt cca tct tca ccc cc	Nitrat Transporter
nitTraPN-SYBR_rev	57	20	gaa ccg aaa atg cca tca cc	
chlPN-SYBR_for	60	18	cac tgc cga tac cag ccc	Chloroperoxidase
chlPN-SYBR_rev	60	22	cca tcc tgg tac att ggg ttc t	
aspPN-SYBR_for	61	19	tgg gtg gcg ccg ttt ctc a	alk.Serin Protease
aspPN-SYBR_rev	59	20	att ggc agc ggc gtc att ca	
Primer für Real Time PCR Expressionsmessung <i>Fusarium</i>				
FGtri5-taq_for	60	22	cgc caa gaa gtt ctg caa gtt	tri5 <i>F. graminearum</i>
FGtri5-taq_rev	60	18	ccc act ccg agg gtg caa	
FCTri5-taq_for	61	21	ccc agg atc cca tga cta tcc	tri5 <i>F. culmorum</i>
FCTri5-taq_rev	59	20	caa aga agc ccc gac aca gt	
FStri5-taq_for	54	16	agc agg ctg cca acg t	tri5 <i>F. sporotrichioides</i>
FStri5-taq_rev	56	18	gcg caa ctg gtg gat aag	
FGtri5TaqSonde	58	19	cgt ttc tcc ttc gga gtg g	Taqman Sonde 5'Fam 3'Tamra
FCTri5TaqSonde	64	23	ctt cga cgc atg aat ggc ttg gg	
FStri5TaqSonde	58	19	cgr ttc tcc ttc gga gtg g	
FGtri12-taq_for	59	21	gcg gtt gcg gct cta ctt att	tri12 <i>F. graminearum</i>
FGtri12-taq_rev	59	21	tcg tcc ctc tta cga gcc ttt	
FStri12-taq_for	59	21	gat gtc agc gac tgc ctc att	tri12 <i>F. sporotrichioides</i>
FStri12-taq_rev	59	20	cgg atg tgc ctg aca aga tg	
FGtri101-taq_for	57	20	ggc gat gtt tga cga gaa ca	tri101 <i>F. graminearum</i>
FGtri101-taq_rev	61	20	ggg cca gta cca ggt cca at	
FStri101-taq_for	62	22	gtg gga tgc tgg gag tat gac t	tri101 <i>F. sporotrichioides</i>
FStri101-taq_rev	60	22	ggt tca aag cga ggt ctt ctc a	
FSFGtri5-390-Std_for	62	23	caa gga att cga cga tga gcg tg	tri5 Standard für FS FG

FSFGtri5-390-Std_rev	58	23	tca ctc cac tag ctc aat tga ac	
FCtri5-373-Std_for	60	22	ccc ttc tgc tgc ttg aac ctt a	tri5 Standard für FC
FCtri5-373-Std_rev	62	24	cgt agt tct tga cga ggc tga tct	
FGtri12-458-Std_for	59	20	ggg tgg cga gct gat gag ta	tri12 Standard für FG
FGtri12-458-Std_rev	58	19	cct tga aaa gga cag gcg g	
FStri12-457-Std_for	59	21	tgg tac tac ccc ccg tca ttt	tri12 Standard für FS
FStri12-457-Std_rev	61	19	cca cca ctc cag cac ctg	
FGtri101-454-Std_for	59	20	tga gga cgt tcc tgc tgt tg	tri101 Standard für FG
FGtri101-454-Std_rev	57	16	tgc act gac cgg cgt g	
FStri101-452-Std_for	58	18	tca acc tgc cgc gta cgt	tri101 Standard für FS
FStri101-452-Std_rev	58	19	tcc cca tca ggc ttc ttg g	

Identifikationsprimer für <i>Fusarium culmorum</i>				
Fculmorum_ident_for	53	19	atg gtg aac tgc tgc tgg c	FC spezifische Primer (Nicholson et al. 1998)
Fculmorum_ident_rev	54	20	ccc ttc tta cgc caa tct cg	
Identifikationsprimer für <i>Fusarium poae</i>				
Fpoea_ident_for	45	18	acg acg aag gtg gtt atg	FP spezifische Primer
Fpoea_ident_rev	54	21	ggg gaa gag cct gtt tgc ttg	
Screeningprimer Chloroperoxidase <i>P. nordicum</i>				
leptofum_for	59	21	ggc tac cca tac gac aac aac	spez. <i>L. fumago</i> Chloro.
leptofum_rev	59	20	gcg aag atg aag cca gac tc	
aqbi_for	56	19	acg ccg ccg aaa aag tag t	spez. <i>A. bisporus</i> Chloro.
aqbi_rev	56	19	gaa tgc cgc gaa tgt caa g	
putchloroPnNC_for	61	21	tag cct cga cct ttc tct gcg	spez. <i>N. crassa</i> Chloro
putchloroPnNC_rev	54	21	ttc ctc tac caa tat aac ctc	
putchloroPnT08ab_for	59	20	gcg ctg ctc ctt gag ctt tt	put. chlorop. aus DDRT
putchloroPnT08ab_rev	54	21	ttc ctc tac caa tat aac ctc	
Primer für Afl-Gene in <i>A. flavus</i>				
nor1-m	73	25	acc gct acg ccg gca ctc tgc gca	Primer spezifisch für ausgewählte Gene des Aflatoxinbiosynthese -clusters in <i>A. flavus</i>
nor2-m	71	25	ggt ggc cgc cag ctt cga cac tcc g	
omtA-2_for	59	20	cgg gtt tgc caa aag cat cc	
omtA-2_rev	51	20	cgc atc ggg ata gtc atg ta	
nor_FC_for	57	20	ggc gat taa gtt ggg taa cg	
nor_FC_rev	63	21	cgg gcc caa ttc gcc cta tag	
ver1	56	24	gcc gca ggc cgc gga gaa agt ggt	
ver2	68	24	ggg gat ata ctc ccg cga cac agcc	
omtA1	65	24	gtg gac gga cct agt ccg aca tcac	
omtA2	66	25	gtc ggc gcc acg cac tgg gtt ggg g	
pksA_Aflavus_for	64	25	gcg cca cag atg gat cca gct cag c	

pksA_Aflavus_rev	58	21	ggc gat gtg cac att gcg agc	
fas-2_Aflavus_for	55	22	ggc ccc cac acc att aca aag g	
fas-2_Aflavus_rev	57	24	gcc aca aag teg ggg gtt aac agc	
Chemotyp-spezifische Primer 3-Ac-DON/15-Ac-DON <i>F. graminearum</i>				
tri3_3AcDonspec_RT_for	54	22	ttg ttc atc agt gac ggt gtc a	tri3 Real Time Primer spezifisch für 3/15- Ac-DON Chemotyp in <i>F. graminearum</i>
tri3_3AcDonspec_RT_rev	53	19	ctt gac gtt gtc cgc tcc t	

2.1.2 Chemikalien: Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösemittel und Grundstoffe waren p.a. Qualität und wurden von den Firmen VWR (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (USA) bezogen.

2.1.3 Puffer und Lösungen: Alle Puffer und Lösungen wurden nach Standardmethoden hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Für spezielle Fragestellungen angesetzte Puffer und Lösungen sind in der jeweiligen Methodenbeschreibung gesondert angegeben.

2.1.4 Medien: Spezialmedien sind in den jeweiligen Methoden aufgeführt. Alle anderen Medien wurden standardmäßig angesetzt (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.5 Kits: Die verwendeten Kits wurden in der jeweiligen Methode aufgeführt

2.1.6 Primer und Oligonukleotidsynthese: Die Primer wurden von den Firmen MWG-Biotech, GATC-Biotech und Biomers synthetisiert, die Oligonukleotide von den Firmen Scienion (Berlin/Deutschland) und Eurogentec (Belgien).

2.1.7 Geräte: Die verwendeten Geräte und Ausstattung wurden im jeweiligen Methodenteil angesprochen. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem i-Cycler von Bio-Rad (München) durchgeführt, alle Real Time PCR Reaktionen in einem GeneAmp 5700 Sequence Detection System von Applied Biosystems (Foster City, USA).

2.1.8 Verwendete Pilzsstämme:

Tab. 2: Verwendete Pilzspezies

BFE Nummer	Genus/Spezies	Toxin
500	<i>P. verrucosum</i>	Ochratoxin
487	<i>P. nordicum</i>	Ochratoxin
752	<i>P. nordicum</i>	Ochratoxin
751	<i>P. nordicum</i>	Ochratoxin
754	<i>P. nordicum</i>	Ochratoxin

501	<i>P. verrucosum</i>	Ochratoxin
491	<i>P. verrucosum</i>	Ochratoxin
495	<i>P. verrucosum</i>	Ochratoxin
497	<i>P. verrucosum</i>	Ochratoxin
66	<i>P. nalgiovense</i>	
137	<i>P. camemberti</i>	
141	<i>P. chrysogenum</i>	
96	<i>A. flavus</i>	Aflatoxin B1 G2
45	<i>P. italicum</i>	
481	<i>P. vridicatum</i>	
573	<i>P. crustosum</i>	
574	<i>P. commune</i>	
659	<i>P. citreonigrum</i>	
660	<i>P. citrinum</i>	Citrinin
661	<i>P. glabrum</i>	
227	<i>F. solani</i>	Solanin
312	<i>F. moniliforme</i>	Fumonisin
324	<i>F. poae</i>	
347	<i>F. proliferatum</i>	
640	<i>A. carbonariu</i>	
631	<i>A. niger</i>	
635	<i>A. ochraceus</i>	Ochratoxin
1006	<i>F. graminearum</i>	DON, NIV
994	<i>F. sporotrichioides</i>	T-2 Toxin
929	<i>F. poae</i>	
928	<i>F. culmorum</i>	DON, NIV
126	<i>F. graminearum</i>	3-Acetyl-DON
633	<i>F. graminearum</i>	3-Acetyl-DON
646	<i>F. graminearum</i>	3-Acetyl-DON
4435	<i>F. graminearum</i>	15-Acetyl-DON

4436	<i>F. graminearum</i>	15-Acetyl-DON
4438	<i>F. graminearum</i>	15-Acetyl-DON
4439	<i>F. graminearum</i>	15-Acetyl-DON
4459	<i>F. graminearum</i>	15-Acetyl-DON
4475	<i>F. graminearum</i>	15-Acetyl-DON
5356	<i>F. graminearum</i>	15-Acetyl-DON

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zur Herstellung und Anwendung des Mikroarray: Es wurden jeweils in Eigenarbeit Microarrays entwickelt, sowie zum Vergleich auch Microarrays durch die Firmen Scienion (Berlin) und Eurogentec (Köln) im Auftrag gespottet. Folgende Methodenbeschreibung bezieht sich auf die selbst hergestellten Microarrays.

2.2.1.1 Spotten des Mikroarrays: Zur Herstellung der DNA-Chips wurden unterschiedlich beschichtete Glasobjektträger der Firmen Nexterion und Scienion verwendet. Die zu spottende DNA-Probe wurde gereinigt und auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Danach wurde die Probe eingengt und in unterschiedliche Spottlösungen reeluiert. Hierbei handelte es sich um spezielle Puffer der Firmen Scienion und Eurogentec, sowie 50 % DMSO oder destilliertes Wasser. Die Programmierung des Nadelspotters (Spottarray 24, Perkin Elmer) ist im Anhang aufgeführt. Verwendet wurden 4 Nadeln mit einem Kavitätvolumen von 0,25 µl. Die gespotteten Objektträger wurden in einer Feuchtekammer inkubiert (Siehe Ergebnisse, Entwicklung des Mikroarrays).

2.2.1.2 RNA Isolierung: Zur RNA-Isolierung wurde ein kommerzielles Kit der Firma Qiagen (RNeasy Plant Min Kit) eingesetzt. Die Isolierung der RNA erfolgte, mit Ausnahme einiger versuchsspezifischer Modifikationen, nach den Angaben des Herstellers und wird kurz beispielhaft skizziert: Die zu untersuchenden Pilzstämme wurden auf unterschiedlich zusammengesetzten Medien inkubiert (Minimalmedium, Vollmedium, Lebensmittelmodellmedium,

Lebensmittel). Verschiedene Einzelparameter und Parameterkombinationen (Wasseraktivität, Temperatur, pH-Wert) wurden im Medium standardisiert eingestellt und der Pilz unter konstanten Bedingungen inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und aus dem erhaltenen Myzel die RNA isoliert. Das Myzel wurde hierzu zuerst mit einem sterilen Skalpell von der Agaroberfläche möglichst quantitativ abgeschabt, in flüssigen Stickstoff überführt und durch Mörsern aufgeschlossen. Von dem pulverisierten Myzel wurden je 250 mg in 1.5 ml RNase freie Eppendorfgefäße mit 750 µl RLC-Lyse-Puffer, sowie 7,5 µl β-Mercaptoethanol überführt. Um den Aufschluss des Myzels und die Homogenisierung im Puffer zu optimieren, wurden 100 Glaskugeln (D=0,5 mm) in die Eppendorfgefäße gegeben. Danach wurde 1 min gevortext. Die Proben wurden nun bei 55 °C in einem Wasserbad für 3 min inkubiert. Das resultierende Lysat wurde in eine Qiashredder-Spin-Säule gegeben und für 2 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Danach wurde der Durchfluss in 0,5 Vol absoluten Ethanol überführt. Das entstandene Lysat und Präzipitat wurde dann auf eine RNeasy-mini-Säule überführt und 15 s bei 11.000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen. Um verbliebene DNA aus der Probe zu entfernen, wurde ein 15 minütiger DNase-Verdau mit RNasefreier DNase durchgeführt. Diese wurde zuvor aus 10 µl DNase Stocklösung und 70 µl RDD Buffer angesetzt. Daraufhin wurden die Säulen zuerst mit 350 µl Buffer RW1 und dann mit 500 µl Buffer RPE gewaschen. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 40 µl RNase freien Wasser in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß eluiert. Die RNA-Konzentration wurde in einem Photometer ermittelt und die Qualität der RNA mittels Elektrophorese bestimmt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3 Reverse Transkription der mRNA in cDNA und Markierung: Die verwendete mRNA wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Zu diesem Zweck und auch für die nachfolgende Markierung, wurde das Direct Labeling Kit der Firma Perkin Elmer eingesetzt. Die zu vergleichenden Proben wurden hierzu mit zwei verschiedenen Farbstoffen,

Cyanin3 und Cyanin5, markiert. Diese werden im Rahmen der cDNA-Synthese als markierte Nukleotide (Cy3-dUTP, bzw. Cy5-dUTP) in den neu zu synthetisierenden DNA-Strang eingebaut. Für eine Versuchsreihe wurde jeweils auf eine bestimmte RNA Menge eingestellt (mindestens 7 µg und maximal 80 µg Gesamt-RNA), außerdem auf die Biomasse aus der die jeweilige RNA isoliert worden war. Die RNA wurde in einem ersten Arbeitsschritt mittels Vakuumzentrifuge eingeeengt. Anschließend wurden 19 µl RNase freies Wasser, sowie 1 µl des Primer-Mix-Konzentrats aus dem Direct Labeling Markierungskit hinzugegeben. Nachdem die Proben 10 min bei 65 °C in einem Heizblock (Ika Labortechnik) inkubiert worden waren um die Sekundärstruktur der RNA zu denaturieren, wurden sie für 5 min bei RT abgekühlt, um ein Binden der Primer an die Probe zu ermöglichen. Nachfolgend wurden die Fluorophore Cyanin3 und Cyanin5 zu den Proben gegeben. Jeweils verschieden markierte Nukleotide zu zwei zusammengehörigen Proben. (z.B. *Fusarium culmorum* 5 Tage auf Mais-Agar-Medium inkubiert, sowie auf YES-Agar-Medium). Um die Reaktion zu starten, wurden die Proben 3 min auf 42 °C vortemperiert, 2,5 µl 10x Reaktionsbuffer, sowie 2 µl AMV RT/RNase Inhibitor Mix hinzugegeben und sodann für weitere 60 min bei 42 °C inkubiert. Danach wurden die Proben für 5 min auf 4 °C heruntergekühlt, 2,5 µl 0,5M EDTA (pH 8) hinzupipettiert, um die Reaktion zu stoppen, sowie 2,5 µl 1N NaOH, um die Hydrolyse des RNA-Templates einzuleiten. Die Proben wurden dann für 30 min bei 65 °C inkubiert, Daraufhin wieder für 5 min auf 4 °C abgekühlt und 6,5 µl 1 M Tris-HCL-Lösung hinzugegeben, um die Reaktion zu neutralisieren.

2.2.1.4 cDNA Aufreinigung: Während mehrerer Optimierungsschritte konnte festgestellt werden, dass eine Aufreinigung der cDNA zu einem signifikant verminderten Hintergrundrauschen auf dem Mikroarray führt. Die cDNA-Proben wurden daher mit dem QiaQuick MinElute Kit (Qiagen) wie folgt aufgereinigt: Die markierte cDNA wurde in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt und mit 500 µl PB-Puffer versetzt. Dieser Ansatz wurde in MinElute Zentrifugationssäulen pipettiert und für 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert.

Anschließend wurden 750 µl 35 % Guanidinium-Hydrochlorid hinzugegeben um Proteinbestandteile zu binden. Wiederholt wurde bei 13.000 Upm für 1 min zentrifugiert und die Säulen mit 400 µl PE-Puffer mehrmals gewaschen. Die gereinigte cDNA wurde in 1.5 ml Eppendorfgefäße mit 30 µl EB-Puffer eluiert, mittels Vakuumzentrifuge eingengt und unter mehrmaligem Vortexen in 100 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen. Die so vorbereiteten Proben wurden für 2 min bei 95 °C inkubiert, um die enthaltene cDNA in Einzelstränge zu denaturieren.

2.2.1.5 Hybridisierung und Scannen des Mikroarrays: Die cDNA-Proben wurden in einer automatischen Hybridisierungsstation (Hybarray, Perkin Elmer) für 18 h bei 42 °C gegen die Gensonden auf den Mikroarrayslides hybridisiert. Nach dem Hybridisierungsvorgang wurden die Slides in einem bichromatischen Array-Scanner (Scanarray, Perkin Elmer) bei einer Auflösung von 5 µm ausgelesen. Eine Fluoreszenzanregung der hybridisierten Proben erfolgt hierbei durch Laserlicht zwei verschiedener Wellenlängen (He-Ne 633 nm, bzw. Kr-Ar 514 nm). Diese Fluoreszenz wird optoelektronisch gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der Scanarray Software von Perkin Elmer.

2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden:

2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus dem Myzel von Schimmelpilzen: Einige Sporen des gewünschten Pilzstammes wurden mittels einer ausgeglühten Platinimpföse aus der Stammkultur entnommen, in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß mit 100 µl Tween-80 (Sigma) überführt und gevortext. Anschließend wurde die Sporenlösung in 250 ml Kolben mit dem jeweiligen Medium pipettiert und 5 Tage bei 25 °C auf einem Kolbenschüttler inkubiert. Das in diesem Zeitraum gewachsene Pilzmyzel wurde unter Vakuum abfiltriert und der Myzelpellet zur DNA-Extraktion mit Mörser und Pistill unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert. Das pulverisierte Myzel wurde mittels Spatel in 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Hiernach wurden 7 ml 50 mM Lysepuffer

hinzugegeben, gevortext und bei 65 °C für 15 min im Wasserbad inkubiert. Danach wurde das lysierte Myzel bei 15.000 Upm und 4 °C in einer Sorvalzentrifuge für 20 min zentrifugiert (Rotor SS-34). Der Überstand mit der DNA wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt, der Pellet aus Zellmaterial verworfen. Nach Zugabe von 1 ml 4M Na-Ac-Lösung wurde auf Eis für 1 Std ausgefällt. Schließlich wurde bei 15.000 Upm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Nach dem Fällungsschritt wurde der gesamte Überstand wieder in ein frisches Zentrifugenröhrchen gegeben und dieses mit dem 2,5 fachen Volumen an absoluten Ethanol, sowie 1/10 Vol 3M Na-Ac-Lsg aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde bei 13.000 Upm und 4 °C für 15 min zentrifugiert, der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und der verbleibende Pellet für 20 min in einem Vakuumkonzentrator (SpeedVac) eingengt. Der verbleibende Pellet wurde in 1 ml 10 mM Tris resuspendiert und in 2 ml Eppendorfgefäße pipettiert. Die Lösung wurde bei 13.000 Upm innerhalb von 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde nachfolgend in frische 2 ml Eppendorfgefäße überführt und dieser Waschschrift 2 mal wiederholt. Die resultierende genomische DNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.2.2 Spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerasekettenreaktion: Die PCR, entwickelt 1985 von K. Mullis (Mullis *et al.*, 1992), dient zur spezifischen Amplifikation von DNA. Als Ausgangs-DNA wurde entweder genomische DNA oder Plasmid-DNA eingesetzt. Annealingtemperatur, Konzentrationen von Primern, dNTPs, Puffer, Taq-Polymerase und DNA-Template wurden gegeneinander optimiert um eine größtmögliche Sensitivität und Spezifität der PCR-Reaktion zu erreichen. Ein allgemeiner Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl Template (1 µg DNA) bzw. 1 µl Template (0.2 µg Plasmid-DNA). Außerdem 5 µl 10 x-Polymerase-Puffer, 8 µl dNTP-Mix (je 2.5 mM), Primer 1, 1,25µl 100 pmol, Primer 2, 1,25µl 100 pmol, DNA-Polymerase 0.5 µl (2 U), mit H₂O bidest wurde auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR wurde in einem iCycler (Bio-rad, München) durchgeführt. Ein typisches PCR-

Programm war wie folgt aufgebaut: **1X**: 95 °C 2 min, X °C 30 s (X = primerspezifische Annealingtemperatur), 72 °C 2 min; **40X**: 95 °C 30 s, X °C 30 s, 72 °C 2 min, 95 °C 30 s, 72 °C, 6 min.

2.2.2.3 Bestimmung der Kopienzahl eines PCR-Produktes: Zur Bestimmung der Kopienzahl eines Amplifikats wurde dessen Konzentration im Photometer ermittelt. Beträgt die gemessene Konzentration an DNA beispielsweise 4,8 µg/ml und man setzt voraus, dass 1 Nukleotid die Masse von 300 g/Mol/l hat und 1 Basenpaar 600 g/Mol/l entspricht, sowie eine erwartete Fragmentlänge von beispielsweise 340 bp vorliegt, so käme eine Gesamtmasse von 204.000 g/Mol/L zustande. $204.000 \text{ g/L} = 1 \text{ Mol}$; $0,48 \text{ g/L} = x$; so ist $x = 2.35 \times 10^{-6}$ Teilchen und 1 Mol entspräche $6,025 \times 10^{23}$ Teilchen. Ergo $1,4158 \times 10^{18}$ Teilchen/L \rightarrow $1,4158 \times 10^{12}$ Teilchen/µl.

2.2.2.4 Expand PCR: Die Amplifikation von DNA-Fragmenten >3 kb erforderte besondere Versuchsansätze, da die Taq-Polymerase Fragmente dieser Größenordnung nicht mehr mit ausreichender Effizienz amplifiziert. Aus diesem Grund wurde hierfür das Expand™ Long Template PCR-System von Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Hierbei wird ein Mix aus Taq-Polymerase und einer proofreading-Polymerase (eine Polymerase mit 3'-5' Exonuklease-Aktivität) eingesetzt. Der optimierte Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 24,25 µl H₂O bidest., 5 µl dNTP-Mix (5 mM), 5 µl Puffer 1 (10x mit 17,5 mM MgCl₂), 5 µl DNA (1 µg/µl, 1:20 verdünnt) 5 µl Primer1 (1:20 von 100 pmol/µl = 5 pmol/µl), 5 µl Primer2 (1:20 von 100 pmol/µl = 5 pmol/µl), sowie 0,75 µl Enzym-Mix (5U/µl). Ein typisches Expand-PCR-Programm war wie folgt aufgebaut (Steigerungsintervall nach jedem Zyklus: 10 s: **1X**: 92 °C 2 min; **10X**: 92 °C 10 s, 60 °C 30 s, 68 °C 2 min; **20x**: 92 °C 10 s, 60 °C 30 s, 68 °C 2 min; **1x**: 68 °C 2 min.

2.2.2.5 Quantitative Real Time PCR: Die quantitative Real Time PCR ist, wie auch die Standard-PCR, eine Multiplikationsmethode für DNA-Fragmente. Sie bietet jedoch zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung eines Amplifikats.

Zur Durchführen einer quantitativen Real Time PCR Reaktion wurde das qPCR core kit/SYBR Green (Eurogentec, Köln) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 1 µl DNA-Probe, 2.5 µl Puffer, 1.5 µl MgCl₂ (50 mM), 1.0 µl dNTP-Mix (2.5 mM), 1 µl je Primer (20 µM), 0.75 µl SYBR green, 0.25 µl Amp Erase UNG, 1.0 µl Ampli Tag Gold, 15.88 µl H₂O bidest. Folgendes Temperaturprofil kam zum Einsatz: **1X**: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, **35X**: 95 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s; **1X**: 55 °C, 20 s, 72 °C 30 s.

2.2.2.6 Real Time PCR: Während für eine quantitative Analyse genomische DNA verwendet wird, kommt bei der Real Time PCR cDNA zum Einsatz, da hier nur aktiv exprimierte Gene analysiert werden sollen. Zu diesem Zweck wurde die zu amplifizierende mRNA-Probe mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Es wurde das Omniskript Reverse Transcriptase Kit von Qiagen eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz lautete wie folgt: 2 µl 10 x Puffer RT, 2 µl dNTP mix, 2 µl Oligo dT Primer (10 pmol/µl), 1 µl RNase Inhibitor (9,8 u/µl), 1 µl Omniskript Reverse Transkriptase und 10 µl RNA - Probe (1 µg/µl, DNase behandelt). Dieser Ansatz wurde 1 Std bei 37 °C inkubiert. Die aus dieser Reaktion hervorgehende cDNA wurde wie folgt für die Real Time PCR Reaktion weiterbehandelt. Jeder Ansatz enthielt ein Gesamtvolumen von 25 µl. Es wurde jeweils ein Mastermix angesetzt, der wie folgt zusammengesetzt war: 2,5 µl 10 x SYBR-Green PCR Puffer, 3,0 µl, MgCl₂ (25mmol), 2,0 µl dNTP - Mix, 0,5 µl forward Primer (100 pmol 1:5 verdünnt) und 0,5 µl reverse Primer (100 pmol 1:5 verdünnt). Außerdem 14,125 µl Aqua dest., 0,25 µl Amp Erase UNG, 0,125 µl Ampli Taq Gold, Taq-Polymerase und 2 µl cDNA Template (1µg/µl). Der Ansatz wurde in 0,2 ml GeneAmp optical PCR tubes pipettiert (Applied Biosystems, USA), diese mit optical caps verschlossen (AB), in ein MicroAmp 96-Well Aufnahmegitter eingesetzt und dieses in die Real Time PCR Maschine eingesteckt (GeneAmp 5700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, USA). Ein typisches Real Time PCR Programm war wie folgt strukturiert: **1X**: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min; **50X**: 95 °C 20 s, X °C 40 s (X= primerspezifische

Annealingtemperatur), 72 °C 60 s. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe des zu untersuchenden PCR Produktes mit einer voreingestellten Kopienzahl von 10^7 bis 10^2 verwendet, als Negativkontrolle ein Reaktionsansatz ohne Template.

2.2.2.7 Agarosegelelektrophorese: Die analytische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch in einem Agarosegel (Sharp *et al.*, 1973; Sambrook *et al.*, 1989). Um die aufgetrennten DNA-Banden sichtbar zu machen, wurde den Agarosegelen Ethidiumbromid zugegeben. Dieses interkaliert in die DNA und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese mit Ladepuffer (50 % Glycerin, 0,42 % Bromphenolblau, 0,42 % Xylencyanol, 0,42 % Orange-B) versetzt. Das Glycerin erhöht hierbei die Dichte der DNA-Lösung und lässt die Proben in die Taschen absinken. Der Farbstoff dient als Indikator und zeigt die zurückgelegte Laufstrecke im elektrischen Feld an. Die Größe von linear doppelsträngigen Molekülen wurde durch Vergleich mit einem internen Längenstandard bestimmt. Die Agarose wurde durch Aufkochen im Mikrowellengerät in 1x TBE-Puffer gelöst. Danach wurde die Agaroselösung mit 5 mg/ml Gel Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer mit eingesetztem Probestaschenkamm gegossen. Das vollständig auspolymerisierte Agarosegel wurde mit 1x TBE-Puffer überschichtet und mit den DNA-Proben (1 Vol DNA-Lösung + 9 Vol 1X Ladepuffer, bzw. 9 Vol PCR-Produkt+ 1 Vol 10X Ladepuffer) beladen. Als Größenstandard wurde ein 100 bp-Standard von Amersham Bioscience verwendet (McDonnell *et al.*, 1977). Die Elektrophorese erfolgte jeweils für 120 min und 120 V bei 0,8 %igen Gelen und bei 1 %igen Gelen bei 100 V. Zur Detektion wurden die DNA-Banden im Gel auf einem UV-Leuchttisch von Neolab zur Fluoreszenz angeregt und auf einem Geldokumentationsgerät (Fluor-S) fotografisch festgehalten.

2.2.2.8 Isolierung von PCR-Fragmenten aus dem Agarosegel: Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zu isolieren, wurde nach der PCR oder dem

Restriktionsverdau eine Gelelektrophorese durchgeführt. Nach dem Elektrophoreselauf wurde auf einem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell das Agarosestück aus dem Gel ausgeschnitten, welches das gewünschte DNA-Fragment enthielt. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte dann mit dem QIAEXII-Gel-Extraction-Kit (Qiagen, Hilden). Zu dem Agarosestück mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde ein 3-faches Volumen an Buffer QX I zugegeben (für 100 bp - 4 kb). Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Galaktoseresten des Agarosepolymers durch die hohe Konzentration an chaotropen Salz im QX1-Puffer gespalten. Anschließend wurde die QIAEX II Suspension aus dem Kit hinzu gegeben. Die jeweils erforderliche Menge an QIAEX II Suspension hing von der verfügbaren DNA-Konzentration ab. ($\leq 2 \mu\text{g DNA} - 10 \mu\text{l QIAEX II}$, $2 - 10 \mu\text{g DNA} - 30 \mu\text{l QIAEX II}$, jede weitere $10 \mu\text{g DNA}$ erforderten je $30 \mu\text{l QIAEX II}$ zusätzlich). Anschließend wurden die Proben 10 min im Wasserbad bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, um die Gelmatrix aufzulösen. Die durch das Auflösen der Agarose freigewordene DNA bindet an die Silica-Gelpartikel der QIAEX II-Suspension und wird mit H_2O in ein 1.5 ml Eppendorftube eluiert.

2.2.2.9 Southern Blot: Der Southern-Blot ist eine Möglichkeit zur Übertragung der DNA von einem Agarosegel auf eine Nylonmembran zur späteren Hybridisierung gegen eine komplementäre DNA-Sonde. (Southern, 1992). Zur Vorbereitung wurde die genomische DNA des zu untersuchenden Pilzstammes mit der entsprechenden Restriktions-Endonuklease verdaut, um so Fragmente unterschiedlicher Größe zu erhalten. Der Restriktionsansatz mit der genomischen DNA wurde für 2,5-3 Std bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen des Verdau wurden zu der Probe $20 \mu\text{l 3M Na-Ac-Lsg.}$ und $500 \mu\text{l Ethanol absolut}$ hinzugeben. Der Verdau wurde sodann über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gefällt. Anschließend wurde die Probe bei 13.000 Upm für 15 min abzentrifugiert und der resultierende Pellet für 10 min getrocknet. Zur Weiterverarbeitung wurde der Pellet in $10 \mu\text{l 10 mM Tris-Lsg.}$ aufgenommen. Der Verdau wurde nun auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses

Gel wurde dann in eine Plastikschaale überführt und wie folgt in dieser weiterbehandelt: Erst wurde für 15 min in Depurinierungslösung inkubiert, mit H₂O ab gespült und 15 min in Denaturierungslösung inkubiert. Nach diesem Schritt wurde wieder mit H₂O ab gespült und für 15 min in Neutralisierungslösung inkubiert bevor am Schluss noch einmal mit H₂O ab gespült wurde und für 5 min 20x SSC Puffer inkubiert wurde. Während der nachfolgenden Gel-Behandlung wurde die positiv geladene Nylonmembran mit H₂O gewässert und anschließend in 20x SSC-Puffer eingelegt. Die Pinzetten zur Überführung der Membran wurden zuvor mit Aceton ab gespült, die verwendeten Filterpapiere wurden mit 20x SSC-Puffer befeuchtet. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt. Während des Transfers wird der Puffer durch das Gel in trockenes Filterpapier gesaugt und nimmt dabei die DNA aus dem Gel mit, die auf ihrem Weg nach oben aber durch das Nylonfilter zurückgehalten wird und somit an diesem haften bleibt. Nach dem Transfer, der über Nacht erfolgte, wurde die Nylonmembran mindestens 30 min auf Filterpapier getrocknet und dann für 2,5 min von beiden Seiten mit UV-Licht von 80.000 µJ bestrahlt (Cross-linking). Durch diesen Schritt wird die DNA kovalent an die Membran gebunden. Danach erfolgte die Hybridisierung mit den entsprechenden Sonden. Hierzu wurde die vollständig trockene und beidseitig gecrosslinkte Nylon-Membran zusammen mit 10 ml Prähybridisierungslösung in ein Hybridisierungsröhrchen geben und für 4-6 h bei der jeweils erforderlichen Hybridisierungstemperatur in einem Hybridisierungsofen (Thermo Elektron) prähybridisiert. Mit dieser Verfahrensweise sollte erreicht werden, dass die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch die Prähybridisierungslösung belegt werden, um eine spätere Artefaktbindung, bzw. einen zu intensiven Hintergrund während der Hybridisierung zu vermeiden. Nach Ablauf der Zeit wurde die Prähybridisierungslösung abgegossen und verworfen. Nun wurden 5 ml der bei 95 °C denaturierten Sonde hinzugegeben. Es wurden nun die DNA-Fragmente auf der Nylonmembran über Nacht bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur inkubiert. Zur Herstellung der Sonde wurde die PCR mit den jeweiligen Primern, die das gewünschte Fragment

amplifizieren sollen durchgeführt, jedoch mit Digoxigenin markierten dNTPs. Die Sonde hybridisiert mit homologen Strukturen auf der Membran. An diesen Hybridisierungsstellen bildet sich, nach entsprechender Vorbehandlung, später das Farbpräzipitat. Die Membran wurde im Hybridisierungsröhrchen weiterbehandelt. Zuerst Inkubation 2x 5 min bei RT mit 10 ml Waschlösung 1. Danach Inkubation 2x 15 min bei x °C mit 10 ml Waschlösung 2. Nach den Waschvorgängen wurde die Membran im Hybridisierungsröhrchen gefärbt. Zuerst Inkubation 5 min bei RT mit 10 ml Waschpuffer, dann Inkubation 30 min bei RT mit 10 ml 1x Blockierungslösung. Inkubation 30 min bei RT mit 10 ml Antikörperlösung. Anschließend Inkubation 2x 15 min bei RT mit 10 ml Waschpuffer. Danach Inkubation 2x 5 min bei RT mit 10 ml Detektionspuffer. Zum Schluss Inkubation über Nacht bei RT mit 10 ml Farbsubstratlösung. Nach Ablauf der Farbreaktion wurde die Nylonmembran mit H₂O dest. abgespült und fotografiert.

2.2.3 Mikrobiologische Standardmethoden:

2.2.3.1 Nährmedien und Wachstumsbedingungen:

2.2.3.1.1 Modifikationen der Nährmedien: Um die Bildungsrate des jeweiligen stammspezifischen Mykotoxins auf verschiedenen Nährmedien bzw. Minimalnährmedien zu untersuchen, wurden Sporensuspensionen der entsprechenden Stämme vorbereitet, in Tween-80 (Sigma) resuspendiert und als 3-Punkt-Kultur auf dem jeweiligen Nährmedium angezüchtet. Für das Lebensmittelmodellmedium wurden 25 g Weizenkörner und 15 g Agar je Liter verwendet, bzw. 25 g geschrotete Maiskörner und 15 g Agar. Zur Analyse des Einflusses verschiedener Wachstumsparameter auf die Toxinbiosynthese wurde jeweils Standard YES-Medium verwendet (20 g/l Hefeextrakt, 150 g/l Saccharose, 15 g/l Agar) und die pH-Werte 4, 5, 6, 8 eingestellt, unter den Temperaturen 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C inkubiert, oder die a_w-Werte 0.99, 0.98, 0.95, 0.93 eingestellt.

2.2.3.1.2 Einstellen des pH im Medium: Der pH-Wert wurde im Medium jeweils durch Zugabe von Natriumhydroxidplättchen oder Salzsäure (37 %) eingestellt.

2.2.3.1.3 Einstellen der Temperatur im Medium: Zur Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen wurden jeweils verschiedene Brutschränke verwendet.

2.2.3.1.4 Einstellen der Wasseraktivität im Medium: Die Wasseraktivität im Medium wurde wie folgt durch Zugabe von Glycerol eingestellt:

Tab. 3: **Einstellen der Wasseraktivität im Medium.** Glycerolanteil zum Einstellen des a_w -Wertes im Medium.

a_w -Wert	Glycerol in 100 ml Medium
0.99	10.8
0.98	13.1
0.95	19.9
0.93	24.5
0.90	31.3
0.88	35.9

Um ein Verändern der Wasseraktivität im Medium während der Inkubationsdauer zu verhindern, wurden Probenplatten mit identischem a_w -Wert in einem Plastikbeutel eingeschlagen.

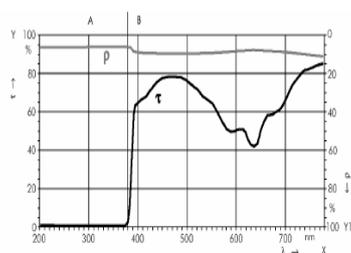
2.2.3.1.5 Minimalnährmedien: Im Fall von *Penicillium* wurden Wachstum und Genexpression außer auf YES-Medium, welches die OTA-Biosynthese förderte, auch auf Minimalnährmedium mit KNO_3 untersucht, welches die Toxinbiosynthese moderat hemmte (20 g/l KH_2PO_4 , 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/l NaCl, 0.1 g/l CaCl_2 , 0.7 g/l KOH, 15 g/l Agar, pH 6.5 versetzt mit 5 g/l Glucose, 1.2 g/l KNO_3). Überimpft wurde jeweils aus der 7 Tage alten Vorkultur.

Das Medium, welches in Fusarium die Toxinbiosynthese hemmte, war wie folgt zusammengesetzt: 15 g Pepton, 1g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g Agar, 0.0025 g Malachitgrünoxalat, 1 L H_2O dem.

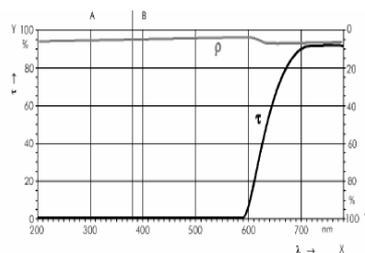
2.2.3.2 Weitere Inkubationsbedingungen:

2.2.3.2.1 Inkubation unter Licht verschiedener Wellenlänge: Die Lichtqualität wurde mit Plexiglasfiltern von 3 mm Dicke (Röhm GmbH & Co. KG, Darmstadt), UV-undurchlässig und mit definierten Transmissionswellenlängen eingestellt.

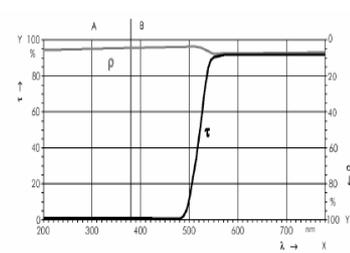
GS blau 627:



GS rot 502:



GS gelb 303:



A = UV-Bereich
 B = sichtbarer Bereich
 X = Wellenlänge λ in nm
 Y = Transmissionsgrad τ in %
 Y1 = Reflexionsgrad ρ in %

Abb. 12: **Verwendete Plexiglasfilter.** Absorptionsbereich der verwendete Plexiglasfilter.

Inkubiert wurden die zu untersuchenden Schimmelpilzstämmen auf Standard YES-Medium, bzw. stammspezifischem Lebensmittel in einem Phytotron bei einer voreingestellten Temperatur von 25 °C, einer Gesamtlichtintensität von 50 klx und einer relativen Luftfeuchte im Raum von 70 % unter dem jeweiligem Plexiglasfilter, bzw. im Dunkeln als Kontrolle. In späteren Versuchen wurden 5-Watt Leuchtdioden (Luxeon) verwendet:

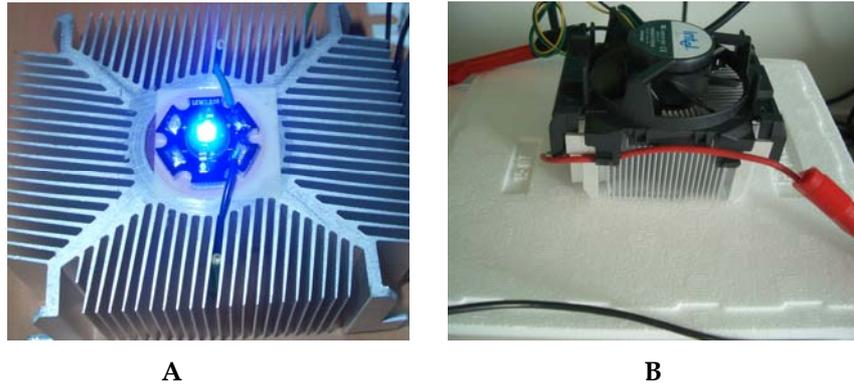


Abb. 13: **Verwendete LEDs.** **A** Luxeon 5 Watt LED auf Kühlkörper, **B** Versuchsaufbau. Die LED ist in den Styroporsockel eingelassen und strahlt auf die inkulierte Agarplatte am Boden der Styroporkiste.

2.2.3.2.2 Inkubation im 24 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus: Um zu analysieren, welchen Einfluss wechselnde Hell-Dunkel-Phasen auf Toxinproduktion bzw. Genexpression in Schimmelpilzen haben, wurde der jeweils zu untersuchende Stamm in einem Brutraum mit voreingestellter Temperatur von 25 °C inkubiert. Für die möglichst natürliche Beleuchtung sorgte eine spezielle Leuchtstoffröhre (LifeLite, LifeEnergy Systems, Deutschland) mit einem dem Tageslicht entsprechenden Spektrum.

Artnr.	Leistung	Lumen	Länge	Ø	Fassung
LLT 58	58 Watt	3700	1500 mm	26	G13

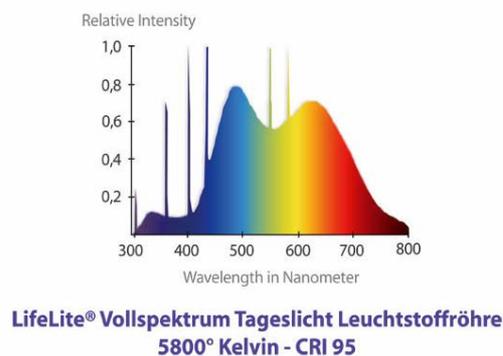


Abb. 14: **Verwendete Tageslichtlampe.** Spektrum der verwendeten Tageslichtlampe.

Diese wurde mittels vorgeschalteter Zeitschaltuhr im 12-Stunden-Rhythmus an- und ausgeschaltet. Proben für RNA-isolierung (Genexpression) und HPLC (Toxinbiosynthese) wurden in einem Versuchsansatz alle 6 h genommen (6:00,

12:00, 18:00, 24:00) und in einem anderen Versuchsansatz jede volle Stunde. Die verwendeten Vorkulturen waren 4 Tage alt. Außerdem wurden jeweils zu den gleichen Zeitpunkten Kontrollproben von Kulturen genommen, die nur im Dunkeln inkubiert worden waren.

2.2.3.3 Infektion von Weizenpflanzen mit *Fusarium* unter kontrollierten Bedingungen: Um die Genexpression und Mykotoxinbiosynthese unter *in vivo* Bedingungen zu analysieren, wurden Weizenkörner der Sorten Thasos (moderate Resistenz gegen *Fusarium*) und Taifun (keine Resistenz gegen *Fusarium*) in je 5 Mitscherlich-Töpfe (D=20cm) mit einem entsprechenden Torf/Erde Gemisch zu je 10 Weizenkörnern/Topf ausgesät. Der Versuch wurde in einem Phytotron mit voreingestellten Wachstumsprogramm (Tab 4) durchgeführt (Abb. 15).



Abb. 15: Phytotron mit jungen Weizenpflanzen in sogenannten Mitscherlichtöpfen. Die Pflanzen der Sorten Thasos und Taifun wurden mit Sporen von *Fusarium culmorum* inokuliert.

Die programmierten Inkubationsbedingungen sind den natürlichen Feldbedingungen nachempfunden. Die Substratoberfläche sowie die auskeimenden Pflanzen wurden mehrmals mit einer Sporensuspension von *F. culmorum* inokuliert. Nach 46, 68, 74, 81, 89 und 95 Tagen wurden Proben genommen (jeweils die ganze Ähre), die RNA isoliert und mittels Mikroarray die Expression des Trichothecengenclusters, sowie mit Real Time PCR die Expression der Trichothecenbiosynthesegene *tri5*, *tri12* und *tri101* ermittelt. Außerdem wurde mit ELISA die zum jeweiligen Zeitpunkt von *Fusarium* gebildete Toxinmenge bestimmt.

Tab. 4 **Programm des Phytotron.** Programmierung des Phytotron für die Anzucht von Weizen.

Segment	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
Temperatur	15 °C	25 °C	25 °C	15 °C	15 °C
Luftfeuchte	80 %	60 %	60 %	80 %	80 %
Zeitdauer	6 Stunden	6 Stunden	7 Stunden	3 Stunden	2 Stunden
Äquiv. Uhrzeit	0:00	12:00	19:00	22:00	0:00

2.2.3.4 Probenahme, Toxinextraktion und Analytik

2.2.3.4.1 *Penicillium/Ochratoxin*: Die Entnahme der Proben zur Bestimmung der Toxinkonzentration mittels Dünnschichtchromatographie oder HPLC wurde folgendermaßen durchgeführt: Aus mehreren Bereichen einer Pilzkolonie wurden mit einem sterilen Korkbohrer ($\varnothing = 8$ mm) insgesamt 4 Blöckchen ausgestochen und diese in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Zur Extraktion wurden 500 μ l Chloroform zu den Probenblöckchen gegeben und diese 30 min bei 25 °C auf einem Eppendorfschüttler ausgeschüttelt. Während dieser Prozedur geht das Mykotoxin in Lösung. Anschließend wurden feste Bestandteile abfiltriert und die Lösung eingeeengt. Danach wurde der Rückstand in 100 μ l Methanol (LiChrosolv) reeluiert und in Probenfläschchen mit Deckelmembran überführt.

2.2.3.4.1.1 Ochratoxin A Bestimmung mittels Dünnschichtchromatographie: Die Methanolextrakte wurden zu je 10 μ l mittels eines CAMAG TLC Sample-III-DC-Roboters auf DC Glasplatten (MERCK Silica 20 x 20 cm) aufgetragen. Als Referenz wurde zusätzlich ein OTA-Standard aufgetragen (4 ng/ μ l OTA). Nach dem Auftragen wurden die Proben auf den Kieselgelplatten in einer Laufkammer mit Fließmittel aufgetrennt. Das Fließmittel setzte sich wie folgt zusammen: 30 ml Toluol; 15 ml Ethylacetat; 5 ml Ameisensäure.

2.2.3.4.1.2 Ochratoxin Bestimmung mittels HPLC: Die Detektion und Quantifizierung von Ochratoxin mittels HPLC wurde nach der in ISO 15141

Standard beschriebenen Methode durchgeführt (1998, www.iso.ch). Hierfür wurden 100 mg der Pilzbiomasse auf einem Schüttler für 30 min in 500 µl Chloroform bei RT extrahiert. Im Falle von Weizenproben wurden 2 g kontaminierte Weizenkörner verwendet. Nach der Extraktion wurden die festen Bestandteile abfiltriert und die Chloroform-Phase in einem Konzentrator (Savant Instruments, USA) eingengt. Der verbleibende Pellet wurde dann in 200 µl Methanol reeluiert und 20 µl in die HPLC Säule des HPLC-Gerätes eingespritzt. (Pharmacia HPLC apparatus LKB 2150, Pharmacia, Sweden). Als Säule wurde eine Nucleosil 100-5 C18 CCV 250/4 verwendet (Machery and Nagel, Germany). Die Durchflussrate betrug 1 ml/min mit folgender Laufmittelzusammensetzung: Acetonitril:Wasser:Essigsäure (40:60:1, [v:v:v]). Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenz Detektor (Shimazu RF551, Germany)

2.2.3.4.2 *Fusarium/Deoxynivalenol:* Jeweils eine vollständig mit Myzel bewachsene Medienplatte wurde aus der Petrischale entnommen, grob zerkleinert und für 60 min in 500 ml Duroblastflaschen mittels 100 ml Acetonitril/H₂O (84:16) extrahiert. Die resultierende Lösung wurde über Wattman Filterpapier mit 1 g Aktivkohle abgefiltert und sodann in einem Rotationsverdampfer eingengt. Anschließend wurde in 1 ml Methanol reeluiert.

2.2.3.4.2.1 Deoxynivalenolbestimmung mittels Dünnschichtchromatographie: 10 µl des Methanolreeluats wurden auf eine DC-Platte aufgetropft. Diese wurde zur Derivatisierung zuvor mit einer 20 % AlCl₃-Lösung besprüht und für 10 min bei 100 °C gebacken. Durch diesen Derivatisierungsvorgang wird das nicht fluoreszierende Toxin in ein durch UV-Licht anregbares Derivat überführt. Das Fließmittel setzte sich wie folgt zusammen: 40 ml Toluol; 20 ml Methanol; 10 ml Aceton. Die DC-Glasplatten mit den Proben wurden durch Betrachten unter UV-Licht ausgewertet. In diesem Falle sollte in Höhe des jeweiligen Toxinstandards eine türkisgrüne/hellblaue Fluoreszenz zu sehen sein. Die Ergebnisse wurden fotografisch festgehalten. Die Belichtungszeit betrug üblicherweise 20 s.

2.2.3.4.2.2 Deoxynivalenolbestimmung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mittels ELISA können niedermolekulare Verbindungen wie Mykotoxine nachgewiesen werden. Als Ausgangsproben wurden die filtrierten Toxinextrakte verwendet. Zur Durchführung wurde ein AgraQuant Deoxynivalenol Kit der Firma Romer (Romerlabs, Singapur) verwendet und eine äquivalente Anzahl an Elisa-Wells vorbereitet. In jedes Dilution-Well wurden 200 µl Konjugat vorgelegt. Sodann wurde der entsprechende Standard (entsprechend 0; 0,25; 1,0; 2,0; 5,0 ppm DON), bzw. die zu untersuchenden Proben pipettiert. Anschließend wurde gründlich gemischt und jeweils 100 µl des Ansatzes in die mit Antikörper beschichteten Analyse-Wells überführt. Nun wurde 15 min bei RT inkubiert, die Lösung anschließend verworfen und die Wells 5x mit Pufferlösung gewaschen. Nach Hinzufügen von 100 µl Substratlösung wurde wieder für 5 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 µl Stopplösung hinzu pipettiert und die Ergebnisse unter Verwendung eines 450 nm Filters auf einem ELISA-reader (Thermomax, Molecular Devices) quantitativ ausgewertet.

2.2.3.5 Transformation:

2.2.3.5.1 Bakterientransformation/Transformation von *E. coli*: Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme freier, löslicher DNA aus dem Medium durch einen Rezipienten (*Escherichia coli*). *E. coli* besitzt kein natürliches Transformationssystem das sie zur aktiven Aufnahme freier DNA befähigt. Aus diesem Grund ist bei diesen Bakterien nur eine passive Aufnahme der DNA nach entsprechender Vorbehandlung der Zellen möglich. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, Bakterien die Fähigkeit zur Aufnahme externer DNA (Kompetenz) zu verleihen. In dieser Arbeit wurden *E. coli*- Kulturen verwendet, welche durch die CaCl₂-Methode Kompetenz erhielten.

2.2.3.5.1.1 Ligation mit T4-DNA-Ligase: Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-OH und dem 5'-

Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA-Moleküle. Zur Ligation wurden in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß Vektor und DNA-Fragment im Verhältnis 3:5 gemischt. Es wurden 2 µl Ligase-Puffer (10 x) und 0.5 µl T4-DNA-Ligase hinzugegeben und mit Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 Std bei RT und anschließend eine Stunde bei 4 °C inkubiert.

2.2.3.5.1.2 Transformation kompetenter *E.coli* Zellen: Zu je 200 µl der kompetenten Zellen wurden 10 µl Ligationsansatz, oder 1 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA pipettiert, kurz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz 120 s einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt. Zur Regeneration der Zellen wurden 0,8 ml LB-Medium hinzugegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 7.500 Upm für 2 min abzentrifugiert und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe des chromogenen Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (XGal) können rekombinante Plasmide durch α-Komplementation identifiziert werden (Ullmann *et al.*, 1967). Das Plasmid enthält hierbei einen Teil des Aminoterminus der β-Galactosidase in dem ein Polylinker eingebettet ist. Das Empfängerbakterium enthält den Carboxy-Terminus (DH5α-Stämme). Assoziieren beide Fragmente entsteht ein intaktes Enzym, welches X-Gal in Galactose und 5-Brom-4-indoxyl hydrolysiert (Horwitz *et al.*, 1964). 5-Brom-4-indoxyl dimerisiert zu der blauen unlöslichen Verbindung 5,5'-Dibrom- 4,4'-chlorindigo. Enthält der Polylinker des Plasmids ein Insert, so unterbleibt die Entstehung eines vollständigen Amino-Terminus und somit auch die Blaufärbung der Kolonie durch X-Gal.

2.2.3.5.1.3 Plasmidvermehrung in *E. coli*-Transformanten: Es wurden 5 µl der Plasmidprobe mit 15 ml 10 M Tris-Lösung, sowie 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen (DH5αTH) versetzt. Nun wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Heatshock bei 42 °C durchgeführt. Sodann wurde 1 ml LB-Bouillon hinzupipettiert und 1 Std bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die

Proben auf LB-Ampicillin-Platten (10µg Ampicillin/10 ml Medium) ausplattiert und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur weiteren Vorgehensweise wurde eine einzelne Kolonie mittels Impföse in LB-Ampicillin-Bouillon (Ampicillin 100 µl/ml) gegeben. Diese wurde anschließend wieder über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

2.2.3.5.1.4 Maxipräparation von Bakterien-DNA: Die LB-Bouillon mit den Transformanten wurde auf Zentrifugenröhrchen zu je 20 ml verteilt, bei 13.000 Upm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Pellet wurde mit 2 ml Plasmid-Lösung 1 resuspendiert und für 25 min auf Eis inkubiert. Dann wurden je 4 ml Plasmidlösung 2 hinzugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Nun wurden je 3 ml Plasmidlösung 3 hinzupipettiert und für 25 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert und der Überstand in frische Zentrifugenröhrchen überführt. Der Pellet wurde verworfen. In den Überstand wurden 1 ml 3 molare Na-Ac-Lösung, sowie je 25 ml absoluter Ethanol pipettiert. Gefällt wurde über Nacht bei -20 °C, danach bei 13.000 Upm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Pellet mit 2 ml Plasmid-Lösung 4 resuspendiert. Nun wurden 0,5 ml 3 molare Na-Ac-Lösung, sowie 12,5 ml absoluter Ethanol hinzugegeben und über Nacht bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde bei 13.000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen, der resultierende Pellet in 1 ml 10 mM Tris-Lösung resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.5.2 Pilztransformation/Transformation von *Penicillium*: Um eine Transformation an Pilzzellen durchzuführen, muss zuerst deren Zellwand entfernt werden. Auf diese Weise erhält man „kompetente“ Protoplasten des zu transformierenden filamentösen Pilzes.

2.2.3.5.2.1 Herstellen von Protoplasten: Für Pilztransformationen wurden 7 Tage alte Vorkulturen des zu transformierenden Pilzes verwendet. Diese wurden als Schüttelkultur in Malz-Glucose-Flüssigmedium bei 25 °C inkubiert. Mit 1 ml

einer Vorkultur wurde dann ein Schikanekolben mit 1,2 M Hefe-Sorbitol-Agar angeimpft und die Suspension für 48 Std bei 25 °C inkubiert. Danach wurde das Myzel abfiltriert. 2 g des Myzels wurden in einen 50 ml Erlenmeyerkolben mit 9 ml osmotischen Mediums (KCl 1,2 M) gegeben. Nun wurde Lyse-Enzym von *T. harzianum* hinzugegeben, um die Zellwand des filamentösen Pilzes zu degradieren. Hiernach wurden 75 µl β-Glucuronidase hinzupipettiert und das Myzel mit dem Lyseansatz für 2 Std bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit liegen die Pilzzellen als Protoblasten, also ohne Zellwand vor. Die Protoplasten wurden mikroskopisch auf gleichmäßige Morphologie untersucht, mittels Thomazählkammer auf eine Zelldichte von 10⁹/ml eingestellt und über Glaswolle in ein steriles 5 ml Glasröhrchen abfiltriert. Die Lösung wurde zu je 400 µl in 1.5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert und 800 µl 1,2 M KCl hinzugegeben. Sodann wurde bei 4.000 Upm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 25 µl 1,2 M KCl resuspendiert.

2.2.3.5.2.2 Protoplastentransformation: Zu 100 µl der Protoplasten-Suspension wurden 10 µl der zu transformierenden, restriktiv geschnittenen Plasmid-DNA (5 µg/µl) pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei RT, wurden 800 µl PEG-Lösung (Polyethylenglycol) hinzugegeben, unter Invertieren 20 min bei RT inkubiert und dann 5 min bei 8.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Pellet in 1 ml MEBS-Medium (Hefeextrakt-Sorbitol-Agar, 1,2 M, pH 5,6) resuspendiert und bei einer für den jeweiligen Pilz optimalen Temperatur für 8 Std inkubiert. Nach dieser Regenerationsphase, wurden jeweils 100 µl der MEBS-Protoplastensuspension in ein auf 50 °C vortemperiertes 5 ml Reagenzglas überführt, auf eine Basis-Agarplatte abgegossen und bis zum Wachstum der primären Pilz-Transformanten bei entsprechender Temperatur inkubiert. Sporen dieser primären, heterozygoten Transformanten wurden dann auf Selektivmedium überimpft (Hefeextrakt-Sorbitol-Softagar mit Hygromycin 200 µg/ml), um homozygote Transformanten zu erhalten.

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung und Validierung des Mikroarrays „Mycochip“:

3.1.1 Auswahl der Gensequenzen und Primerpaare: Die Entwicklung eines DNA-Chips für Transkriptionsanalysen erfordert zunächst die Auswahl der notwendigen Gensequenzen. Diese wurden über frei zugängliche Datenbanken ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), die Gene der Ochratoxinbiosynthese ausgenommen. Da auf den Array jedoch nur kleine Abschnitte dieser Sequenzen immobilisiert werden, mussten Bereiche von 60-80 bp aus jeder Gensequenz ausgewählt werden. Allgemein kann gesagt werden, dass eine kürzere Sondensequenz zu einer spezifischeren, jedoch weniger sensitiven Hybridisierungsreaktion führt. Allerdings ist es schwierig bei kurzen DNA-Sequenzen möglichst ähnliche Schmelztemperaturen und somit auch Hybridisierungseigenschaften zu generieren. Hierbei führen längere, 300-500 bp umfassende Sondenfragmente, zu einer unspezifischeren aber sensitiveren Hybridisierung. Zudem sind die thermodynamischen Unterschiede bei längeren Fragmenten vernachlässigbar. Nachteil ist die Gefahr von Kreuzhybridisierungen und die mangelhafte Diskriminierungsmöglichkeit zwischen Genen mit hoher Homologie. Bei der Auswahl der Primerpaare musste darauf geachtet werden, dass die Amplifikate das jeweilige Gen spezifisch und sensitiv detektieren. Aus diesem Grund mussten homologe oder stark konservierte Bereiche vermieden werden, damit es möglichst zu keinen Kreuzhybridisierungen zwischen den Genen der verschiedenen Spezies kommt. Eine solche Auswahl konnte über direkte Sequenzvergleiche erfolgen. Danach wurden die erforderlichen PCR-Reaktionen durchgeführt und die Amplifikate anschließend mit H₂O auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

3.1.2 Ausarbeitung eines Layouts für den „Mycochip“: Nach Auswahl der Gene und Sequenzen der entsprechenden Mykotoxinbiosynthesewege, musste ein anwendungsoptimiertes Layout für die Programmierung des Spottersystems

ausgearbeitet werden. Das Layout des Mikroarray in der bisher 4. Generation wurde so ausgelegt, dass mit diesem die Expression aller lebensmittelrelevanten Mykotoxingene analysiert werden kann. Die verwendeten Sequenzabschnitte dieser Gene (Tabelle im Anhang) sind auf dem DNA-Chip nach der physiologischen Reihenfolge im jeweiligen Biosyntheseweg angeordnet, so dass eine Mustererkennung bei der Aktivierung der Gene erleichtert wird. Der Prototyp enthielt die Gene der Ochratoxinbiosynthese von *Penicillium nordicum* (Geisen, Schmidt-Heydt und Karolewicz, 2006), außerdem die Gene der Aflatoxinbiosynthese von *Aspergillus flavus* (Yu *et al.*, 2004), die Gene der Trichothecenbiosynthese vom Typ A von *Fusarium sporotrichioides* (Alexander *et al.*, 2004), sowie die Gene der Fumonisinbiosynthese von *Gibberella moniliformis* (Proctor *et al.*, 2003). Wie sich zeigte sind die Gene der Trichothecenbiosynthese innerhalb der *Fusarium*spezies sehr ähnlich, so dass die verwendeten Oligonukleotide aus Gensequenzen von *F. sporotrichioides* auch für Hybridisierungsexperimente mit DNA von *F. culmorum* und *F. graminearum* verwendet werden konnten. Der Prototyp wurde über mehrere Stufen optimiert, sowie den experimentellen Fortschritten angepasst. So wurden Oligonukleotide mit ineffizienten Hybridisierungsaffinitäten substituiert oder ersatzlos entfernt. Des Weiteren wurden neu gefundene Gene der Ochratoxinbiosynthese hinzugefügt, z.B. von *Penicillium verrucosum* das *otapksPV* Gen (Schmidt-Heydt *et al.* 2007d *submitted*), welches für die Polyketidsynthese der Ochratoxin A Biosynthese kodiert, außerdem die Gene der Trichothecenbiosynthese vom Typ B von *Gibberella zeae* (Kimura *et al.*, 2003) (Teleomorph von *Fusarium graminearum*). Zusätzlich wurden offene Leseraster, so genannte „open-reading-frames“ integriert von noch nicht näher charakterisierten Genen von *Penicillium*. Diese stammten aus der einleitend beschriebenen DDRT-PCR. Der Mikroarray ist nicht als finales Monitoringsystem gedacht sondern vielmehr als offenes System, so dass er für alle relevanten Mykotoxine, deren genetischer Hintergrund bekannt ist, einsetzbar ist und den neusten wissenschaftlichen Erkenntnissen und Aktualisierungen angepasst werden kann. Das Layout des aktuell verwendeten

Mikroarrays wurde jeweils in vier Replikaten gespottet und ist wie folgt aufgebaut:

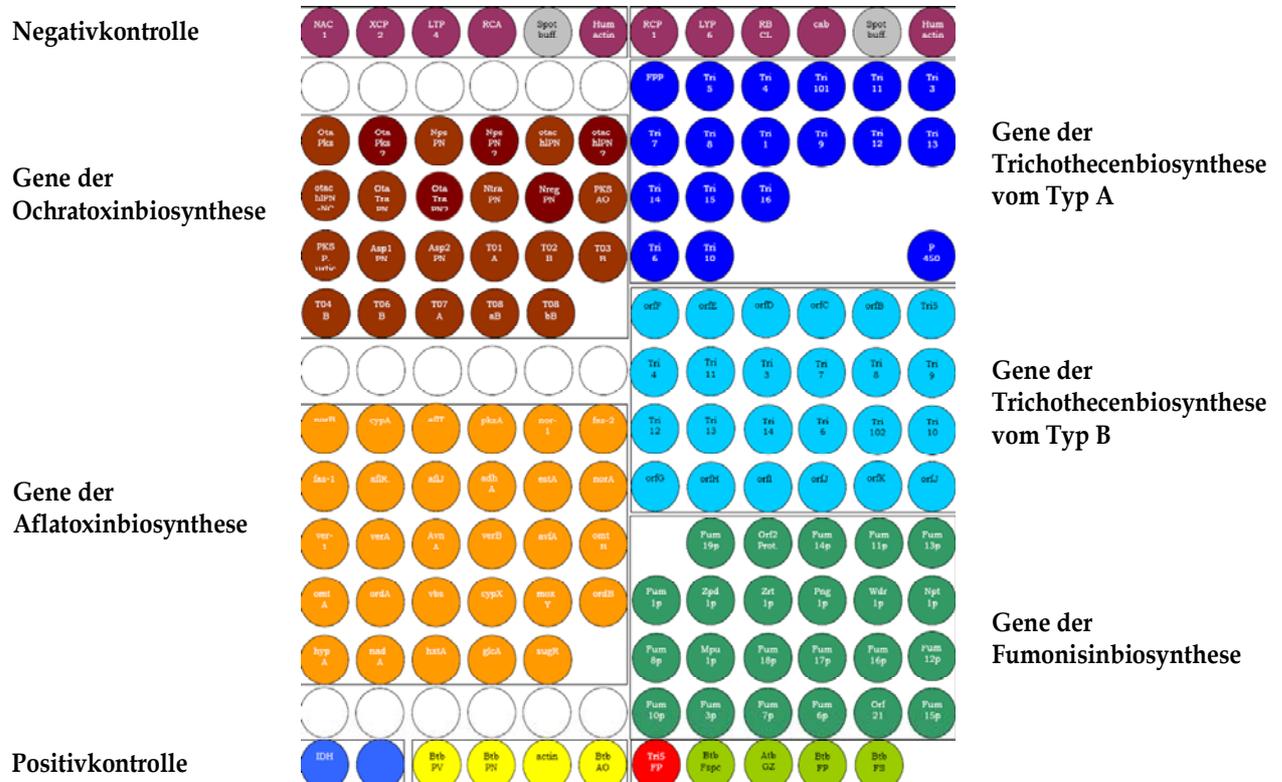


Abb. 16: **Layout des Mycochip in der 4. Generation.** Die Gene der Biosynthesecluster aller wichtigen, lebensmittelrelevanten Mykotoxine wurden entsprechend ihrer Reihenfolge im Biosyntheseablauf auf dem Array angeordnet. Dieses Layout wurde jeweils in 4-facher Wiederholung gespottet.

3.1.3 Auswahl eines geeigneten Bindesubstrates: Für die Herstellung der Mikroarrays wurden gewöhnliche Glasobjektträger verwendet. Damit die DNA auf diesen dauerhaft immobilisiert werden kann, müssen diese jedoch mit einem DNA-bindenden Substrat beschichtet sein. Bezüglich der Bindeeffizienz zeigten sich Glasobjektträger der Firmen Scienion und Peqlab (Nexterion slide E) mit Epoxidbeschichtung als geeigneter im Vergleich zu Objektträgern, die mit Aminosylan-, oder Aldehyd-Substrat beschichtet waren. Die verwendeten PCR-Produkte mussten bei Epoxidbeschichtung nicht zuvor mit Aminolinkern versehen werden, was zeit- und kostenaufwändiger gewesen wäre. Außerdem können unmodifizierte PCR-Produkte durch deren exozyklische Aminogruppen

kovalent an das Substrat binden (Abb. 17). Den Ausschlag gab jedoch das wesentliche günstigere Signal-Rausch-Verhältnis der Epoxybeschichtung.

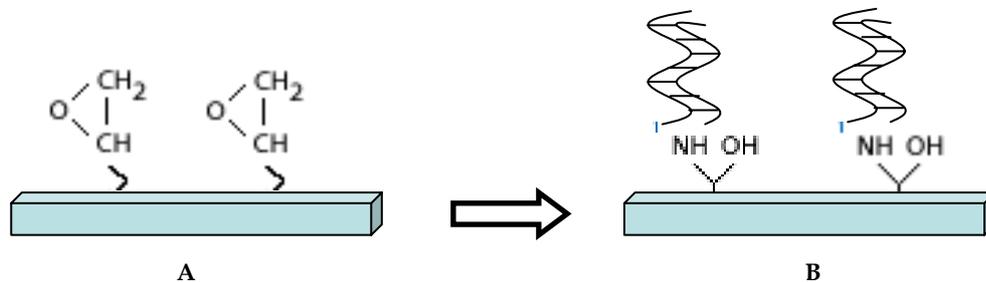


Abb. 17: **Beschichtung der Glasträger.** **A** Freie Epoxygruppen auf Glasobjektträger; **B** DNA-Addukte an Epoxygruppen gebunden.

3.1.4 Auswahl eines geeigneten Spott-Puffers für die Gensonden: Um ein optimales Binden der DNA-Sonde sowie eine reproduzierbare Qualität zu gewährleisten, musste ein geeigneter Druckpuffer ausgewählt werden. Zum Spotten der Amplifikate auf den beschichteten Glasobjektträger (Slide), wurden daher unterschiedliche Spottlösungen in Hinblick auf Bindungsstärke an das Arraysubstrat und Spotmorphologie getestet. Bei den eingesetzten epoxybeschichteten Glasträgern können Standardpuffer wie SSC oder auch Wasser verwendet werden. Es zeigte sich jedoch, wie auf Abbildung 18 dargestellt, dass im Vergleich zu H_2O dest., 3X-SSC und 50 % DMSO (Dimethylsulfoxid), bei Verwendung von DMSO 50 % eine signifikant erhöhte Binde- und Hybridisierungseffizienz erreicht werden konnte.

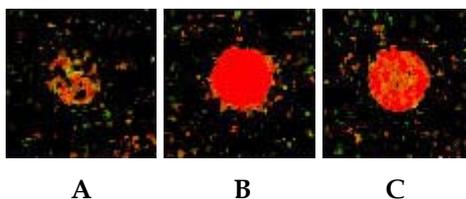


Abb. 18: **Mikroarrayhybridisierung von 3 Replikaten des *aspPN* Gens aus dem Ochratoxinbiosynthesecoluster.** Gespottet wurde das PCR-Produkt in H_2O gelöst, **A**; in 50% DMSO gelöst, **B**; in 3X-SSC Puffer gelöst, **C**. **B** zeigte die beste Spotmorphologie.

Der Vorteil bei der Verwendung von DMSO liegt bei dessen Denaturierungsfähigkeit, was zu den erforderlichen Einzelsträngen führt und eine bessere Bindung an das Slidesubstrat ermöglicht. Zudem verfügt DMSO

über hygroskopische Eigenschaften und hat nur einen relativ geringen Dampfdruck, was eine bessere Lagertauglichkeit der gelösten DNA-Proben erlaubt, ohne dass es zu einer nennenswerten Verdunstung kommt. Würde ein nichtdenaturierendes Agens als Spottingpuffer verwendet, müsste eine asymmetrische PCR durchgeführt werden (Überschuss an einem Primer), um eine möglichst große Anzahl an Einzelsträngen zu generieren.

3.1.5 Bestimmung der optimalen Druckbedingungen: Änderungen von Luftfeuchte und Temperatur im Spotter hatten einen signifikanten Einfluss auf die Spotmorphologie. Beste Ergebnisse konnten bei 25 °C und 60 % Luftfeuchte erzielt werden. Wurden Temperaturen außerhalb dieses Bereichs, oder auch geringere Luftfeuchten verwendet, kam es zum teilweisen Antrocknen der Proben an die Nadeloberfläche und so zu morphologisch unsauberem, kleinen Spots. Wurde die Luftfeuchte hingegen überschritten, so liefen die Spots ineinander. Die Proben (je 5 µl mit 1 µg/µl DNA) wurden in 96-Well Platten (Greiner) überführt, das eigentliche „Spotten“ erfolgte mittels feiner Nadelspitzen („splitted stealthpins“, Abb. 19) die eine Kavität aufweisen.

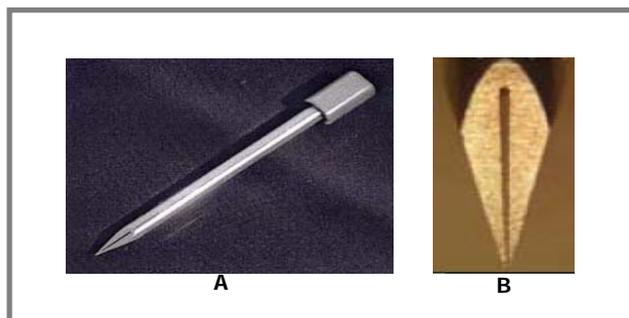


Abb. 19: **Verwendete Spotternadeln.** Split Pins, **A** Gesamtansicht; **B** Probenaufnahmebereich.

Durch die Kapillarkwirkung nehmen diese ein definiertes Probenvolumen von 0,25 µl auf und geben es an die Glasoberfläche des Chips während des Spottvorganges wieder ab.

Die generelle Vorgehensweise bei der Herstellung von Mikroarrays und die nachfolgende experimentelle Durchführung soll durch folgende Abbildung veranschaulicht werden:

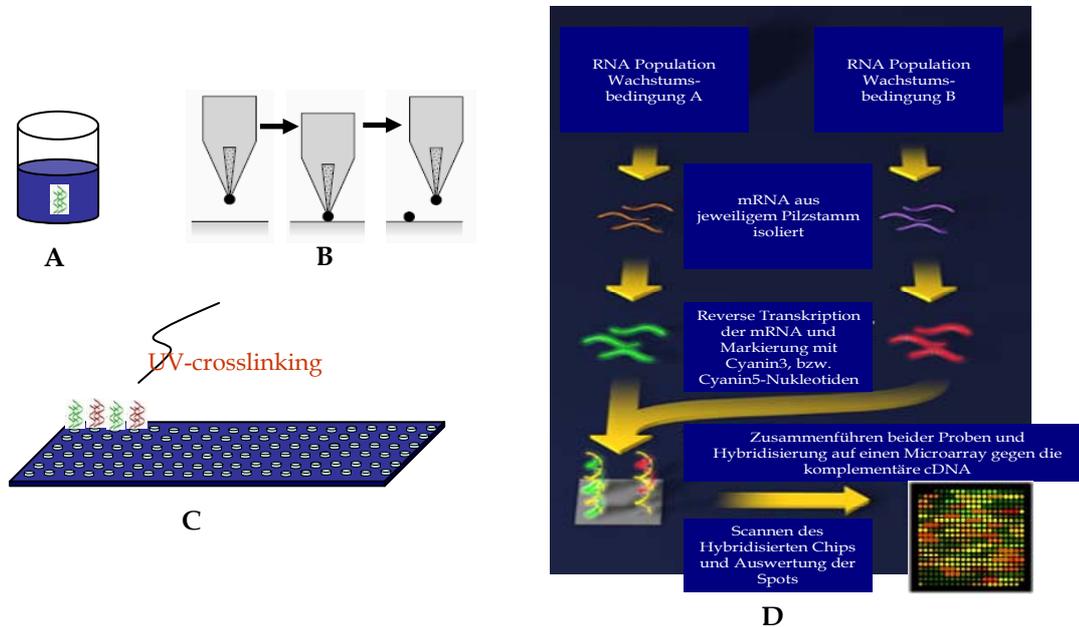


Abb. 20: Schema der Vorgehensweise bei der Herstellung und Anwendung des DNA-Chips. Die in Lösungsmittel eluierte Sonden-DNA (A) wird durch einen Nadelspotter mittels Kontakt-Spotting-Verfahren (B) auf einem mit einer Bindematrix beschichteten Glasträger (C) immobilisiert. Das cDNA Target, welches meist aus reziproken Proben mit unterschiedlicher Markierung besteht, wird gegen die Sonden des DNA-Chips hybridisiert (D).

3.1.6 Weitere Postprozessierungsschritte zur Optimierung: Nach dem Spotten wurden die Slides in einer Feuchtekammer aus Styropor für 1 Stunde bei 60 °C und > 90 % Luftfeuchte inkubiert um die Spotmorphologie zu optimieren. Die zu diesem Zweck entwickelte Kammer war wie folgt konstruiert:

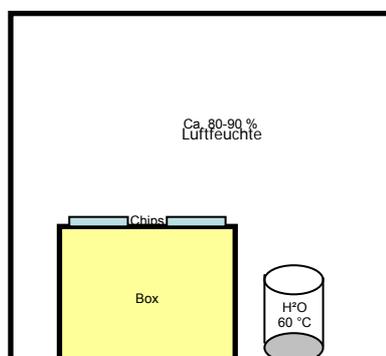


Abb. 21: Schema der verwendeten Feuchtekammer. Eine Feuchtekammer aus Styropor wurde zur Optimierung der Spotmorphologie nach dem Spottvorgang verwendet. Durch ein Glas mit erhitztem Wasser wurden gewünschte Luftfeuchte und Temperatur innerhalb der Box eingestellt.

Nach dem Trocknen der Slides wurde eine kovalente, dauerhafte Fixierung der Nukleinsäuren an das Arraysubstrat erreicht, indem mit UV-Licht (800 mJ) so

genanntes „Crosslinken“ der DNA erfolgte. Durch das UV-Licht werden die Thyminreste der DNA aktiviert, die daraufhin mit den Epoxygruppen des Substrats reagieren.

3.1.7 Normalisierung der Hybridisierungsdaten: Die biologische Relevanz der erhaltenen Daten wurde mittels Real Time PCR anhand einzelner Gene validiert, außerdem wurden umfangreiche Normalisierungsmaßnahmen durchgeführt. Dies zum einen durch reziproke Markierung der Proben, zum anderen durch das Spotten mehrerer Replikate jeden Gens auf den Array, sowie eine Filterung der Daten durch Berechnung des Median abzüglich der Arrayspezifischen Hintergrundwerte. Als Normalisierungsinstrument wurde von Seiten der Software der LOWESS – Algorithmus (locally weighted scatter blot smoother) angewendet, also eine Art lokale Regressionsglättung der Daten. Hierbei wurden durch Modifizierung der Laserstrahlintensität des entsprechenden Kanals zuerst die Intensitätswerte des roten und grünen Kanals aneinander angepasst. Eine solche Anpassung war notwendig, da die Cyaninfarbstoffe molekülbedingt eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität aufweisen. Dies wurde über eine Signal-Mittelwertberechnung erreicht, bei der ein Korrekturfaktor aus dem Verhältnis der Gesamtsignalintensitäten beider Farbkanäle berechnet wird. Durch die nachfolgende Anwendung des LOWESS-Algorithmus konnten Variationen des Hybridisierungssignals innerhalb eines Arrays korrigiert werden, die z. B. durch Schwankungen der Hybridisierungsbedingungen verursacht werden können.

Nachfolgende Abbildung (22) zeigt beispielhaft einen so genannten Scatterplot, wobei die roten Signalpunkte oberhalb der Mittellinie jeweils Gene kennzeichnen, die in der dargestellten Probe hochreguliert waren, wohingegen Gene unterhalb dieser Linie herabreguliert waren. Ein Komposit der beiden Signale fungiert hierbei als Referenz.

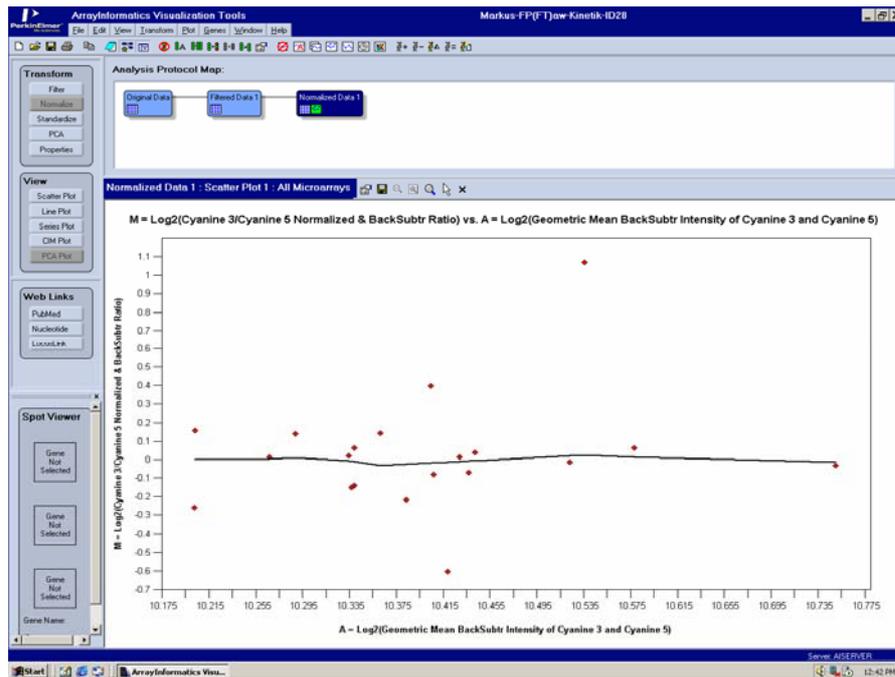


Abb. 22: **Beispiel eines Scatterplots aus einem Mikroarrayexperiment.** Die roten Punkte kennzeichnen jeweils Gene die im Vergleich zur Referenzprobe hochreguliert waren (oberhalb der schwarzen Linie), bzw. herunterreguliert (unterhalb der Linie). Es wurde in diesem Fall mit den logarithmierten Medianwerten gearbeitet abzüglich der Hintergrundwerte.

Abbildung 23 verdeutlicht die unterschiedliche Signalintensitätsverteilung der beiden Fluorophore. Diese musste bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden und beruht auf deren unterschiedlichen Absorptionsverhalten.

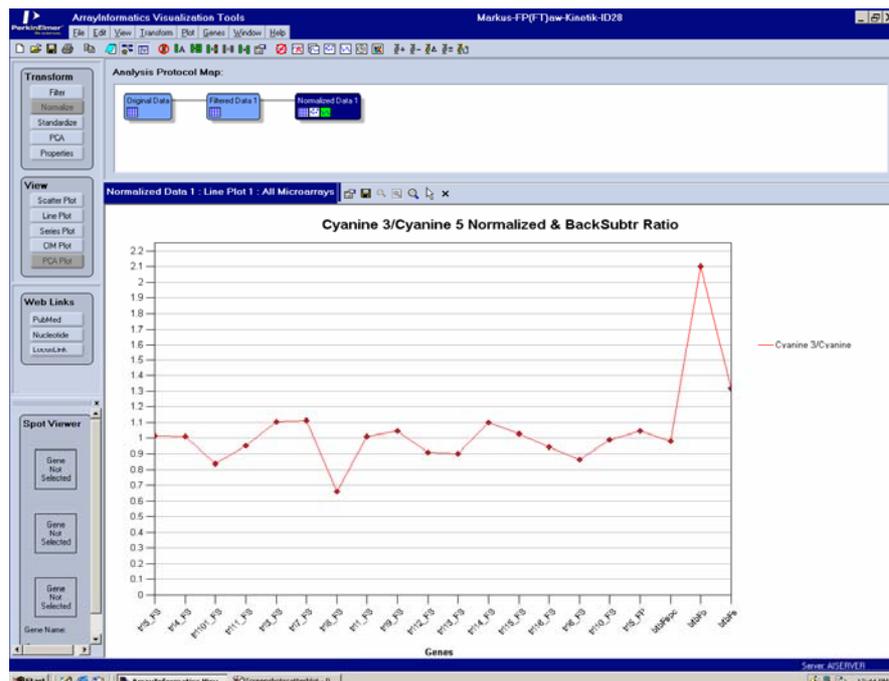


Abb. 23: **Signalverteilungsdiagramm.** Beispiel der Intensitätsverteilung der Signalwerte von verschiedenen Genen bei Markierung mit Cyanin5, bzw. Cyanin3.

Die folgende Abbildung (24) zeigt einen Cim-Plot. Die einzelnen Gene sind hier tabellarisch mit der jeweiligen Signalintensität des entsprechenden Kanals aufgeführt.

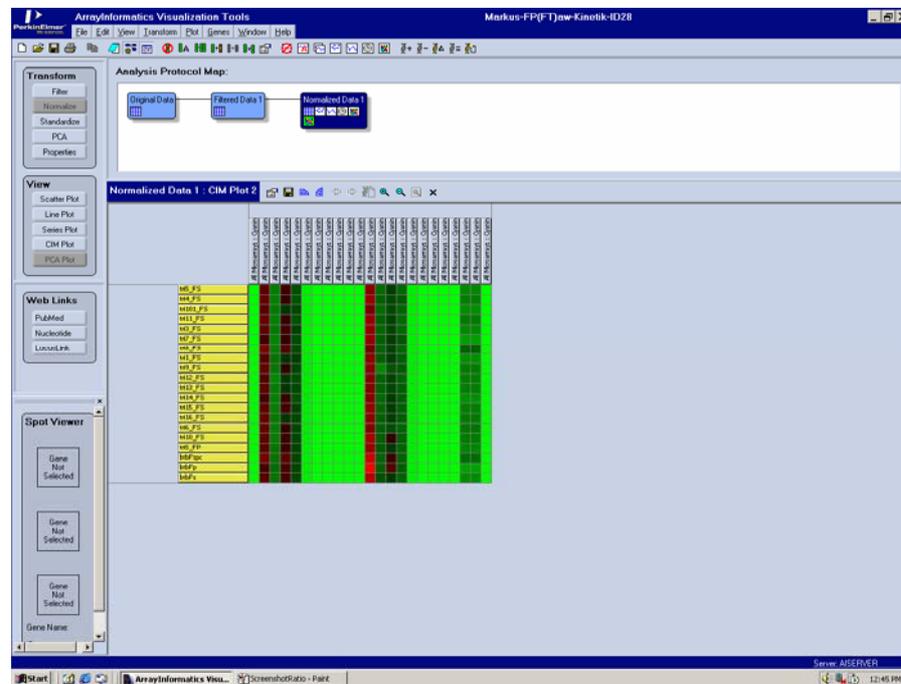


Abb. 24: **Beispiel eines CIM-Plots.** Die einzelnen Gene sind tabellarisch gegen die Markierung angeordnet. Rote Quadrate zeigen die Hybridisierung eines Gens im Cyanin5-Kanal, Grüne hingegen eine solche im Cyanin3-Kanal. Die einzelnen Farbschattierungen spiegeln die Hybridisierungsintensität wieder.

3.2 Testen der Funktionalität des Mikroarray: Um Funktionalität und Spezifität der ausgewählten Gensonden zu überprüfen, wurde jeweils mit der RNA des zu analysierenden Schimmelpilzstammes eine Hybridisierung durchgeführt. Dieser war entsprechend unter Bedingungen inkubiert worden, die die Toxinbiosynthese fördern.

Wie auf folgender Abbildung (Abb. 25, A-D) zu sehen ist, kam es zu keinen signifikanten Kreuzhybridisierungen zwischen der cDNA des untersuchten Schimmelpilzstammes und den Oligonukleotidsonden der anderen Biosynthesecluster auf dem DNA-Chip. Nur die Gene des jeweils hybridisierten Pilzstammes zeigten ein positives Signal mit den Genen des entsprechenden

Mykotoxinclusters. Wurde der eingesetzte Pilzstamm unter Bedingungen inkubiert, die stark inhibierend bezüglich der Toxinbiosynthese waren, zeigten die Gene des dazugehörigen Mykotoxinclusters kein oder ein nur sehr schwaches Signal.

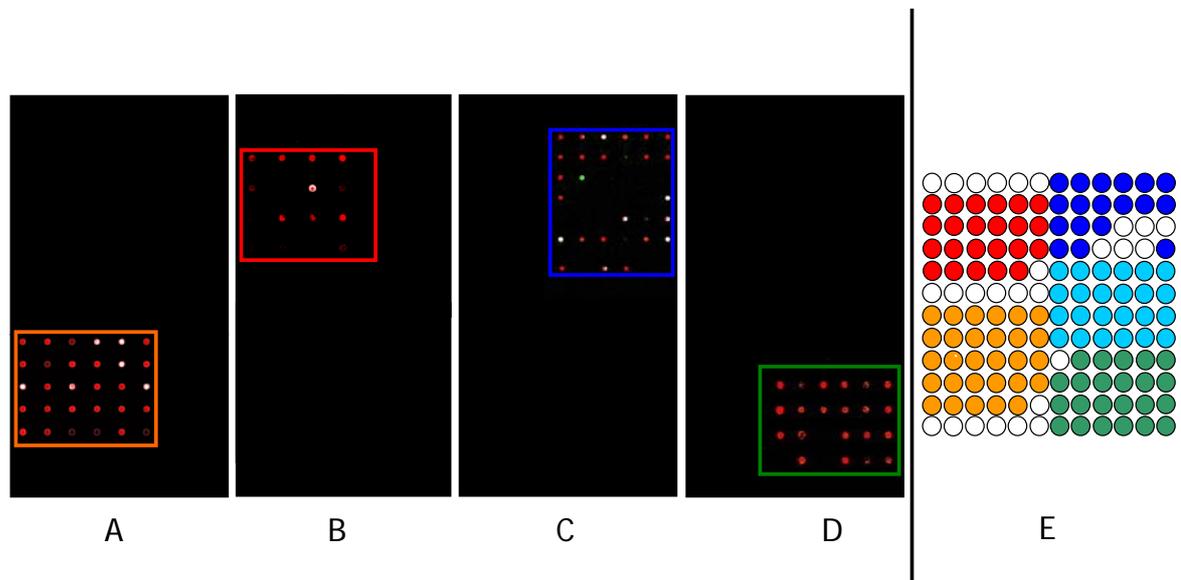


Abb. 25: **Spezifitätstest des Mycochip durch Hybridisierung mit verschiedenen Spezies.** Zu sehen ist die Expression des jeweiligen Toxinbiosyntheseclusters der verschiedenen Schimmelpilzspezies. Diese wurden zuvor unter Mykotoxinbildungsbedingungen inkubiert. **A:** Aflatoxincluster *Aspergillus flavus*; **B:** Ochratoxincluster *Penicillium nordicum*; **C:** Trichothecencluster Typ A *Fusarium sporotrichioides*, Typ B *Gibberella zeae*; **D:** Fumonisingencluster *Gibberella moniliformis*; **E:** Schematisches Mikroarraylayout.

Für die Genexpressionstests wurden die Pilzstämme jeweils auf folgenden, die Toxinbiosynthese fördernden Nährmedien wachsen gelassen. Für **(A)** BFE96, *Aspergillus flavus* war dies YEP- Medium (Yeast Extract Peptone) bei 30 °C für die Dauer von 5 Tagen. Für den Test der Ochratoxinoligonukleotide wurde BFE487, *Penicillium nordicum* 5 Tage bei 25 °C auf YES-Medium angezüchtet **(B)**, und für den Spezifitätstest der Trichothecenclustergene wurde *Fusarium sporotrichioides* verwendet und dieser für 5 Tage auf YES-Medium bei 25 °C inkubiert **(C)**. Im Fall des Fumonisinclusters wurde der Hybridisierungstest mit *Gibberella moniliformis* auf Malz-Glucose-Agar durchgeführt nach 5 Tagen Wachstum bei 25 °C **(D)**.

3.3 Anwendung des Mycochip für verschiedene Fragestellungen: Da der Mikroarray die gewünschten Anforderungen erfüllte, konnte er für die weiteren Fragestellungen eingesetzt werden. Wie einleitend beschrieben, ist die Biosynthese von Mykotoxinen in ihrer Ausprägung durch verschiedene Faktoren beeinflussbar. Erkenntnisse über den Einfluss dieser Faktoren auf die Transkription von Mykotoxinbiosynthesegenen können die Ausarbeitung von Vermeidungsstrategien zum Beispiel bezüglich der Lagerung von Lebensmitteln ermöglichen. Im weiteren Verlauf wurden folglich verschiedene Einflussfaktoren untersucht.

3.3.1 Einfluss des Substrats auf Genexpression und Mykotoxinbiosynthese in *Fusarium culmorum* und *Penicillium verrucosum*: Um den Einfluss des Substrats auf die Toxinbiosynthese zu untersuchen, wurde exemplarisch ein Vertreter typischer pathogener Feldpilze ausgewählt, *F. culmorum*, ein Deoxynivalenolbildner, sowie als typischen Lagerpilz *P. verrucosum*, ein Ochratoxin A -bildner.

3.3.1.1 Einfluss des Substrats in *Fusarium culmorum*: Zur Ermittlung von Substrateffekten auf *F. culmorum* wurde dieser jeweils auf unterschiedlich zusammengesetzten Medien (Minimalmedium, Vollmedium, Lebensmittelmodellmedium) bei 25 °C inkubiert. Als Vollmedium wurde das Standardlabormedium, YES, verwendet sowie als Lebensmittelmodellmedium Mais, ein natürliches Habitat simulierend. Beide Medien fördern die Mykotoxinbildung. Als Minimalmedium wurde MGA-Medium eingesetzt, welches die Biosynthese in *Fusarium* reprimiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und aus dem Myzel die RNA isoliert. Eine RNA Population wurde in der Regel mit einer RNA-Population verglichen, die unter anderen Wachstumsbedingungen erhalten worden war.

Abbildung 26 zeigt einen signifikanten, substratabhängigen Unterschied in der Expression der Mykotoxingene in *F. culmorum*:

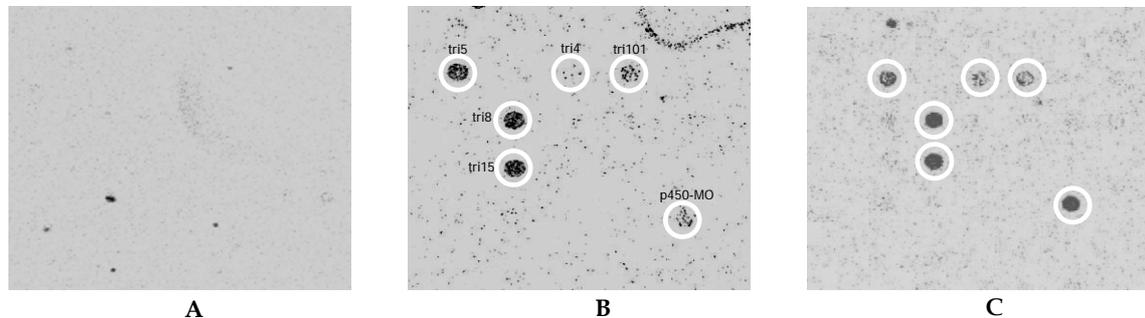


Abb. 26: **Substratspezifische Mikroarray Expressionsanalyse in *Fusarium*.** Analyse des Trichothecenclusters in *F. culmorum* nach Wachstum auf verschiedenen Medien. **A**, die Toxinbildung inhibierendes Medium MAG; **B**, förderndes Medium Mais; **C**, förderndes Labormedium YES. Das typischerweise auftretende Induktionsmuster (weiß umrandet) indiziert eine aktive Toxinbiosynthese.

Wie deutlich erkennbar ist, war die Expression der Trichothecenbiosynthesegene auf dem inhibierenden MGA-Medium nicht messbar. Anders verhielt es sich hingegen bei Wachstum von *F. culmorum* auf Mais-Medium und YES-Medium. Auf diesen konnte die Expression der Trichothecengene *tri5*, *tri8*, *tri15*, *tri4*, *tri101*, sowie einer Cytochrom-p450-monooxygenase detektiert werden. Mittels Dünnschichtchromatographie konnte die Biosynthese des Trichothecens Deoxynivalenol in den Proben semiquantitativ nachgewiesen werden (Abb. 27).

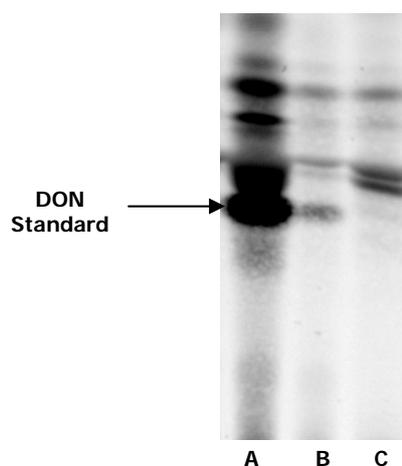


Abb. 27: **Substratspezifische DC-Analyse in *Fusarium*.** Dünnschichtchromatographie nach Extraktion des Mykotoxins DON (Deoxynivalenol) aus dem jeweiligen Medium, welches mit *Fusarium culmorum* inokuliert und 30 Tage bei 25 °C inkubiert worden war. **A**: YES Medium; **B**: Mais-Medium; **C**: MAG-Medium.

Um mediumsspezifische Unterschiede bezüglich des Genexpressionsverlaufs im Rahmen einer Kinetik zu analysieren, wurde *F. culmorum* auf Labormedium (YES) sowie Lebensmittelmodellmedium (Mais) angezchtet und bei 25 °C für 5 –

30 Tage inkubiert. Nach jeweils 5, 10, 20 und 30 Tagen wurden Proben genommen, aus dem Myzel die jeweilige RNA isoliert und gegen den Mikroarray hybridisiert. Das Ergebnis der Analyse war wie folgt (Abb. 28):

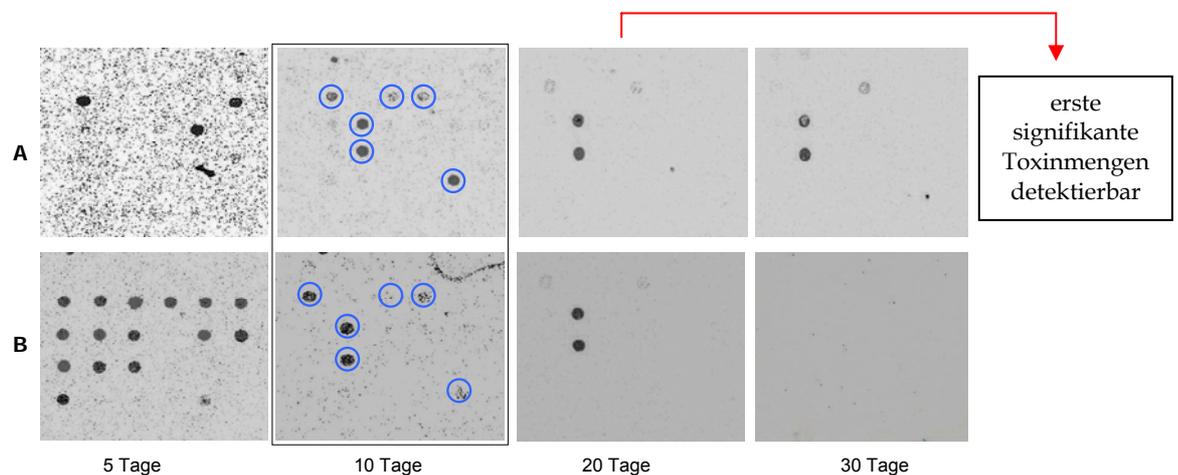


Abb. 28: **Mikroarray Genexpressionsanalyse in *Fusarium culmorum***. Expression der Gene des Trichothecenbiosyntheseclusters nach 5-30 Tagen Inkubation bei 25 °C auf den Medien YES (A) und Mais (B).

Wie auf Abbildung 28 ersichtlich, kam es auf dem YES-Medium nach einem moderaten Anstieg der Genexpression, am Tag 10 zu einem so genannten Induktionsmuster. Induktionsmuster wird im Folgenden das Auftreten einer Reihe bestimmter hochexprimierter Gene genannt, die indikativ für eine nachfolgende Mykotoxinbiosynthese war. Erst ab Tag 20 ließ sich Toxin in nennenswerten Quantitäten nachweisen. Während das indikative Muster also erst prädiktiv am 10. Tag auftritt, korreliert es schwächer werdend zum Tag 20 mit der dann aktiven Toxinbiosynthese. Im Lebensmittelmodellmedium Mais kam es anfänglich zu einer Vollinduktion des gesamten Genclusters. Dieser regulierte sich zwischen Tag 5 und Tag 10 auf das Niveau der Expression auf YES-Medium ein, woraufhin es ebenfalls zur Ausbildung des Induktionsmusters am Tag 10 kam. Auch hier war eine signifikante Toxinbiosynthese erst ab dem 20. Tag detektierbar. Nach 20 Tagen wurden die Gene auf Maismedium nicht mehr exprimiert, bzw. waren unter die Sensitivitätsgrenze des Mikroarrays herabreguliert. Es ließ sich beobachten, dass die Expression der Toxinbiosynthesegene auf natürlichem Medium wesentlich stärkeren

Expressionsschwankungen unterworfen war im Vergleich zum Laborvollmedium YES. Um zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen der Expression von Toxinbiosynthesegenen und der tatsächlichen Toxinbildung besteht, wurde mittels Dünnschichtchromatographie der jeweilige Ansatz auf die gebildete Menge Deoxynivalenol überprüft (Abb. 29):

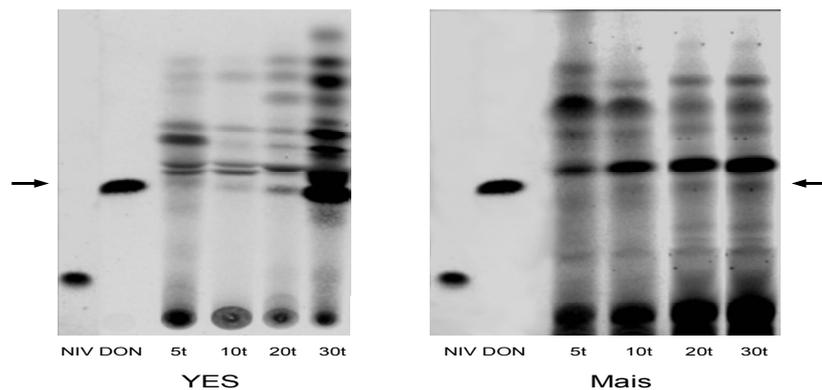


Abb. 29: DC Analyse in *Fusarium*. Dünnschichtchromatographie der Toxinextraktion von *Fusarium culmorum* nach Inkubation von 5-30 Tagen bei 25 °C auf YES- und Mais-Medium jeweils mit Standard für Nivalenol und Deoxynivalenol (Pfeil).

Wie auf Abbildung 29 deutlich wird, wurde auf Labormedium YES eine quantitativ größere Menge an Toxin gebildet im Vergleich zum Lebensmittelmodellmedium Mais. Besonders zwischen Tag 20 und Tag 30 kam es auf YES Medium zu einem deutlichen Anstieg der Toxinkonzentration, wohingegen auf Mais-Medium nur eine moderate Steigerung erfolgte. Erste signifikante Mengen an Toxin konnten ungefähr 10 Tage vorher durch Messung der Transkription der Mykotoxingene vorhergesagt werden.

3.3.1.2 Einfluss des Substrats in *Penicillium verrucosum*: Um den Einfluss des Substrats auch in *P. verrucosum* zu untersuchen, wurde dieser auf einem speziell zu diesem Zweck entwickelten, moderat die Toxinbiosynthese hemmenden Medium KNO_3 , bzw. auf dem die Biosynthese stark fördernden Labormedium YES, bei 25 °C inkubiert und mittels Mikroarray die Expression der Gene des Ochratoxin A Biosyntheseclusters gemessen.

Folgendes Mikroarray-Expressionsprofil resultierte:

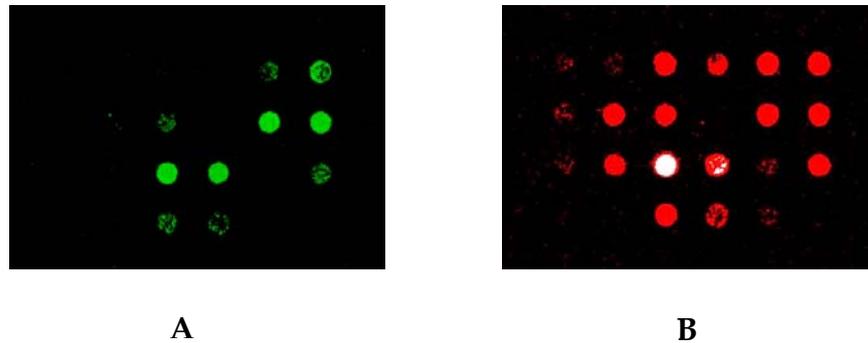


Abb. 30: **Substratspezifische Mikroarray Expressionsanalyse in *Penicillium*.** Mikroarray Expressionsprofil des Ochratoxin A Biosyntheseclusters in *P. verrucosum* nach Wachstum auf einem moderat die Toxinbiosynthese inhibierenden Medium **A** und einem stark fördernden Medium **B**.

Wie schon zuvor in *Fusarium* gemessen werden konnte, war auch in diesem Pilzstamm ein signifikanter Expressionsunterschied nach Wachstum auf den beiden, die Toxinbiosynthese unterschiedlich beeinflussenden Medien zu verzeichnen. Während auf dem moderat hemmenden Medium die Expression eher schwach ausfiel, war auf dem stark fördernden Medium eine starke Expression fast aller Gene des Biosyntheseclusters zu beobachten.

3.3.2 Analyse der differentiellen Genexpression in *Fusarium*: In nachfolgenden Versuchen, wurde die generelle Regulation der Mykotoxinbiosynthesegene in *Fusarium* analysiert. Um den zeitlichen Ablauf der Genexpression noch einmal für YES-Medium systematisch zu untersuchen, wurde eine Expressionskinetik durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurde dann der Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf diese Spezies analysiert.

3.3.2.1 Durchführung einer Genexpressionskinetik in *F. culmorum*: Biologisch begründet kann die Toxinbiosynthese erst beginnen, wenn zuvor die dafür notwendigen Gene induziert und transkribiert wurden. Naturgemäß kann also über eine Messung der Genexpression eine Toxinbildung angenommen, oder ausgeschlossen werden. Um diese Anwendungsmöglichkeit zu überprüfen und

um den Zeitabstand zwischen Geninduktion und beginnender Toxinbiosynthese zu verifizieren, wurde *F. culmorum* über einen Zeitraum von 29 Tagen bei 25 °C auf YES-Medium inkubiert und Expressionsanalysen bzw. Toxinbestimmungen durchgeführt. Die Vorkultur war hier 10 Tage alt. Da im Fall von *F. culmorum* unter anderen das *tri5*-Gen bei verschiedenen untersuchten Einflussfaktoren gut mit der Toxinbiosynthese korrelierte und zudem dessen Produkt sehr früh im Verlauf der Biosynthese von Deoxynivalenol benötigt wird, wurde es für diese Real Time PCR Expressionskinetik ausgewählt. Das Ergebnis zeigt folgende Abbildung (31):

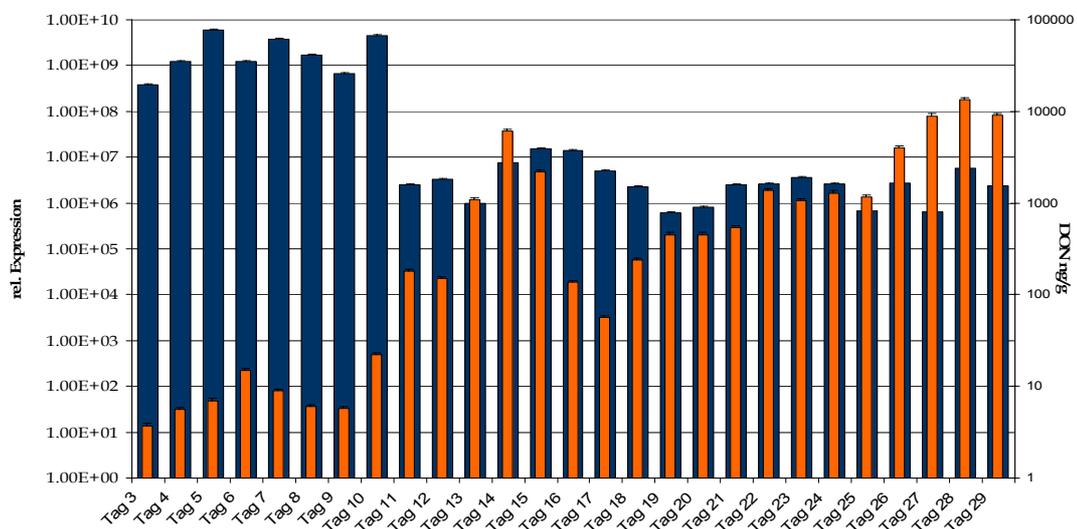


Abb. 31: Kinetik mit *F. culmorum* über 29 Tage, Real Time PCR und ELISA. Real Time PCR Genexpressionsanalyse des *tri5* Gens in *F. culmorum* über einen Zeitraum von 29 Tagen (blaue Balken) bei 25 °C mit parallel durchgeführter quantitativer ELISA Toxinanalyse (orangene Balken).

Interessanterweise zeigte die Expressionskinetik eine oszillierend ablaufende Induktion und Repression des *tri5*-Gens, in diesem Falle mit einer Amplitude von etwa 8 Tagen. Die Expression begann dabei auf einem relativ hohen Niveau zum Zeitpunkt der ersten Probenahme, sank dann aber bis zum Tag 29 immer weiter ab. Die Toxinbiosynthese lief bemerkenswerter Weise ebenfalls unregelmäßig ab und stieg bis zum 29. Tag immer weiter an. In diesem Fall wurden signifikante Mengen dauerhaft über 100 ng/g erst ab dem 10. Tag gebildet.

3.3.3 Einfluss äußerer Faktoren auf Genexpression und Mykotoxinbildung in *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum*: Die Transkription der Mykotoxinbiosynthesegene wird über Transkriptionsfaktoren reguliert. Diese existieren jeweils für unterschiedliche Einflüsse, die auf die Zelle einwirken. Sind die Auswirkungen der entsprechenden Einflussfaktoren auf dieses regulatorische Netzwerk bekannt, kann mittels gezielter Modifikation die Transkription der Biosynthesegene und somit die Toxinbiosynthese stark vermindert werden. In diesem Versuchsansatz sollte der Einfluss von pH, Temperatur und Wasseraktivität auf Wachstum, Genexpression und Mykotoxinbildung in den genannten Pilzstämmen untersucht werden. Diese Parameter wurden im Medium eingestellt und der Pilz unter möglichst konstanten Bedingungen inkubiert. Dann wurden Wachstum und gebildete Toxinmenge gemessen, sowie mittels Mikroarray Genexpressionsanalysen durchgeführt.

3.3.3.1 Einfluss des pH in *Fusarium culmorum*: Zum Zweck der näheren Untersuchung des pH-Einflusses auf *F. culmorum*, wurde dieser auf YES-Medium mit voreingestellten pH-Wert bei 25 °C inkubiert:

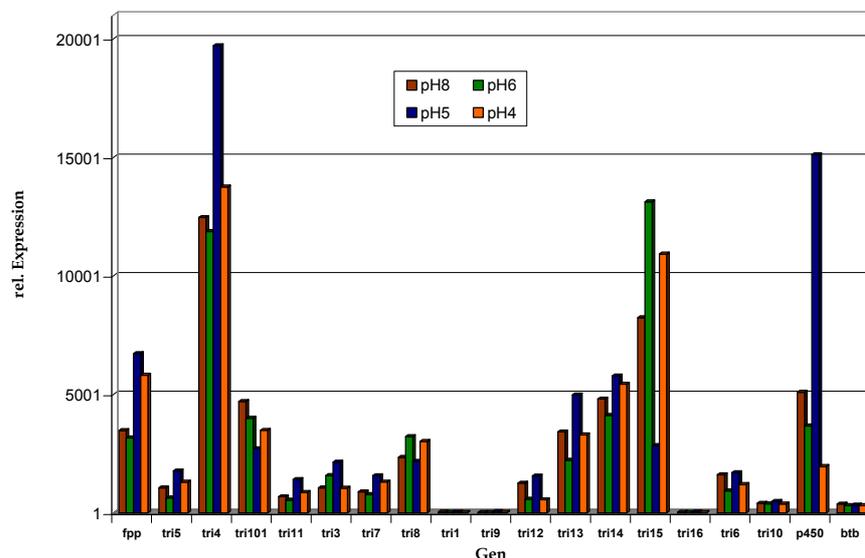


Abb. 32: Expressionsprofil der Mykotoxingene in *F. culmorum* bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Abbildung zeigt die relative Expression der Gene des Trichothecencusters. Die Inkubationstemperatur war 25 °C.

Wie auf Abb. 32 deutlich zu sehen ist, lag das Expressionsoptimum der meisten Gene des Trichothecengenclusters bei pH 5 (*fpp*, *tri5*, *tri4*, *tri11*, *tri3*, *tri7*, *tri12*,

tri13, *tri14*, *tri6* *tri10* und *p450*), jedoch waren zwei Gene stärker bei pH 6 exprimiert (*tri15*, *tri8*), bzw. bei pH 8 (*tri101*). Das interne Kontrollgen *Betatubulin* (*btb*) war vergleichsweise konstitutiv exprimiert. Ein weiterer Induktionspeak war bei einigen Genen des Biosyntheseclusters bei pH 8 zu beobachten. Bei der anschließend durchgeführten Toxin- und Wachstumsanalyse zeigte sich folgendes Bild (Abb. 33).

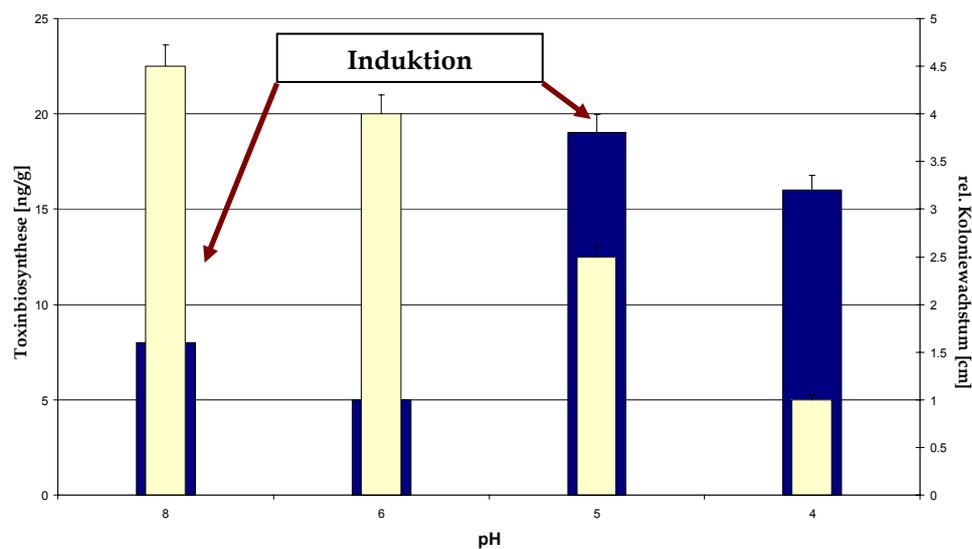


Abb. 33: **Wachstum und Toxinbiosynthese von *F. culmorum* bei verschiedenen pH-Bedingungen.** Der Deoxynivalenolgehalt der Proben wurde mittels ELISA bestimmt. Gelbe Balken entsprechen dem relativen Koloniewachstum, blaue Balken zeigen die Menge an gebildetem Toxin.

Die Biosynthese von Deoxynivalenol korrelierte mit der Expression eines Großteils der analysierten Gene des Trichothecenbiosyntheseclusters. Die relative Ausprägung der Expression der einzelnen Gene war dabei untereinander sehr unterschiedlich. So wurden beispielsweise die Gene *tri4*, *tri15*, sowie die Cytochrom-p450-Monooxygenase vergleichsweise stark exprimiert, wohingegen die Gene *tri1*, *tri9* und *tri16* eine kaum messbare Expression aufzeigten. Die optimalen Wachstumsbedingungen lagen interessanterweise eher im neutralen bis leicht alkalischen pH-Bereich, wohingegen Toxin vorzugsweise im leicht sauren Bereich synthetisiert wurde. *Tri1* kodiert für eine p450-Monooxygenase, *tri9* hat eine bis dato unbekannte Funktion, *tri16* kodiert für eine Acyltransferase.

Das Gen *tri4* war unter den für die Toxinbildung förderlichen Bedingungen relativ stark exprimiert und korrelierte sehr gut mit den Analysewerten der Toxinbildung. Interessanterweise trat bei pH 8, dem Genprofil entsprechend, eine weitere Erhöhung der Toxinbiosyntheseleistung auf im Vergleich zu pH 6.

3.3.3.2 Einfluss des pH in *Fusarium graminearum*: Im Vergleichsstamm *Fusarium graminearum* resultierte folgendes Ergebnis (Abb. 34):

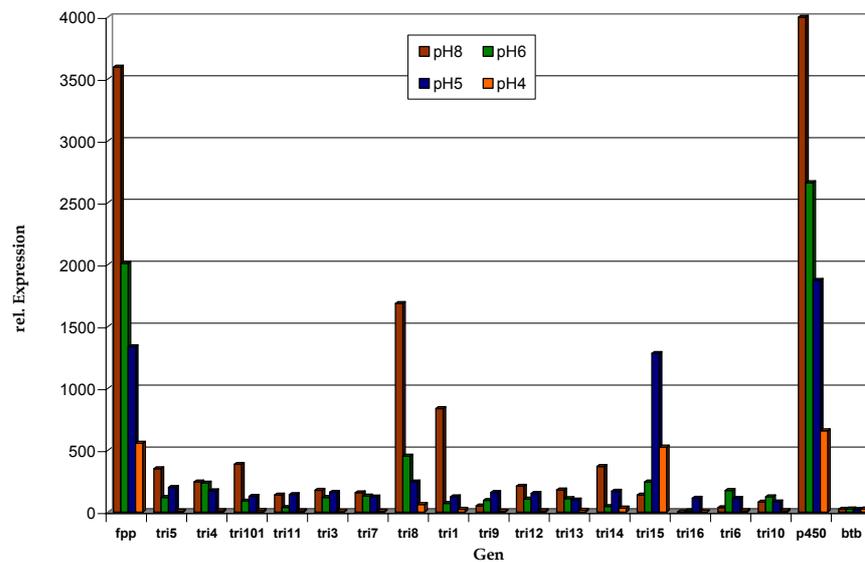


Abb. 34: Expressionsprofil der Mykotoxingene in *F. graminearum* bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Abbildung zeigt die relative Expression der Gene des Trichothecenclusters. Die Inkubationstemperatur war 25 °C.

Interessanterweise lag das Expressionsoptimum eines Großteils der Trichothecenbiosynthesegene von *Fusarium graminearum* bei pH 8 (*fpp*, *tri5*, *tri4*, *tri101*, *tri3*, *tri7*, *tri8*, *tri1*, *tri12*, *tri13*, *tri14*, *p450*), also im leicht alkalischen Bereich. Nur die Gene *tri11*, *tri9*, *tri16*, *tri15* und *tri10* hatten eine höhere Expressionsrate bei pH 5, bzw. pH 6. Außerdem waren alle Gene außer *fpp*, *tri8*, *tri1*, *tri15*, sowie *p450* insgesamt wesentlich schwächer exprimiert im Vergleich zu *F. culmorum* unter gleichen Bedingungen. Auch hier war das *p450*-Monoxygenasegen wieder sehr stark exprimiert.

Die Analyse der Proben auf gebildetes Deoxynivalenol führte bei diesem Stamm zu folgendem Ergebnis:

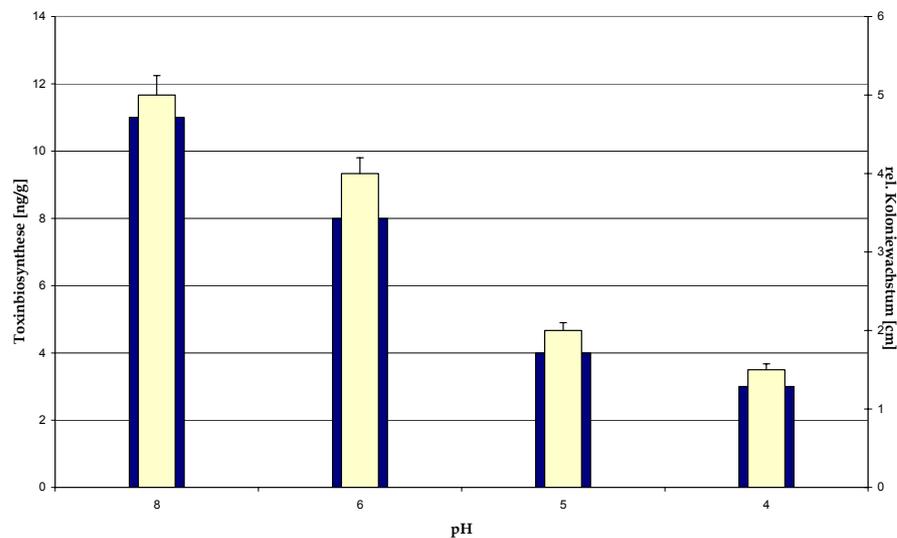


Abb. 35: **Wachstum und Toxinbiosynthese in *F. graminearum* bei verschiedenen pH-Bedingungen.** Der Deoxynivalenolgehalt der Proben wurde mittels ELISA bestimmt. Gelbe Balken entsprechen dem relativem Koloniewachstum, blaue Balken zeigen die Menge an gebildetem Toxin.

Auch hier korrelierte die Deoxynivalenolbiosynthese wieder mit einigen, jedoch nicht mit allen Genen des Trichothecenbiosyntheseclusters. Interessanterweise wurde durch diesen Stamm, entsprechend der Expression auf niedrigerem Niveau, nur knapp halb so viel Toxin gebildet im Vergleich zu *F. culmorum*. Außerdem war hier kein Nebenpeak im suboptimalen Bereich zu beobachten. Möglicherweise liegen die Bedingungen für eine sekundäre Induktion bei diesem Stamm in einem geringfügig verschobenen Bereich. Das optimale Koloniewachstum entsprach in diesem Fall dem Optimum der Toxinbiosynthese.

3.3.3.3 Einfluss der Wasseraktivität in *Fusarium culmorum*: Damit Pilzsporen auskeimen können und auch für das spätere Myzelwachstum, muss nicht nur der pH im Medium den physiologischen Erfordernissen des Organismus entsprechen, sondern auch eine bestimmte Menge frei verfügbaren, also ungebundenen Wassers vorhanden sein. Die frei verfügbare Wassermenge wird als Wasseraktivität bezeichnet, die als Quotient vom Dampfdruck des Wassers im Substrat zu dem entsprechenden Dampfdruck reinen Wassers definiert wird,

oder auch als relative Feuchte. Da Lebensmittel oft in Kühlräumen, Kellern oder Schränken gelagert werden und unter diesen Bedingungen häufig Kondenswasser, bzw. einer erhöhten Luftfeuchte ausgesetzt sind, wurde der Einfluss des Faktors Wasseraktivität auf Genexpression und Toxinbiosynthese untersucht. Der filamentöse Pilz wurde dazu auf YES-Medium mit voreingestellten a_w -Wert bei 25 °C inkubiert (Abb. 36).

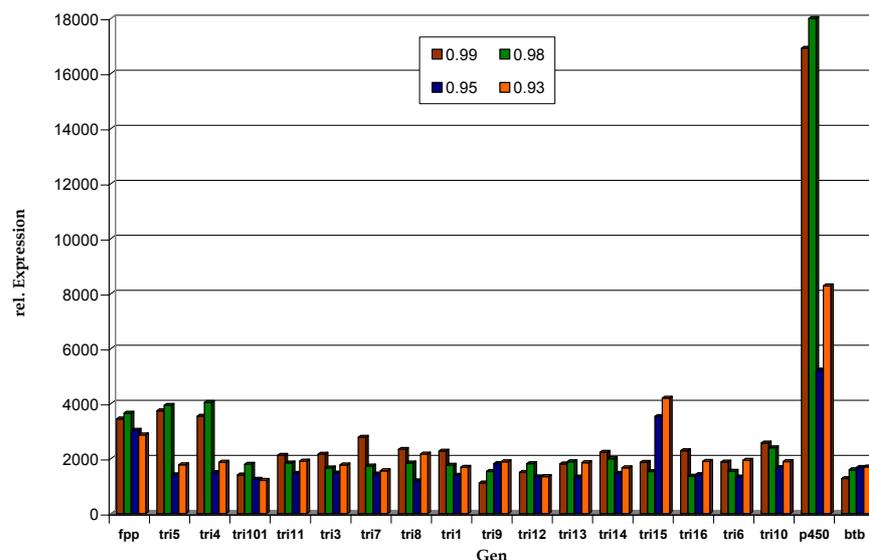


Abb. 36: Expressionsprofil der Mykotoxingene in *F. culmorum* bei unterschiedlicher Wasseraktivität. Die Abbildung zeigt die relative Expression der Gene des Trichothecenclusters. Die Inkubationstemperatur war 25 °C.

Wie aus den erhaltenen Daten ersichtlich, war die Expression von 7 Genen des Biosyntheseclusters bei einem a_w -Wert von 0.98, also 98 % frei verfügbaren Wassers, am ausgeprägtesten (*fpp*, *tri5*, *tri4*, *tri101*, *tri12*, *tri13*, *p450*), bzw. von 8 Genen bei einem a_w -Wert von 0.99 (*tri11*, *tri3*, *tri7*, *tri8*, *tri1*, *tri14*, *tri16*, *tri10*). Außerdem war bei nahezu allen Genen des Clusters ein weiterer Peak bei einer relativen Luftfeuchte von 0.93 auszumachen. Bei den Genen *tri9*, *tri6* und *tri15* lag dort sogar der Optimumpeak. Die Cytochrom-p450-Monooxygenase war auch hier sehr prominent exprimiert. Die restlichen Gene des Trichothecenbiosyntheseclusters wurden hingegen alle auf einem ähnlichen Niveau exprimiert. Bemerkenswert ist auch, wie unterschiedlich einige Gene reguliert waren im Vergleich zu den Expressionsdaten bei variierten pH-Werten. Waren dort die Gene *tri4*, *tri15* und *p450* überdurchschnittlich stark exprimiert und die

Gene *tri1*, *tri9* sowie *tri16* besonders schwach, fiel hier nur die Cyt-p450-Monooxygenase anhand ihrer Expressionsstärke besonders auf. Bei der Analyse auf gebildetes Deoxynivalenol fiel auf, dass hier bei einer Wasseraktivität von 0.98 auch am meisten Toxin produziert wurde, gefolgt von 0.99. Das Wachstumsoptimum lag hingegen bei einer Wasseraktivität von 0.99 (Abb. 37).

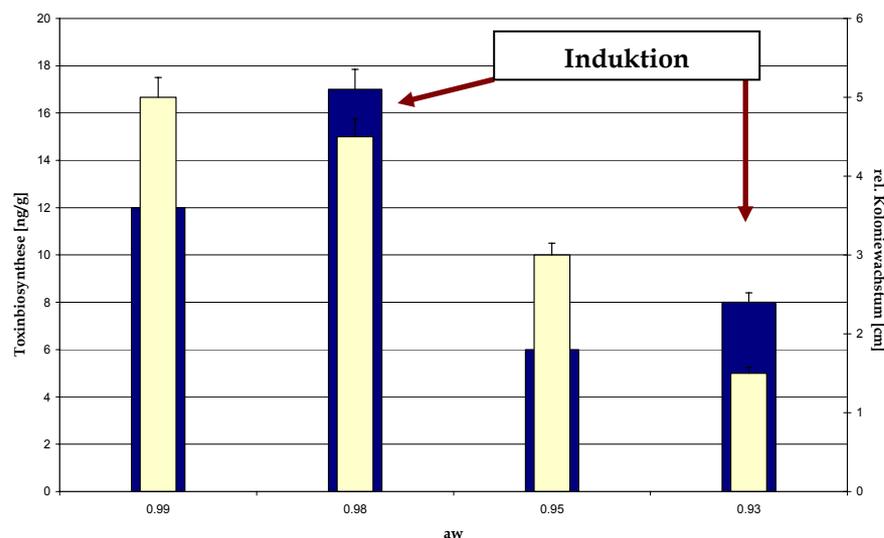


Abb. 37: Wachstum und Toxinbiosynthese in *F. culmorum* bei unterschiedlicher Wasseraktivität. Der Deoxynivalenolgehalt der Proben wurde mittels ELISA bestimmt. Gelbe Balken entsprechen dem relativem Koloniewachstum, blaue Balken zeigen die Menge an gebildetem Toxin.

3.3.3.4 Einfluss der Wasseraktivität in *Fusarium graminearum*: Vergleicht man nun die erhaltenen Daten mit den Werten für *F. graminearum*, so resultierte hier das auf folgender Abbildung dargestellte Expressionsmuster (Abb. 38):

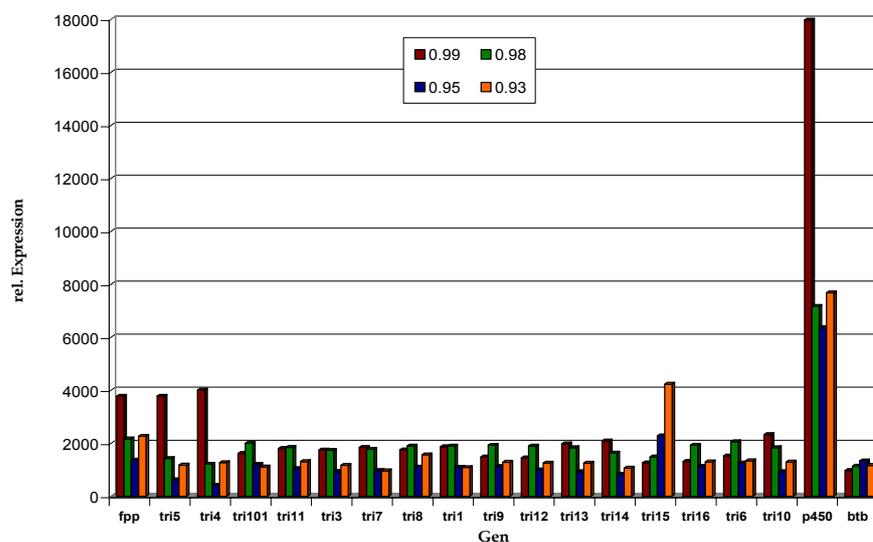


Abb. 38: Expressionsprofil der Mykotoxingene in *F. graminearum* bei unterschiedlicher Wasseraktivität. Die Abbildung zeigt die relative Expression der Gene des Trichothecenclusters. Die Inkubationstemperatur war 25 °C.

Nimmt man dazu noch die Toxinbiosynthese unter gleichen Bedingungen (Abb. 39), so fällt auf, dass *Fusarium graminearum* sein Hauptgenexpressions- und Toxinbiosyntheseoptimum bei a_w 0.99 hatte. Außerdem kam es auch hier zu einem Nebenpeak, sowohl bei der Expression der Mykotoxingene als auch bezüglich der Toxinbildung.

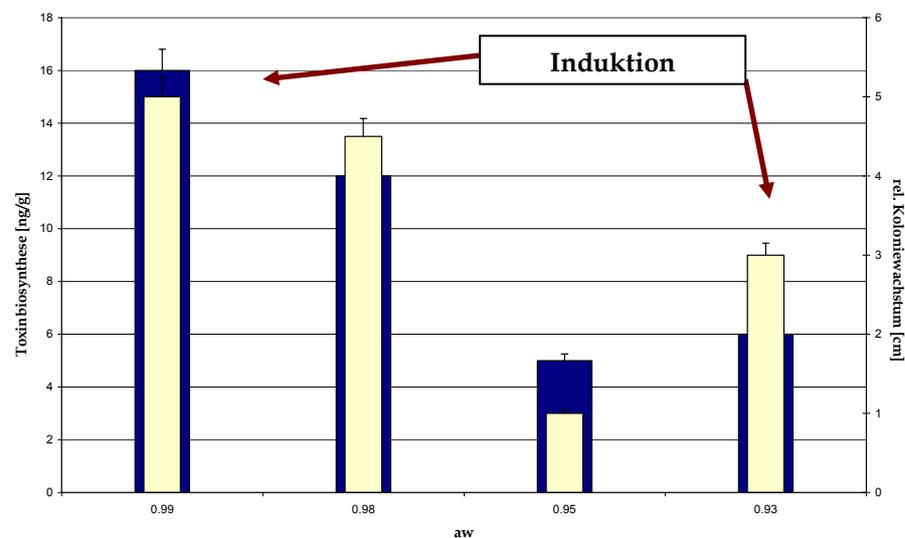


Abb. 39: Wachstum und Toxinbiosynthese in *F. graminearum* bei unterschiedlicher Wasseraktivität. Der Deoxynivalenolgehalt der Proben wurde mittels ELISA bestimmt. Gelbe Balken entsprechen dem relativem Koloniewachstum, blaue Balken zeigen die Menge an gebildetem Toxin.

Das Gen *fpp*, welches für das Initialprodukt Farnesylpyrophosphat kodiert, außerdem die Gene *tri5*, *tri4*, *tri7*, *tri13*, *tri14*, *tri10* und *p450* korrelierten sehr gut mit dem Optimum bezüglich der gebildeten Toxinmenge. Die Gene *tri101*, *tri11*, *tri3*, *tri8*, *tri1*, *tri9*, *tri12*, *tri16*, sowie *tri6* hatten ihr Optimum bei a_w 0.98. Beachtenswert ist, dass es auch bei *F. graminearum* zum Auftreten eines zweiten Peaks im suboptimalen Wachstumsbereich kam. Außerdem lag die insgesamt akkumulierte Toxinmenge wieder unter der von *Fusarium culmorum*. Interessanterweise war auch hier wieder die Cyt-p450-Monooxygenase am höchsten exprimiert. Es ließen sich ebenso wie bei *F. culmorum* Diskrepanzen in der Korrelation einiger Gene bezüglich des Biosynthesestatus erkennen. Offensichtlich sind grundsätzlich nicht alle für die Toxinbiosynthese relevanten Gene auch tatsächlich direkt mit der zum Zeitpunkt der RNA-Gewinnung aktuellen Mykotoxinbiosyntheseaktivität in Einklang zu bringen.

3.3.3.5 Einfluss der Temperatur in *Fusarium culmorum*: Nach der Wasseraktivität hat die Temperatur einen großen Einfluss auf Germination, Wachstum und Biosynthese von Mykotoxinen in filamentösen Pilzen. Dieser Faktor wurde im Folgenden analysiert. Der entsprechende Pilzstamm wurde hierzu auf YES-Medium angeimpft und jeweils bei 15 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C inkubiert. Abbildung 40 zeigt die Expression des Trichothecengenclusters in *F. culmorum* bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen:

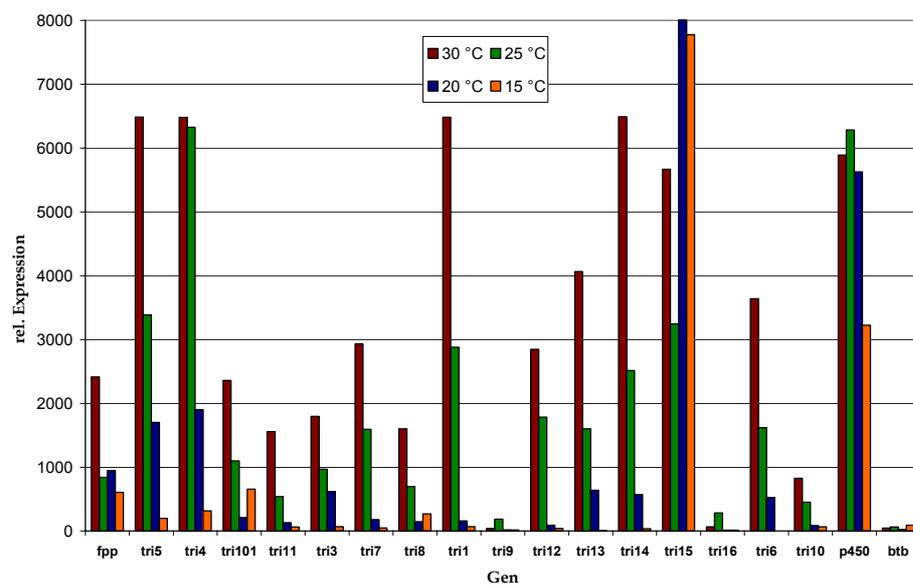


Abb. 40: Expressionsprofil der Mykotoxingene in *F. culmorum* bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Abbildung zeigt die relative Expression der Gene des Trichothecenclusters.

Wie deutlich zu sehen ist, lag das Expressionsoptimum der meisten Gene des Clusters bei 30 °C. Bei den Genen *tri101* und *tri8* lag ein weiterer Expressionspeak bei 15 °C.

Betrachtet man nun das Ergebnis der Toxinanalyse (Abb. 41), so fällt auf, dass bei 25 °C am meisten Toxin synthetisiert wurde:

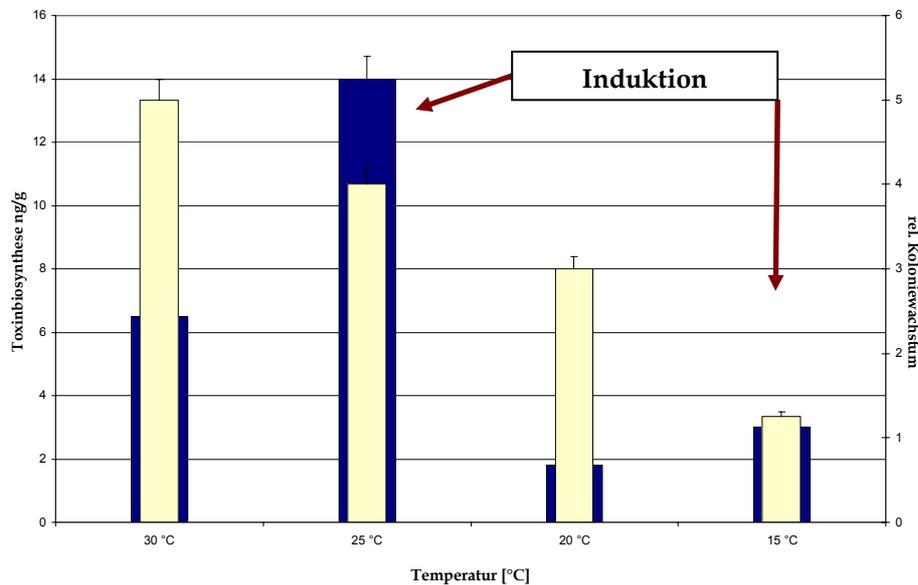


Abb. 41: **Wachstum und Toxinbiosynthese in *F. culmorum* bei verschiedenen Temperaturen.** Der Deoxynivalenolgehalt der Proben wurde mittels ELISA bestimmt. Gelbe Balken entsprechen dem relativen Koloniewachstum, blaue Balken zeigen die Menge an gebildetem Toxin.

Die temperaturabhängige Varianz in der Expression der Trichothecenbiosynthesegene in *Fusarium culmorum* lässt jedoch ein Toxinbiosyntheseoptimum um 30 °C erwarten, da hier die Expression der meisten Gene des Biosyntheseclusters am ausgeprägtesten war. Abgesehen davon, dass die Gene *tri9*, *tri16* und die Cyt-p450-Monooxygenase in ihrer Expression mit dem Bildungspeak bei 25 °C korrelierten, wirft sich die Frage auf, wie es zu dieser starken Diskrepanz zwischen den Expressionsergebnissen und der tatsächlichen Bildungsspitze kam. Besonders die Gene *tri5*, *tri4*, *tri12* und *tri13* waren ja in den vorhergehenden Versuchen üblicherweise sehr exakt korreliert. Das Wachstumsoptimum lag bei 30 °C. Um dieser Besonderheit auf den Grund zu gehen, wurde eine Kinetik über 30 Tage angesetzt. Hierzu wurde *Fusarium culmorum* jeweils bei 30 °C und bei 25 °C inkubiert und mittels ELISA die akkumulierte Toxinmenge ermittelt. Betrachtet man nun das Ergebnis, so wird klar, dass bei 25 °C zwar früher Deoxynivalenol gebildet wurde, bei 30 °C jedoch

die mit Abstand größere Menge (Abb. 42). Liegt der Probenahmezeitpunkt bei 5 Tagen, so erhält man als Resultat fälschlicherweise eine höhere Toxinbiosynthese bei 25 °C im Vergleich zu 30 °C.

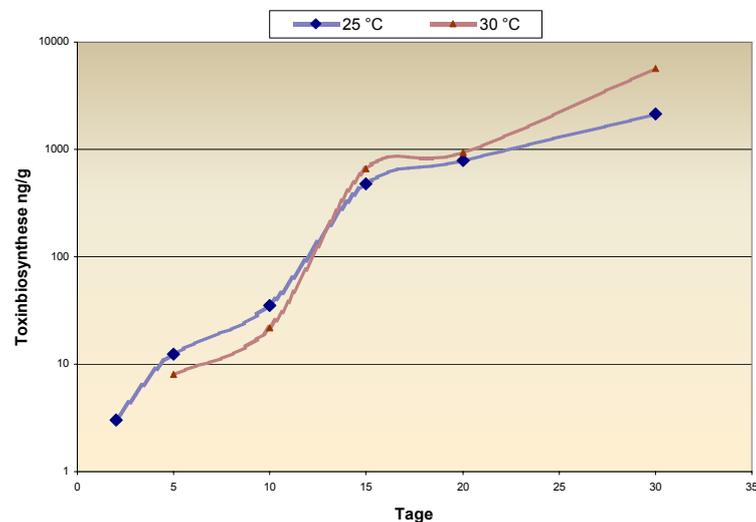


Abb. 42: Toxinbiosynthese in *F. culmorum* bei 25 °C und 30 °C. Der Deoxynivalenolgehalt der Proben wurde mittels ELISA bestimmt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Tage, jeweils bei 25 °C und 30 °C. Nach 2, 5, 10, 15, 20 und 30 Tagen wurden Proben genommen.

3.3.3.6 Einfluss der Temperatur in *Fusarium graminearum*: Bei *Fusarium graminearum* sah die Expression auch relativ heterogen aus (Abb. 43), hatten doch 6 Gene ihr Expressionsoptimum bei 25 °C, während der Peak von 10 Genen bei 30 °C positioniert war.

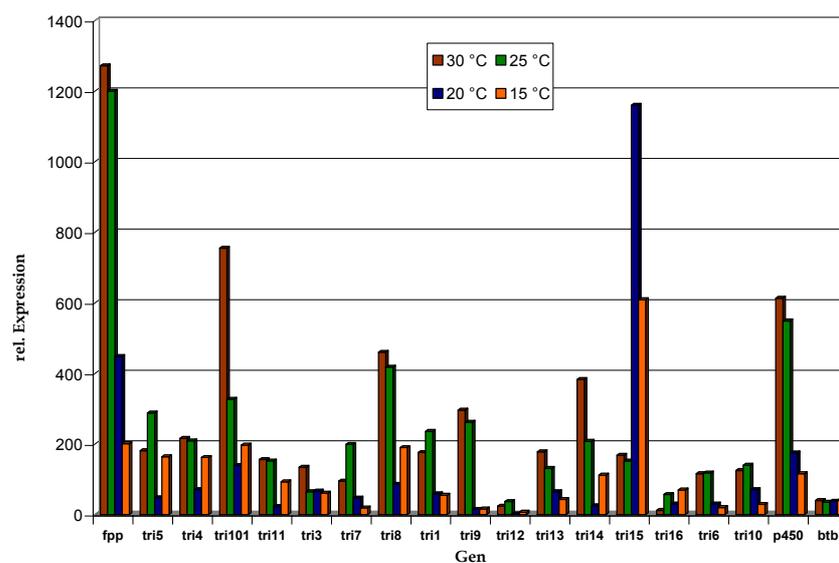


Abb. 43: Expressionsprofil der Mykotoxingene in *F. graminearum* bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Abbildung zeigt die relative Expression der Gene des Trichothecenclusters.

Beachtenswert war hier auch wieder die stark verminderte Gesamtexpression im Vergleich zu *F. culmorum* (~ 1:6). Außerdem fiel die sonst im Vergleich zu den restlichen Genen prominent exprimierte Cyt-p450-Monooxygenase vom Blickpunkt der Expressionsstärke dieses Mal hinter den anderen Genen zurück. Betrachtet man daneben die tatsächlich gebildete Toxinmenge, so wurde die maximale Ausbeute bei 30 °C synthetisiert (Abb. 44). Auch bei diesem Einflussfaktor war ein Nebenpeak bei 15 °C sowohl bei der Toxinbiosynthese als auch bei der Expression einiger Gene des Trichothecenclusters zu beobachten.

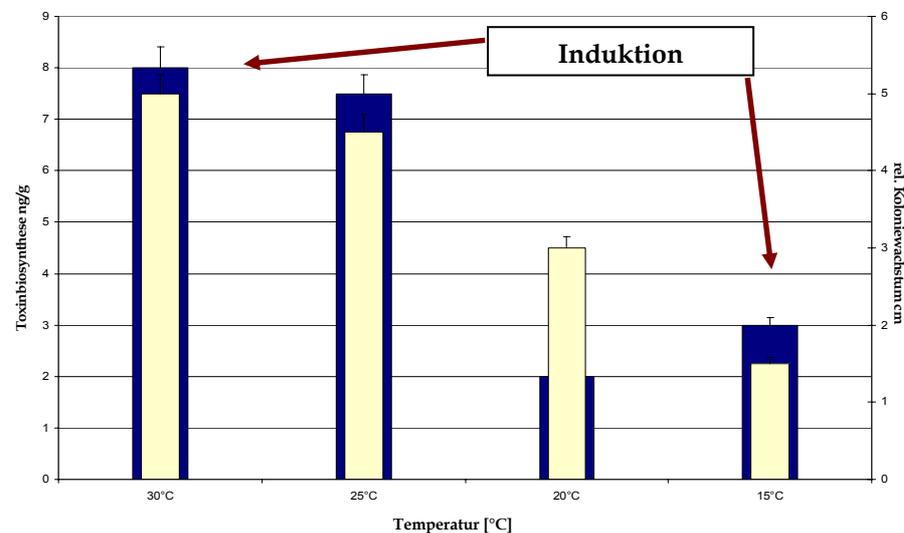


Abb. 44: **Wachstum und Toxinbiosynthese in *F. graminearum* bei verschiedenen Temperaturen.** Der Deoxynivalenolgehalt der Proben wurde mittels ELISA bestimmt. Gelbe Balken entsprechen dem relativem Koloniewachstum, blaue Balken zeigen die Menge an gebildetem Toxin.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 5) ist eine Zusammenstellung der erhaltenen Daten aus den Einzelfaktoranalysen aufgeführt. Betrachtet man diese genauer so wird klar, dass nicht alle Gene mit der momentanen Toxinbiosynthesesituation direkt korreliert waren. Außerdem gab es Variationen in den Gensets, die jeweils bei den verschiedenen Faktoren mit der augenblicklichen Synthesesituation übereinstimmten. Nur einige wenige Gene waren bei allen Einflussfaktoren direkt korreliert. Bei *F. culmorum* waren das die Gene *tri5*, *tri4*, *tri12*, *tri13*, bei *F. graminearum* *fpp*, *tri4*, *tri13*, *tri14*, sowie die Cyt-p450-Monooxygenase. Bei allen untersuchten Faktoren ließ sich die Toxinbiosynthese mittels Analyse der

Expression einiger der mykotoxinrelevanten Gene des Trichothecenclusters evaluieren.

Tab. 5: Expressionsunterschiede innerhalb des Genclusters nach Wachstum von *F. culmorum* und *F. graminearum* bei verschiedenen äußeren Einflussfaktoren. Dargestellt ist die faktorabhängige Korrelation einzelner Gene zur Toxinbiosynthese.

Stamm	Faktor /Optimum	zum Optimum der Toxinbiosynthese korrelierte Gene	zum Optimum der Toxinbiosynthese nicht korrelierte Gene	bei allen 3 Faktoren korreliert
<i>F. culmorum</i>	pH /pH5	<i>tri5, tri4, tri12, tri13, tri11, tri3, tri7, tri12, tri13, tri14, tri6</i>	<i>fpp, tri101, tri8, tri10, tri15, (tri1, tri9, tri16), p450-MO</i>	<i>tri5, tri4, tri12, tri13</i>
	Temperatur /25 °C	<i>fpp, tri5, tri4, tri101, tri11, tri3, tri7, tri8, tri1, tri12, tri13, tri14, tri6, p450-MO</i>	<i>tri9, tri15, tri16, tri10</i>	
	Wasseraktivität /0.98	<i>fpp, tri5, tri4, tri101, tri12, tri13, p450-MO</i>	<i>tri11, tri3, tri7, tri8, tri1, tri9, tri14, tri16, tri6, tri10</i>	
<i>F. graminearum</i>	pH /pH8	<i>fpp, tri5, tri4, tri101, tri3, tri11, tri7, tri8, tri1, tri12, tri13, tri14, p450-MO</i>	<i>tri9, tri16, tri15, tri10, tri6</i>	<i>fpp, tri4, tri13, tri14, Cyt-p450-MO</i>
	Temperatur /30 °C	<i>fpp, tri4, tri101, tri11, tri3, tri8, tri9, p450-MO, tri13, tri14</i>	<i>tri5, tri7, tri1, tri12, tri6, tri10, tri15, tri16</i>	
	Wasseraktivität /0.99	<i>fpp, tri5, tri4, tri3, tri7, tri13, tri14, tri10, p450-MO</i>	<i>tri101, tri11, tri3, tri8, tri1, tri9, tri12, tri15, tri16, tri6</i>	

Die vorhergehenden Versuche bezogen sich alle auf einfaktorische Analysen. Ob es zu synergistischen Effekten bei der Anwendung von zwei Einflussfaktoren kommt, sollte im Folgenden untersucht werden.

3.3.3.7 Einfluss einer Kombination von zwei Faktoren auf Genexpression und Mykotoxinbildung in *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum*: In diesem Versuchsansatz wurden die Faktoren Wasseraktivität (a_w) und Temperatur in Kombination im Medium eingestellt und der Pilz unter möglichst konstanten Bedingungen inkubiert. So sollte untersucht werden, ob sich simultan

auftretende Parameter in der resultierenden Wirkung auf Genexpression und Toxinbiosynthese eher synergistisch potenzieren oder gegenseitig abschwächen. *F. culmorum* wurde dazu auf YES Medium mit unterschiedlich eingestellter Wasseraktivität (0.99, 0.98, 0.95, 0.93) unter jeweils verschiedenen Temperaturen (30 °C, 25 °C, 20 °C, 15 °C) inkubiert und Proben genommen. Aus diesen wurde jeweils für Genexpressionsanalysen die RNA isoliert, sowie für die Toxinanalytik mittels ELISA Deoxynivalenol extrahiert. Bei der Kombination 15 °C mit einem a_w von 0.93 konnten innerhalb des Messzeitraumes keine ausreichenden Mengen an Biomasse gebildet werden, um die Mindestmenge erforderlicher Gesamt-RNA daraus isolieren zu können. Aus diesem Grunde konnte für diesen Wert jeweils nur die Toxinmenge bestimmt werden. Folgende Ergebnisse resultierten:

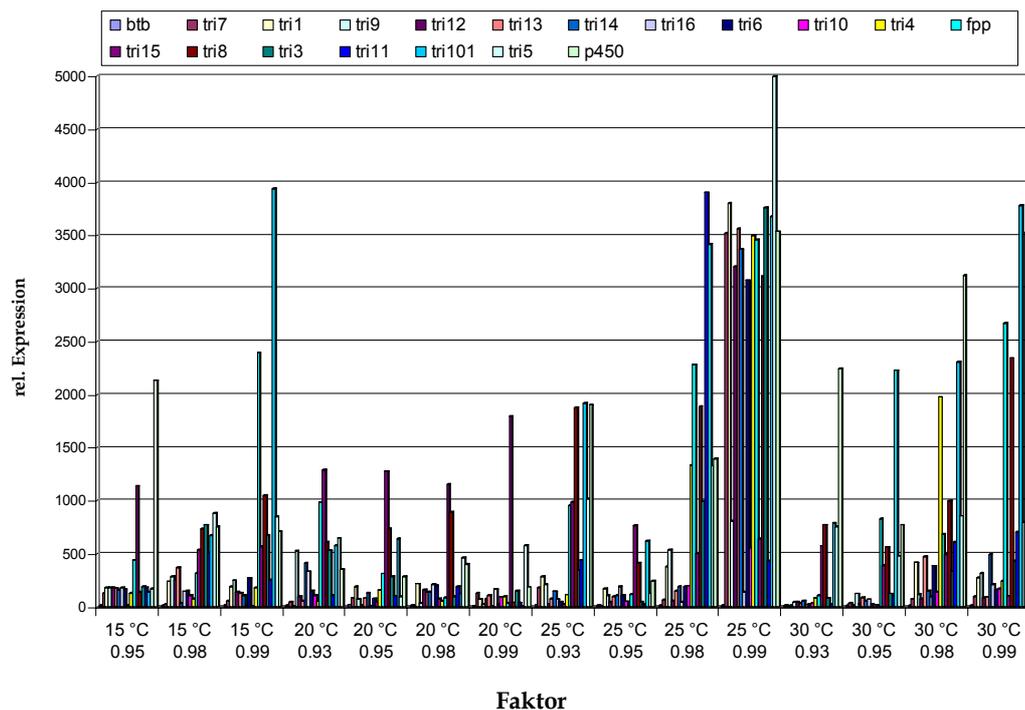


Abb. 45: **Zweifaktorielle Genexpressionsanalyse in *F. culmorum***. Inkubation bei Kombinationen von a_w -Wert und Temperatur. 2-D-Ansicht.

Deutlich zu sehen in den Abbildungen 45 und 46 ist die starke Expression des Trichothecengenclusters im Bereich um 30 °C – 25 °C bei einer Wasseraktivität von 0.99 bis 0.98. Bei 15 °C konnte außerdem auch hier wieder ein schwächerer

Zusatzpeak unter suboptimalen Bedingungen beobachtet werden, bei den a_w -Werten 0.95-0.99 auch im niederen a_w -Bereich.

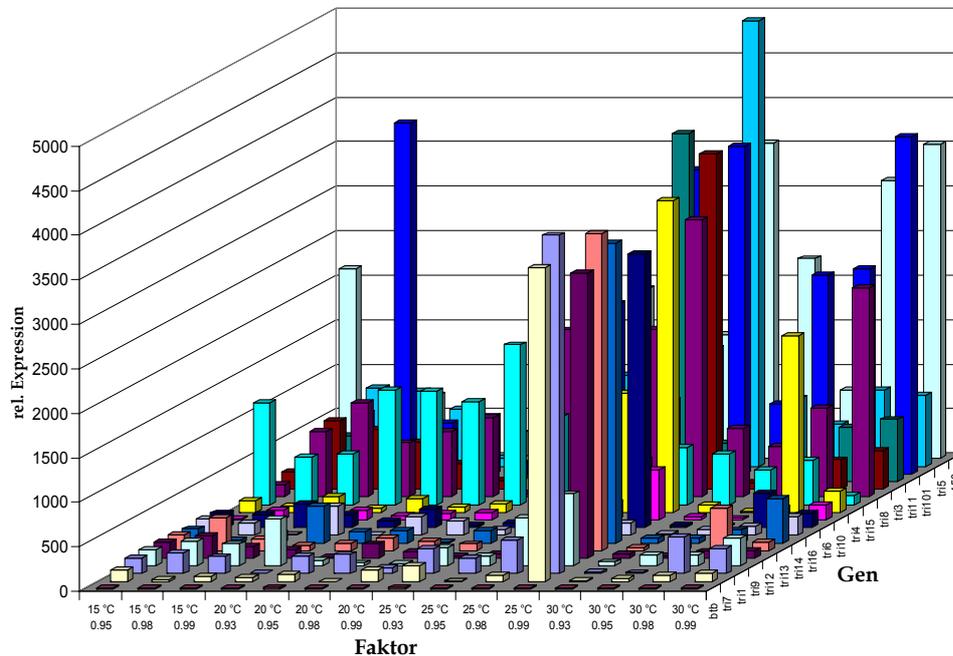


Abb. 46: 3-dimensionales Modell der Zweifaktoriellen Genexpressionsanalyse von *F. culmorum*. Inkubation bei Kombinationen von a_w -Wert und Temperatur. Es gilt dasselbe wie für Abbildung 45.

Die jeweils gebildete Toxinmenge wurde mit ELISA ermittelt und ergab folgendes, der Genexpression weitgehend entsprechendes Ergebnis (Abb. 47):

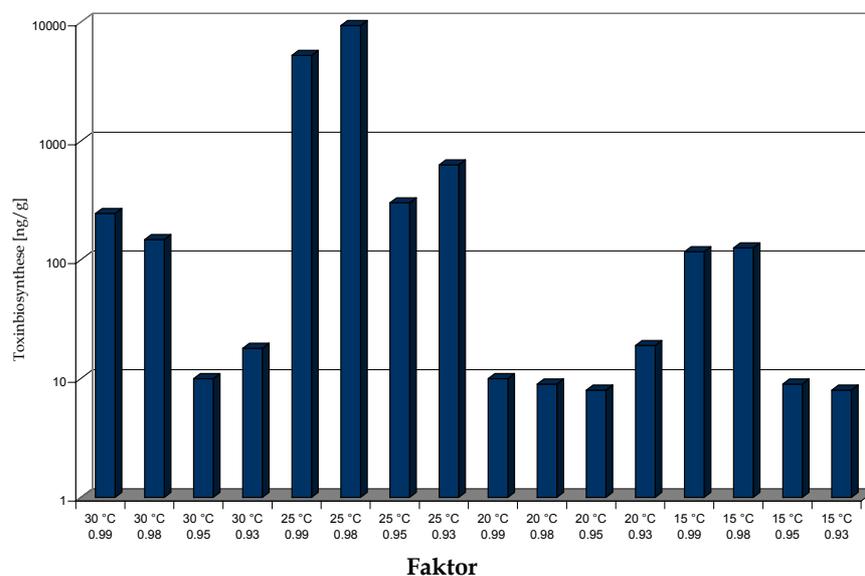


Abb. 47: Zweifaktorielle Toxinbiosyntheseanalyse von *F. culmorum* bei Kombinationen von a_w -Wert und Temperatur. ELISA-Analyse.

Anders hingegen sah es bei *Fusarium graminearum* aus. Hier waren mehrere Expressionsoptima eher diffus über den Analysebereich verteilt. Bis auf einige Wenige war der überwiegende Anteil der Gene des Biosyntheseclusters eher auf niedrigerem Niveau exprimiert. Trotzdem war ebenfalls um den Temperaturbereich 30 – 25 °C eine Anhäufung an hochexprimierten Genen zu beobachten, sowie ein weiterer Peak auf niedrigerem Expressionsniveau um die 15 °C (Abb. 48/49).

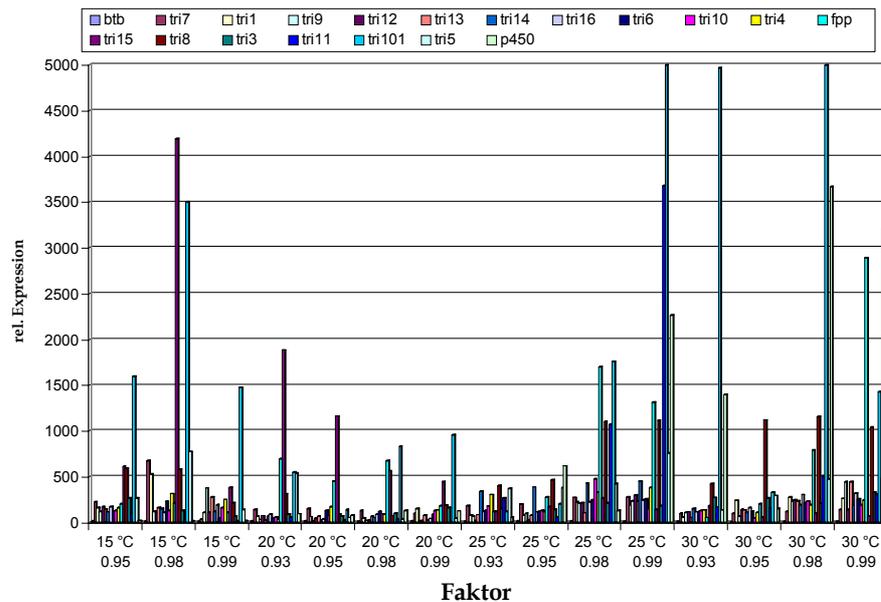


Abb. 48: **Zweifaktorielle Genexpressionsanalyse von *F. graminearum*.** Inkubation bei Kombinationen an a_w -Wert und Temperatur. 2-D-Ansicht.

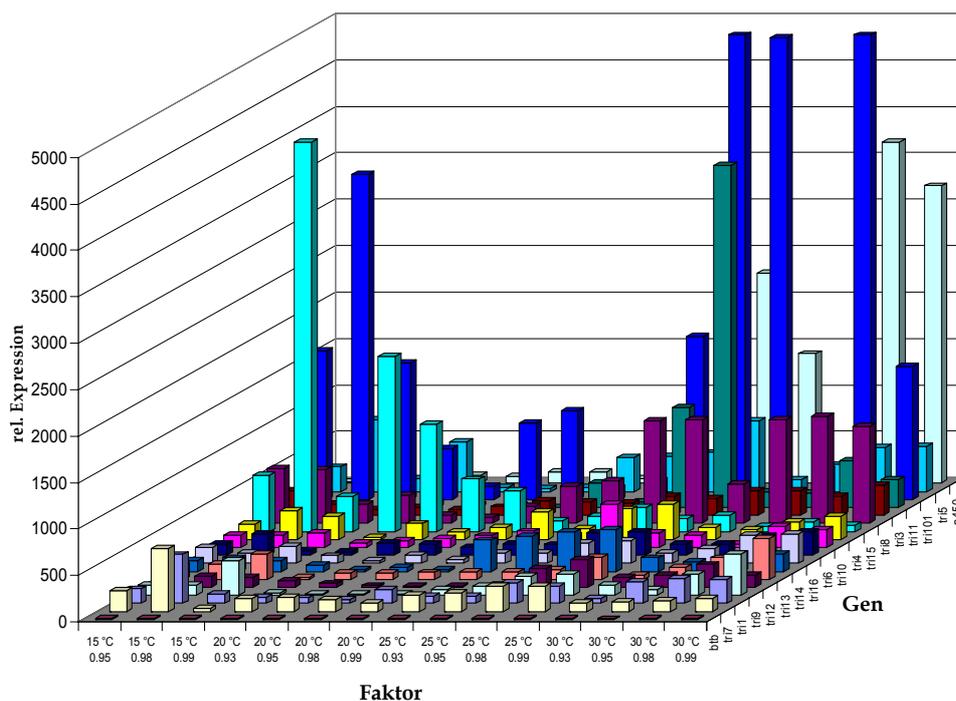


Abb. 49: **3-dimensionales Modell der Zweifaktoriellen Genexpressionsanalyse von *F. graminearum*.** Inkubation bei Kombinationen von a_w -Wert und Temperatur.

Selbiges galt für die mit ELISA ermittelte Toxinbiosynthese (Abb. 50).

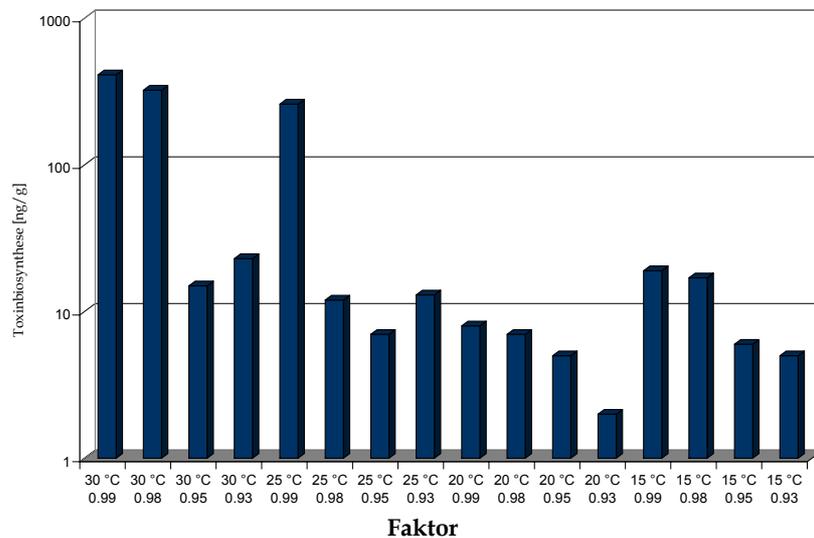


Abb. 50: Zweifaktorielle Toxinbiosyntheseanalyse von *F. graminearum* bei Kombinationen von a_w -Wert und Temperatur. ELISA-Analyse.

Auf Grundlage der vorliegenden Analysendaten konnten folgende faktorbezogene Mykotoxingenexpressionsmodelle für *Fusarium* entwickelt werden:

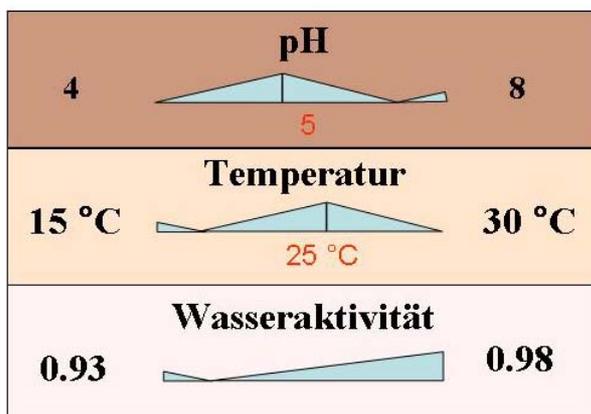


Abb. 51: Präventionsmodell *F. culmorum*. Faktorspezifische Toxinbiosyntheseoptima in *Fusarium culmorum*.

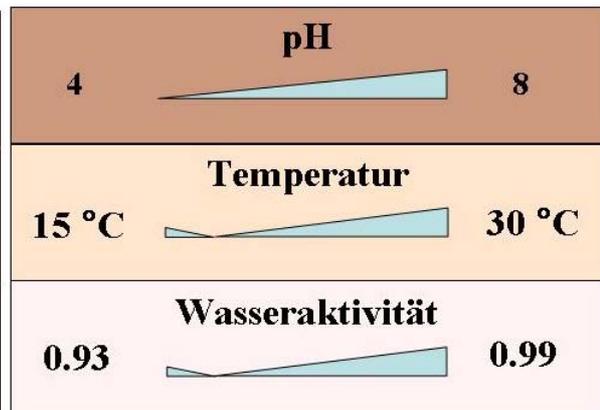


Abb. 52: Präventionsmodell *F. graminearum*. Faktorspezifische Toxinbiosyntheseoptima in *Fusarium graminearum*.

Bei Berücksichtigung der vorliegenden Modelle kann die Induktion der Mykotoxinbiosynthese gene verhindert oder stark vermindert werden, um so eine Kontamination des Lebensmittels mit Mykotoxinen zu vermeiden.

3.3.3.8 Einfluss einer Kombination drei von Faktoren auf Genexpression und Mykotoxinbildung in *Fusarium culmorum*: Um den synergistischen Effekt verschiedener gemeinsam auftretender, negativer und positiver Faktoren auf Mykotoxinbiosynthese und Wachstum zu untersuchen, wurde *F. culmorum* unter kombinierten Bedingungen inkubiert, welche sich anhand der Modelle als besonders vorteilhaft bzw. nachteilig bezüglich der Mykotoxinbiosynthese ableiten ließen. Als die Toxinbildung induzierende Faktoren, wurde eine Kombination aus pH5/25°C/a_w0.98 eingestellt, als am wenigsten induzierende Kombination pH6/20°C/a_w0.95.

Folgende Ergebnisse resultierten aus dieser Untersuchung:

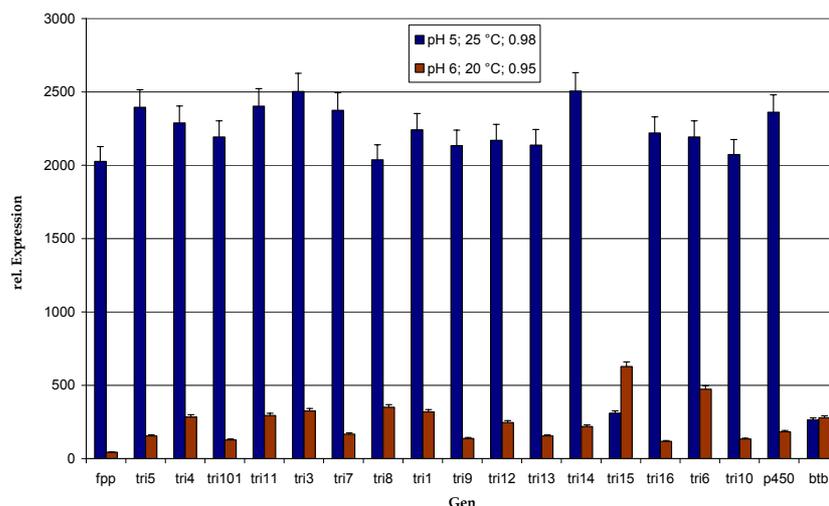


Abb. 53: Mikroarray Genexpressionsanalyse in *F. culmorum* unter einer Kombination an reprimierenden bzw. fördernden Bedingungen bezüglich der Mykotoxinbiosynthese. Wie deutlich zu sehen ist, addierten sich die fördernden, bzw. reprimierenden Einflussfaktoren in ihrer Wirkung auf die Genexpression.

Tatsächlich war die Expression der Mykotoxingene unter der Kombination an fördernden, nicht induzierenden Faktoren entsprechend erhöht oder stark vermindert (Abb. 53). Die Toxinbiosynthese folgte der Tendenz der Genexpression, wohingegen das Wachstum bemerkenswerter Weise nicht im gleichen Maße beeinflusst wurde.

Dies geht aus Abbildung 54 deutlich hervor:

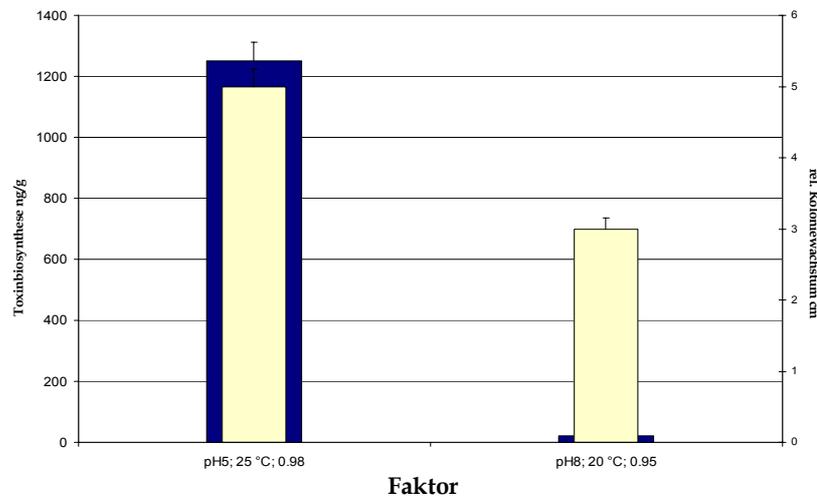


Abb. 54: Wachstum und Toxinanalyse in *F. culmorum* unter Kombinationen von reprimierenden, bzw. fördernden Bedingungen. Die gebildete Toxinmenge wurde mit ELISA ermittelt. Die gelben Balken stehen für das relative Koloniewachstum in Zentimetern.

Wie in *F. culmorum* sehr gut analysierbar, waren alle Gene des Trichothecenclusters stark reprimiert unter nicht-induktiven Bedingungen und vice versa. Nur das Gen *tri15*, ein Negativregulator, war erwartungsgemäß reziprok exprimiert. Die Mykotoxinbiosynthese entsprach der Genexpression.

Aus den erhaltenen Daten kristallisierte sich heraus, dass die faktorabhängige Geninduktion- und Repression auf transkriptionaler Ebene messbar ist und mit der Toxinbildung anhand der Expressionsdaten einiger, jedoch nicht aller Toxinbiosynthesegene korrelierbar ist. Die Expression der Mykotoxingene ließ sich dabei immer einige Zeit vor der Bildung problematischer Mengen an Toxin nachweisen. Auch das Ausmaß der Expression ließ sich z. T. sehr gut mit der quantitativen Toxinakkumulation in Korrelation bringen. Allerdings zeigte sich die Abhängigkeit der Expression von äußeren Einflüssen als komplexer als bisher angenommen. So konnten Expressionspeaks unter suboptimalen Bedingungen ausgemacht werden, z.B. nach Inkubation bei 15 °C. Bei dieser Temperatur wurde eher eine niedrigere Expressions-, bzw. Toxinbildungsaktivität vermutet im Vergleich zur Inkubation bei 20 °C. Des Weiteren konnte ein eindeutiger Unterschied in der faktorabhängigen Genexpression zwischen *F. culmorum* und *F.*

graminearum festgestellt werden. Es kam hierbei zu unterschiedlichen Ausprägungen von Expressionsmustern.

3.3.4 Analyse der differentiellen Genexpression in *Penicillium*: Nach *Fusarium* als Vertreter unter den Pflanzenparasiten, die hauptsächlich bereits auf dem Feld zum Problem werden, sollte in nachfolgenden Versuchen die generelle Regulation der Mykotoxinbiosynthesegene auch in *Penicillium* analysiert werden, einem Schimmelpilz, der vor allem als Lagerkontaminant Bedeutung hat. Um den temporären Verlauf der Genexpression auch hier zu untersuchen, wurde eine Expressionskinetik durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurde dann der Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf diese Spezies analysiert.

3.3.4.1 Durchführung einer Genexpressionskinetik in *P. nordicum*: Zum Feststellen einer grundlegenden Induktionskinetik, wurde repräsentativ *P. nordicum*, ein starker Ochratoxin A-Bildner, für 16 Tage auf YES-Medium inkubiert (Abb. 55) und parallel die Ochratoxinbiosyntheseleistung analysiert (Abb. 56).

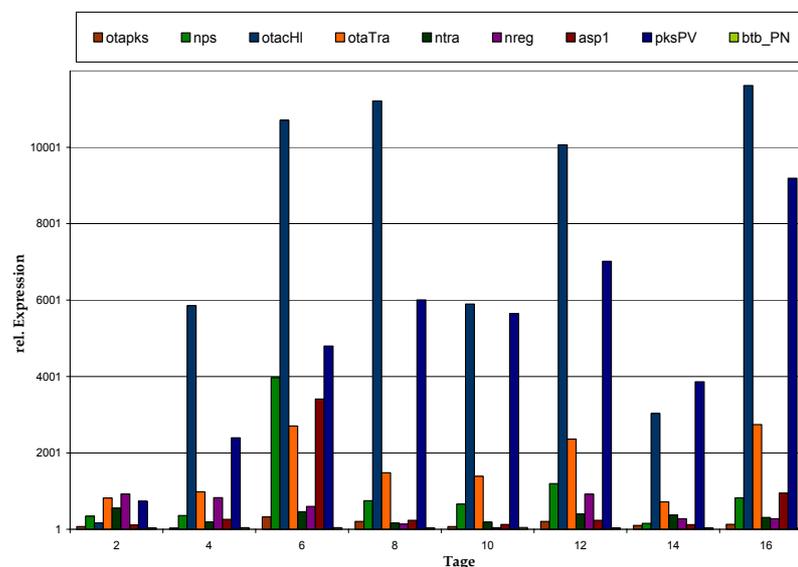


Abb. 55: **Mikroarray Expressionskinetik *Penicillium*.** Mikroarray Genexpressionsanalyse des Ochratoxin A Biosynthesegenclusters in *Penicillium nordicum* über einen Zeitraum von 16 Tagen.

Wie aus den Daten ersichtlich, wurden einige Gene im Verlauf der 16 Tage unregelmäßig, aber stetig höher exprimiert (*otapksPV*, *otachIPN*, *otatraPN*),

während andere eine ansteigende und wieder abfallende Expression über die 16 Tage aufzeigten (*otapks*, *nps*, *ntra*, *nreg*, *asp*). Was jedoch besonders auffiel, war eine auch bei dieser Spezies auftretende oszillierend ablaufende Expression aller analysierten Gene, wie auch beobachtet beim *tri5* Gen im Verlauf der *Fusarium culmorum* Kinetik. Um die Expression eines gut korrelierten Gens der Ochratoxinbiosynthese mittels Real Time PCR der tatsächlichen Toxinbiosynthese gegenüber zu stellen, wurde das gut korrelierte Schlüssel-Gen *otapksPV* ausgewählt, welches eine initiale Rolle im Ochratoxinbiosyntheseweg einnimmt, es kodiert hier für eine Polyketidsynthase.

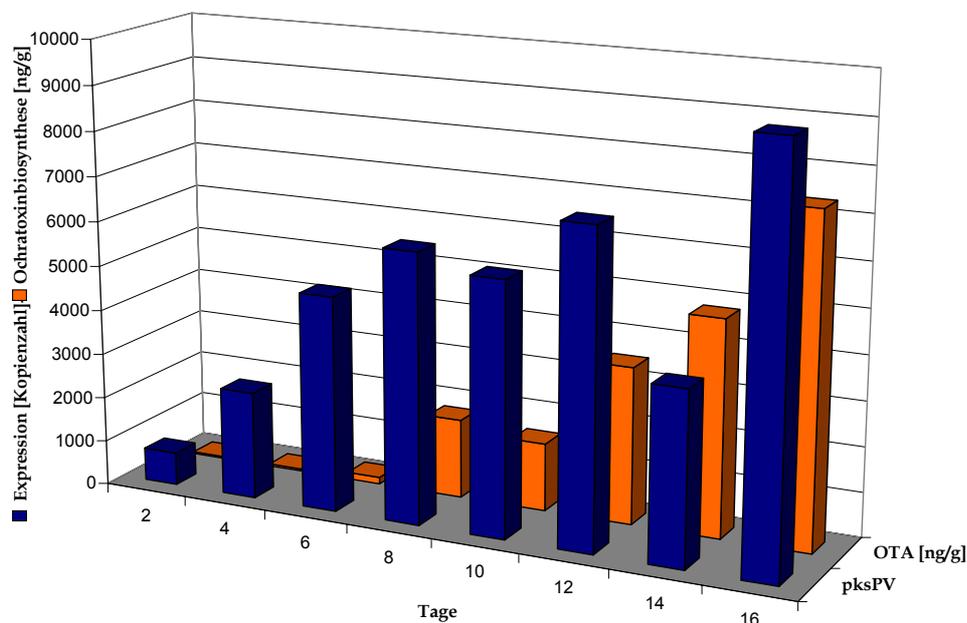


Abb. 56: Toxin- und Genexpressionsanalyse des Polyketidsynthasegens *otapksPV* in Korrelation zur OTA-Biosynthese in *Penicillium nordicum*. Die Toxinmenge wurde mit HPLC bestimmt. Eine Expression des *otapksPV*-Gens ließ sich ab dem Tag 2 nachweisen, eine signifikante Toxinbiosynthese erfolgte ab dem 8. Tag.

Wie auf Abbildung 56 zu sehen ist, kam es zwischen Tag 2 und Tag 12 zu einem sprunghaften Anstieg der Expression des Polyketidsynthasegens *otapksPV*. Am Tag 14 knickte die Expression ein, um schließlich zum Tag 16 nach oben auszubrechen. Die Toxinbiosynthese mit nennenswerten Quantitäten begann hier jedoch erst ab dem 8. Tag Inkubation. Auch hier hatte die Analyse der Genexpression also wieder einen prediktiven Charakter.

3.3.5 Einfluss äußerer Faktoren auf Genexpression und Mykotoxinbildung in *Penicillium nordicum* und *Penicillium verrucosum*: In diesem Versuchsansatz wurden *Penicillium nordicum*, sowie *Penicillium verrucosum* auf YES-Medium inkubiert. Zuvor wurden die verschiedenen Parameter im Medium eingestellt. So sollte untersucht werden, welche extrinsischen Parameter Einfluss auf die Mykotoxinbildung in Lagerpilzen am Beispiel von *Penicillium* haben. *Penicillium nordicum* und *Penicillium verrucosum* sind beides starke Ochratoxin A Bildner. *P. verrucosum* produziert außerdem das Mykotoxin Citrinin. Bei der Lagerung von Lebensmitteln ist es von besonderer Bedeutung, den Einfluss von Faktoren wie pH, Temperatur, oder Wasseraktivität auf die Expression relevanter Gene des pathogenen Pilzstammes zu kennen, da man hier, anders als unter Feldbedingungen, in einer kontrollierbaren Umgebung arbeitet, die sich zugunsten der Haltbarkeit des Lebensmittels modifizieren lässt.

3.3.5.1 Einfluss des pH in *Penicillium nordicum*: Zum Zweck der näheren Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf *Penicillium nordicum*, wurde dieser auf YES-Medium mit unterschiedlich voreingestellten pH-Wert bei 25 °C inkubiert. Aus dem erhaltenen Myzel wurde RNA isoliert für Mikroarray Expressionsanalysen, sowie OTA extrahiert für die HPLC Toxinanalytik.

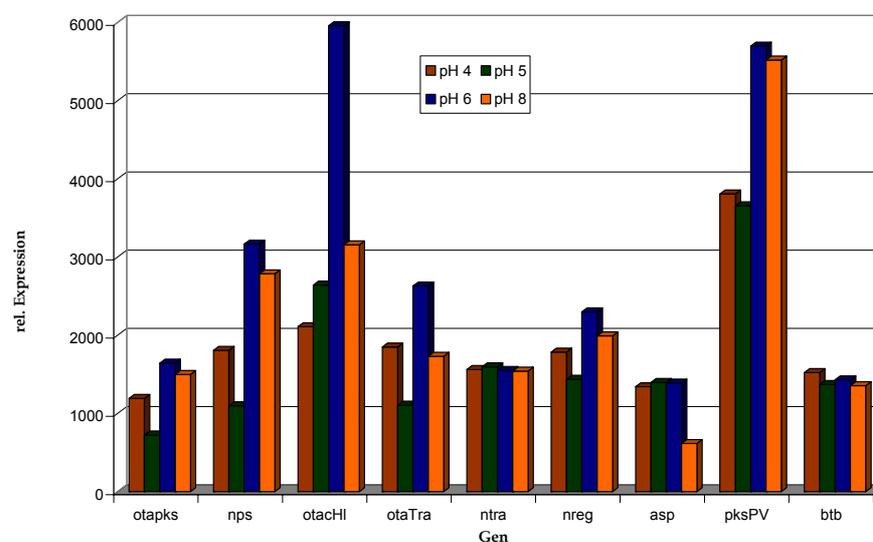


Abb. 57: pH abhängiges Expressionsprofil in *P. nordicum*. Expression der Gene des Ochratoxin A Biosyntheseclusters nach Inkubation unter verschiedenen pH-Bedingungen.

Wie deutlich zu sehen ist, lag das Expressionsoptimum der meisten Gene des Ochratoxinclusters in *Penicillium nordicum* bei pH 6 (*otapks*, *nps*, *otachl*, *otatra*, *nreg*, *pksPV*), nur die Gene *ntra* und *asp* hatten ihr Expressionsoptimum bei pH 5, waren jedoch insgesamt bei pH 4-6 ziemlich gleichmäßig exprimiert, ein Abfall der Aktivität war bei pH 8 zu beobachten. 5 Gene hatten außerdem einen zweiten Expressionspeak bei pH 4 (*otapks*, *nps*, *otatra*, *nreg* und *otapksPV*). Das interne Kontrollgen Betatubulin (*bth*) war vergleichsweise konstitutiv exprimiert. Bei der anschließend durchgeführten Toxin- und Wachstumsanalyse zeigte sich folgendes Bild (Abb. 58).

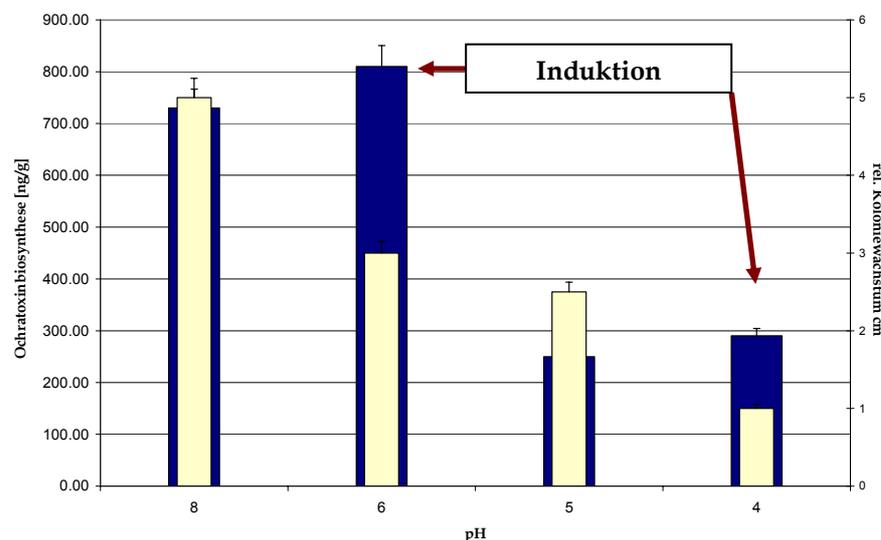


Abb. 58: **pH abhängiges Wachstum und Ochratoxin A Biosynthese in *P. nordicum*.** HPLC der Ochratoxin A Toxinbiosynthese in *P. nordicum* nach Inkubation unter verschiedenen pH-Bedingungen (blaue Balken). Relatives Koloniewachstum (gelbe Balken).

Das Optimum bezüglich der Biosynthese von Ochratoxin A korrelierte nicht mit dem beobachteten Wachstumsoptimum, jedoch mit der Expression eines Großteils der Ochratoxinbiosynthesegene. Die proportionale Ausprägung der Expression der einzelnen Gene innerhalb des Ochratoxingenclusters war dabei untereinander nicht so extrem unterschiedlich wie zum Beispiel bei *Fusarium*. Nur die Gene *chlPN*, sowie *otapksPV* waren vergleichsweise stark exprimiert. Die optimalen Wachstumsbedingungen lagen, wie auch bei *Fusarium*, eher im neutralen bis leicht alkalischen pH-Bereich. Eine erhöhte

Toxinbiosyntheseleistung ist also auch bei *Penicillium* nicht immer mit starkem Wachstum gekoppelt.

3.3.5.2 Einfluss des pH in *Penicillium verrucosum*: Im Vergleichsstamm *Penicillium verrucosum* resultierte folgendes Ergebnis (Abb. 59):

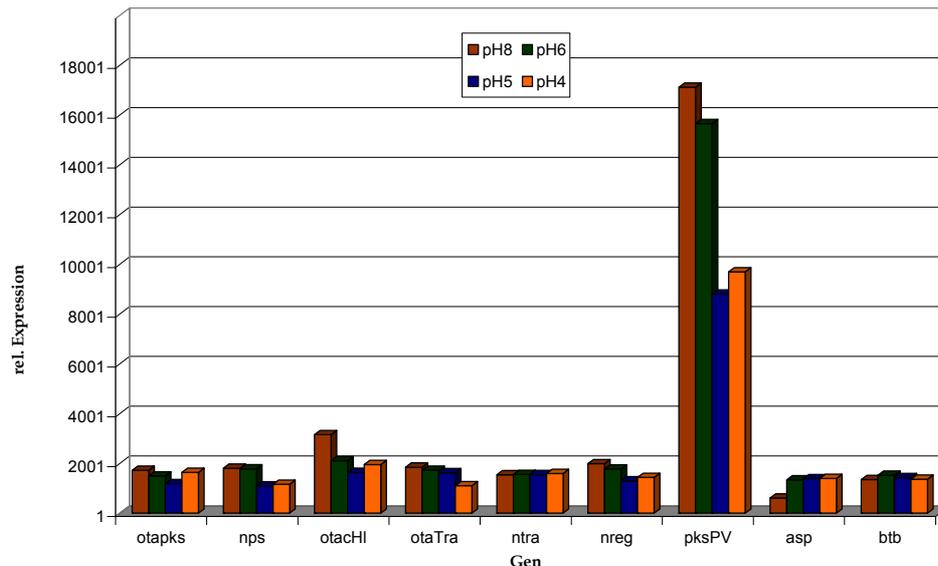


Abb. 59: **pH abhängiges Expressionsprofil in *P. verrucosum*.** Expression der Gene des Ochratoxin A Biosyntheseclusters nach Inkubation unter verschiedenen pH-Bedingungen.

Interessanterweise lag das Expressionsoptimum eines Großteils der Ochratoxin A spezifischen Gene von *Penicillium verrucosum* bei pH 8 (*otapks*, *nps*, *otachI*, *otatra*, *nreg* und *otapksPV*), bzw. bei pH 4 (*ntra*). Die Gene *ntra*, *asp* und *btb* waren dabei relativ gleichmäßig exprimiert. Das Gen *otapksPV* war in *Penicillium verrucosum* um den Faktor 3 stärker exprimiert im Vergleich zu *P. nordicum*. Bemerkenswerter Weise trat auch bei diesem Stamm ein Nebenpeak unter Bedingungen auf, die bezüglich des Wachstums suboptimal waren.

Die Analyse der Proben auf gebildetes Ochratoxin A führte bei diesem Stamm zu folgendem Ergebnis (Abb. 60):

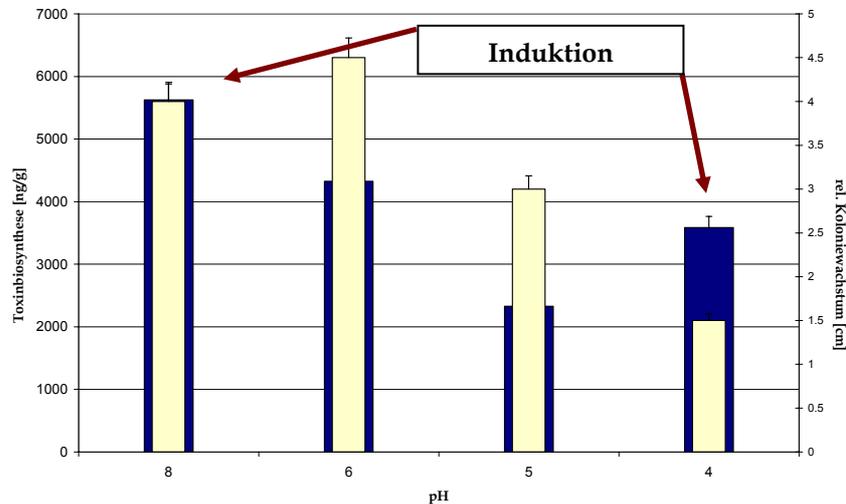


Abb. 60: pH abhängiges Wachstum und Ochratoxin A Biosynthese in *P. verrucosum*. HPLC der Ochratoxin A Toxinbiosynthese in *P. verrucosum* nach Inkubation unter verschiedenen pH-Bedingungen (blaue Balken). Relatives Koloniewachstum (gelbe Balken).

Die höchste Toxinbiosyntheseleistung lag bei *Penicillium verrucosum* um den pH 8, die maximale Expression lag bei einem Großteil der Biosynthesegene ebenfalls bei pH 8. Das stärkste Koloniewachstum war bei pH 6 zu beobachten. Entsprechend der vergleichsweise wesentlich höheren Expression des Schlüsselgens *otapksPV* in *P. verrucosum*, ergab die Quantifizierung mittels HPLC eine um den Faktor 7 erhöhte Toxinmenge.

3.3.5.3 Einfluss der Wasseraktivität in *Penicillium nordicum*: Unter Lagerbedingungen ist gerade die vorhandene Wasseraktivität im Lebensmittel oder Lagerraum einer der wichtigsten limitierenden Faktoren für Schimmelpilzwachstum und Toxinbiosynthese. Der Pilz benötigt einen Minimalbedarf an Luftfeuchte, um auskeimen und wachsen zu können. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss dieses Faktors auf Genexpression und Toxinbiosynthese untersucht.

Penicillium wurde dazu auf YES-Medium mit voreingestellten a_w -Wert bei 25 °C inkubiert. Folgendes Genexpressionsprofil resultierte:

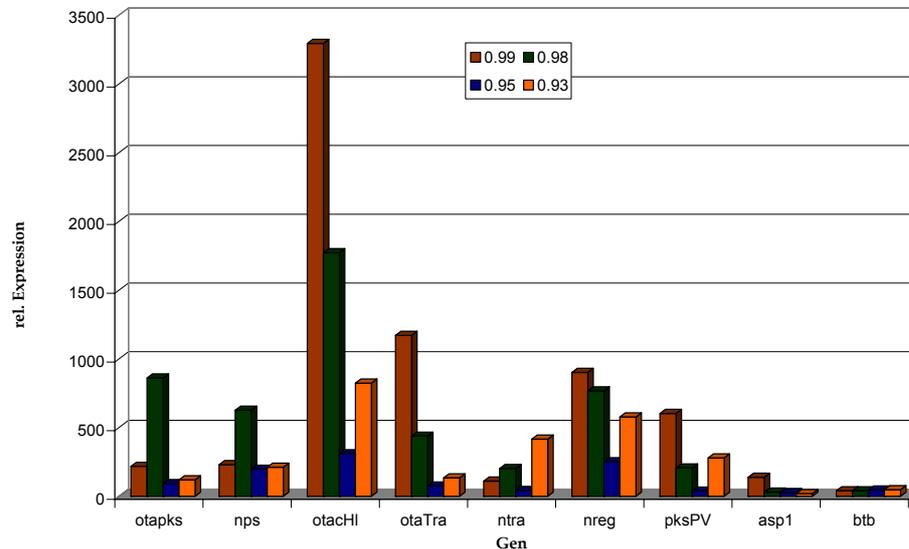


Abb. 61: **Von der Wasseraktivität abhängiges Expressionsprofil in *P. nordicum*.** Expression der Gene des Ochratoxin A Biosyntheseclusters nach Inkubation unter verschiedenen a_w -Bedingungen. Balken zeigen relative Expression.

Wie aus dem Genexpressionsprofil in Abbildung 61 ersichtlich, war die Expression von 2 Genen des Biosyntheseclusters bei einem a_w -Wert von 0.98, also 98 % frei verfügbaren Wassers, am höchsten (*otapks*, *nps*), bzw. bei 4 Genen bei einem a_w -Wert von 0.99 (*otachI*, *otatra*, *nreg*, *pksPV*). Das Gen, welches für einen Nitrattransporter kodiert, hatte sein Optimum bei einem Wasseraktivitätswert von 0.93. Außerdem war auch hier bei einigen Genen des Clusters ein weiterer kleiner Peak bei einer relativen Luftfeuchte von 0.93 auszumachen. Von Seiten der Expressionsstärke fiel das Gen *otachI*, welches für eine Chloroperoxidase kodiert, besonders auf. Alle anderen Gene wurden auf niedrigerem Niveau exprimiert. Bei der Analyse auf gebildetes Ochratoxin A fiel auf, dass hier bei einer Wasseraktivität von 0.99 auch am meisten Toxin produziert wurde, gefolgt von 0.98 und 0.93 (Abb. 62). Das Wachstumsoptimum lag dieses Mal mit dem Biosyntheseoptimum konform, was einmal mehr verdeutlicht, dass die Wachstumsrate ein denkbar schlechter Faktor ist, um von diesem auf eine bestimmte Toxinbiosyntheseleistung zu schließen.

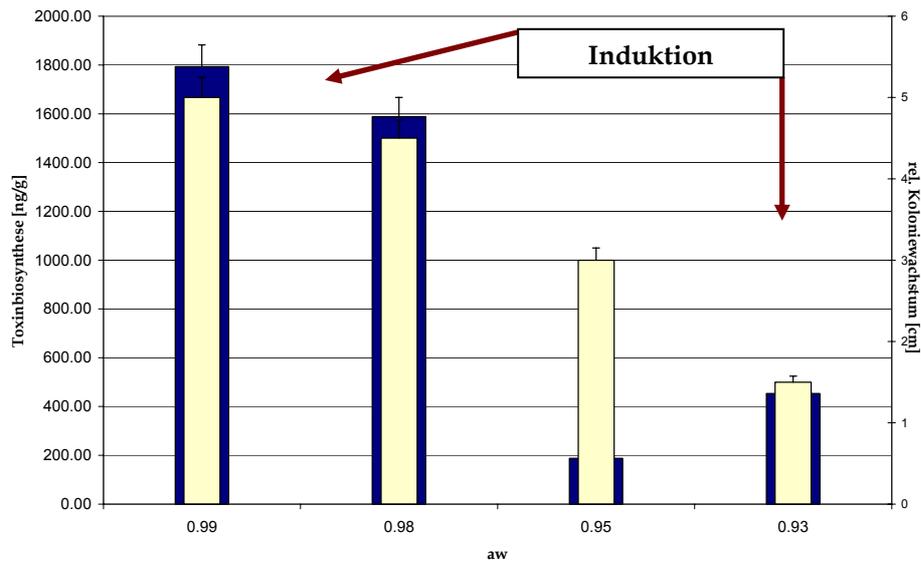


Abb. 62: Von der Wasseraktivität abhängige Ochratoxin A Biosynthese in *P. nordicum*. HPLC der Ochratoxin A Toxinbiosynthese in *P. nordicum* nach Inkubation unter verschiedenen a_w -Bedingungen (blaue Balken). Relatives Koloniewachstum (gelbe Balken).

3.3.5.4 Einfluss der Wasseraktivität in *Penicillium verrucosum*: Vergleicht man nun die erhaltenen Daten mit den Werten für *P. verrucosum*, so ergibt sich folgendes Bild:

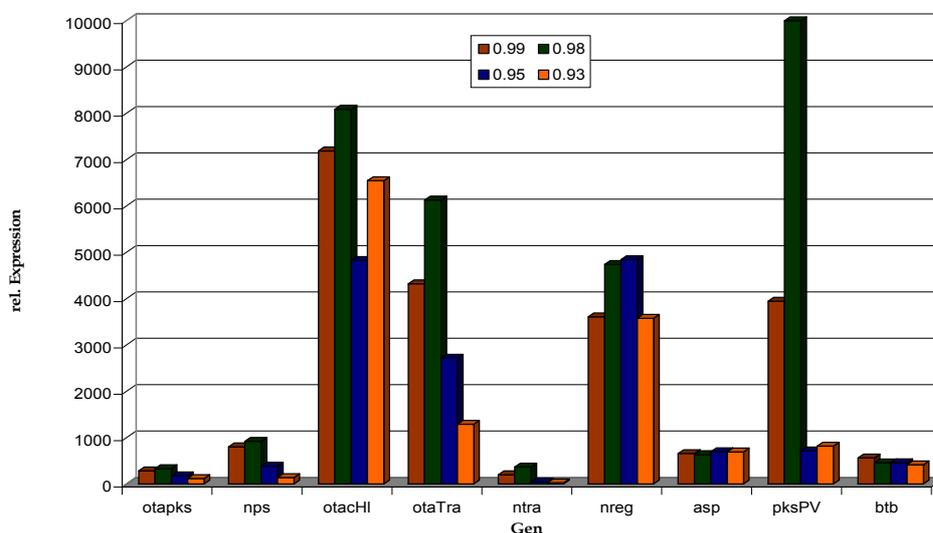


Abb. 63: Von der Wasseraktivität abhängiges Expressionsprofil in *P. verrucosum*. Expression der Gene des Ochratoxin A Biosyntheseclusters nach Inkubation unter verschiedenen a_w -Bedingungen. Balken zeigen relative Expression.

Nimmt man dazu noch die Toxinbiosynthese unter gleichen Bedingungen (Abb. 64), so fällt auf, dass hier Genexpressions- und Toxinbiosyntheseoptimum bei einer Wasseraktivität von 0.98 lagen. Die Gene des Clusters waren bezüglich der

Expressionsstärke sehr heterogen exprimiert. Die Wachstumsrate korrelierte nicht mit dem Optimum der Toxinbiosynthese.

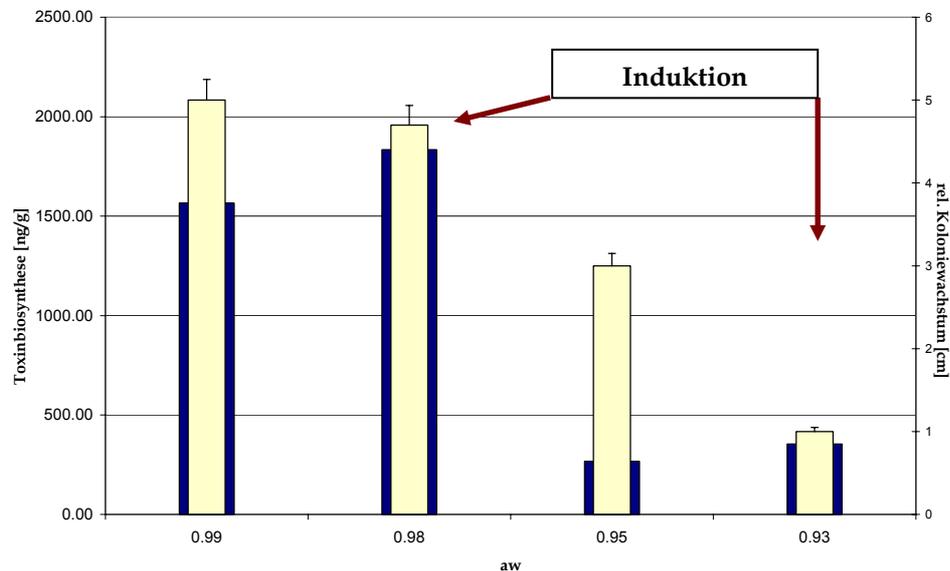


Abb. 64: Von der Wasseraktivität abhängiges Wachstum und Ochratoxin A Biosynthese in *P. verrucosum*. HPLC der Ochratoxin A Toxinbiosynthese in *P. verrucosum* nach Inkubation unter verschiedenen a_w -Bedingungen (blaue Balken). Relatives Koloniewachstum (gelbe Balken).

3.3.5.5 Einfluss der Temperatur in *Penicillium nordicum*: Nach der Wasseraktivität hat auch die Lagertemperatur einen bedeutenden Einfluss zumindest auf die Wachstumsgeschwindigkeit eines Schimmelpilzes. Außerdem ist dieser Faktor mit relativ geringem technischen Aufwand in der Lagerhaltung zu Ungunsten des Schimmelpilzwachstums modifizierbar. *Penicillium* wurde zur Untersuchung dieses Wachstumsfaktors auf YES Medium in unterschiedlich temperierten Brutschränken bei 15 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C inkubiert und auf differentielle Genexpression, sowie Toxinbiosynthese und Wachstum analysiert.

Wie auf folgender Abbildung dargestellt (Abb. 65), lag das Expressionsoptimum eines Großteils des Ochratoxinclusters bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C. Ein weiterer Nebenpeak war wieder am Ende des Messbereichs, hier bei 15 °C festzustellen.

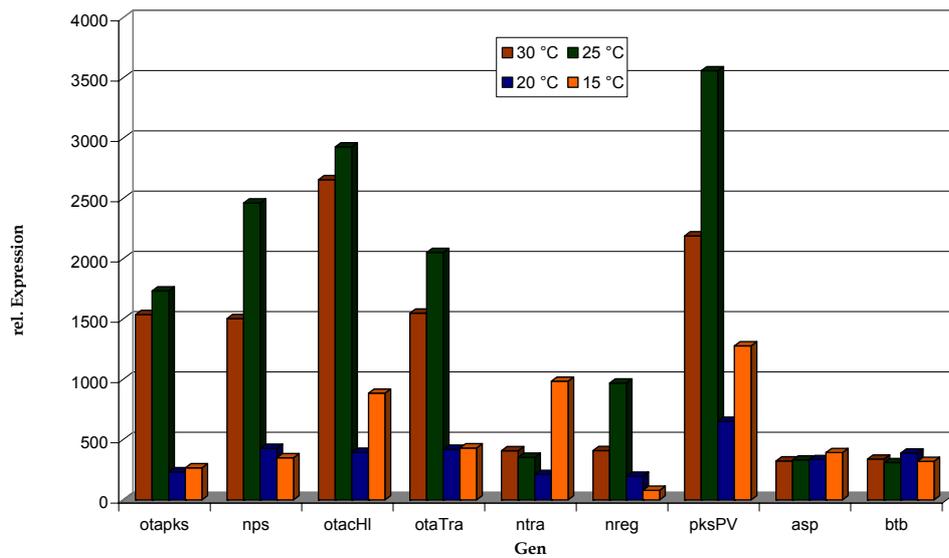


Abb. 65: **Temperaturabhängiges Expressionsprofil in *P. nordicum*.** Expression der Gene des Ochratoxin A Biosyntheseclusters nach Inkubation unter verschiedenen Temperaturen. Balken zeigen relative Expression.

Dem entsprechend lag die maximale Biosyntheseleistung an Ochratoxin A ebenfalls bei 25 °C (Abb. 66). Mit relativ großem Abstand folgten 30 °C, dann 15 °C bzw. 20 °C. Das Wachstumsoptimum lag bei 30 °C abfallend zu 15 °C.

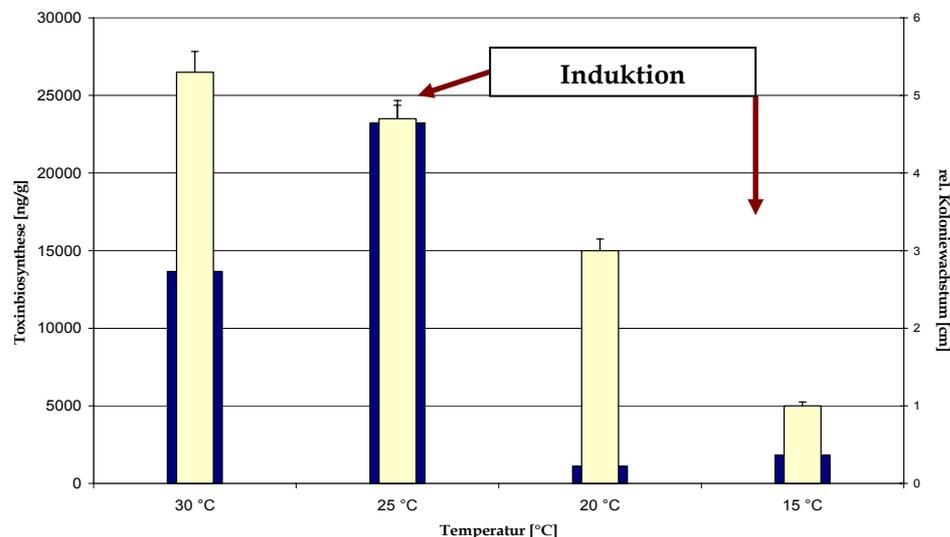


Abb. 66: **Temperaturabhängiges Wachstum und Ochratoxin A Biosynthese in *P. nordicum*.** HPLC des durch *P. nordicum* bei verschiedenen Temperaturen gebildeten Ochratoxin A (blaue Balken); Relatives Koloniewachstum (gelbe Balken).

3.3.5.6 Einfluss der Temperatur in *Penicillium verrucosum*: Bei *P. verrucosum* resultierten die gleichen Optima, jedoch war der Abstand bei ähnlichen

Expressionswerten (Abb. 67) zwischen 30 °C und 25 °C bezüglich der gebildeten Toxinmenge wesentlich geringer (Abb. 68). Der bisher obligatorische Nebenpeak trat auch bei diesem Stamm auf (15 °C):

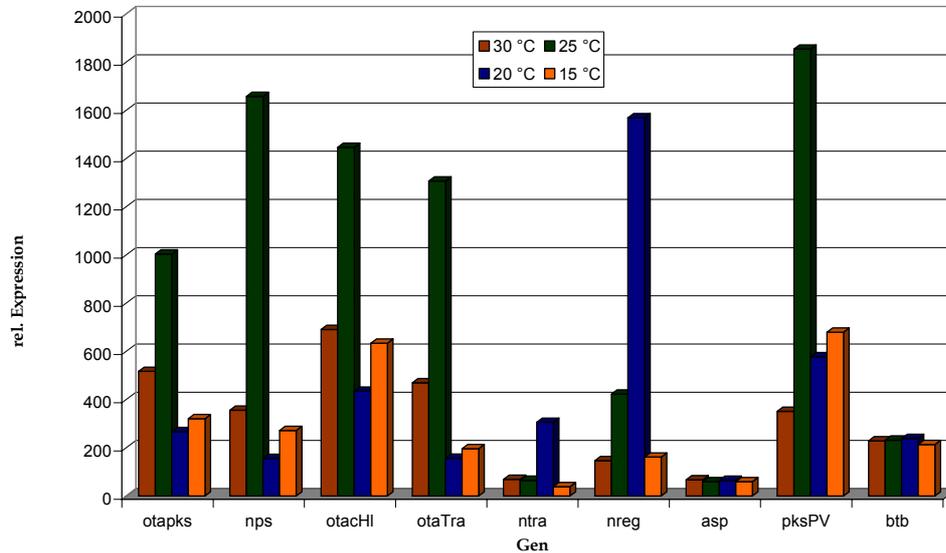


Abb. 67: **Temperaturabhängiges Expressionsprofil in *P. verrucosum*.** Expression der Gene des Ochratoxin A Biosyntheseclusters nach Inkubation unter verschiedenen Temperaturen. Balken zeigen relative Expression.

Auf der folgenden Abbildung sind die ermittelten Daten von Toxinbiosynthese und Koloniewachstum abgebildet (Abb. 68).

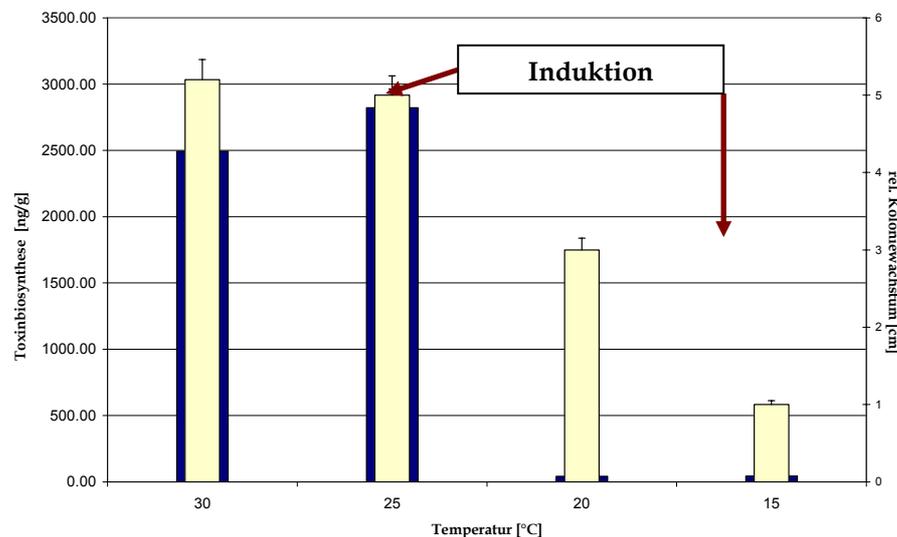


Abb. 68: **Temperaturabhängiges Wachstum und Ochratoxin A Biosynthese in *P. verrucosum*.** HPLC der Ochratoxin A Toxinbiosynthese in *P. verrucosum* nach Inkubation unter verschiedenen Temperaturen (blaue Balken). Relatives Koloniewachstum (gelbe Balken).

Nur geringe Mengen an Ochratoxin A wurden bei 15 °C gebildet, gefolgt von 20 °C, das Wachstumsoptimum lag bei 30 °C.

Wie in der nachfolgend aufgeführten Tabelle ersichtlich (Tab. 6), waren auch bei den beiden untersuchten Penicillien einige, jedoch nicht alle Gene mit der Toxinbiosynthese zum Probenahmezeitpunkt kongruent.

Tab. 6: Expressionsunterschiede innerhalb des Genclusters nach Wachstum von *P. nordicum* und *P. verrucosum* bei verschiedenen äußeren Einflussfaktoren. Dargestellt ist die faktorabhängige Korrelation einzelner Gene zur Toxinbiosynthese.

Stamm	Faktor /Optimum	zum Optimum der Toxinbiosynthese korrelierte Gene	zum Optimum der Toxinbiosynthese nicht korrelierte Gene	bei allen 3 Faktoren korreliert
<i>P. nordicum</i>	pH /pH6	<i>otapks, nps, otachl, otatra, nreg, pksPV</i>	<i>ntra, asp</i>	<i>otachl, pksPV, otatra, nreg</i>
	Temperatur /25 °C	<i>otapks, nps, otachl, otatra, nreg, pksPV</i>	<i>ntra, asp</i>	
	Wasseraktivität /0.99	<i>otachl, otatra, nreg, pksPV, asp</i>	<i>otapks, nps, ntra</i>	
<i>P. verrucosum</i>	pH /pH8	<i>otachl, nreg</i>	<i>asp, ntra, otatra, nps, otapks</i>	<i>otachl</i>
	Temperatur /25 °C	<i>otapks, nps, otachl, otatra, pksPV</i>	<i>ntra, nreg, asp</i>	
	Wasseraktivität /0.98	<i>otapks, nps, otachl, otatra, ntra, pksPV</i>	<i>nreg, asp</i>	

Bei *P. nordicum* korrelierten bei allen Einflussfaktoren die Gene *otachl*, *pksPV*, *otatra* und *nreg*. Bei *P. verrucosum* stimmte hingegen nur das Gen *otachl* mit der augenblicklichen Toxinbiosynthese überein. Dies lässt sich vielleicht durch die bivalente Toxinbildung erklären, da dieser Stamm außer Ochratoxin A auch das hier nicht quantifizierte Mykotoxin, Citrinin, bildet. Außerdem lässt sich diese geringe Gesamtübereinstimmung durch die Diskrepanzen während der pH-Analysen erklären. Während nahezu alle Gene unter Einfluss der anderen Faktoren mit der Toxinbiosynthese übereinstimmten, war bei diesem Faktor der Unterschied am ausgeprägtesten. Interessanterweise korrelieren auch hier, wie schon in *Fusarium* beobachtet, faktorabhängig unterschiedliche Sets an Genen.

3.3.5.7 Einfluss einer Kombination von zwei Faktoren in *Penicillium nordicum* und *Penicillium verrucosum*: In diesem Versuchsansatz wurden die Faktoren Wasseraktivität (a_w) und Temperatur in Kombination eingestellt und der jeweilige *Penicillium*-Stamm unter möglichst konstanten Bedingungen auf YES-Medium inkubiert. So sollte untersucht werden, ob sich simultan auftretende Parameter auch in *Penicillium* in der resultierenden Wirkung auf Genexpression und Toxinbiosynthese synergistisch potenzieren, um so die Toxinbiosynthese möglichst stark zu inhibieren. *P. nordicum* wurde hierzu auf einem Medium bei unterschiedlich eingestellter Wasseraktivität (0.99, 0.98, 0.95, 0.93) und Temperatur (30 °C, 25 °C, 20 °C, 15 °C) inkubiert und Proben genommen für Genexpressionsanalysen sowie Toxinanalytik. Unter der Kombination a_w -Wert 0.93 mit unterschiedlichen Temperaturen, konnte in *P. nordicum* nach dieser Zeitspanne jedoch bei keinem Temperaturwert ausreichend Biomasse gebildet werden, um eine adäquate RNA-Ausbeute zu erhalten, bei *P. verrucosum* nur bei den Kombination 20 °C, 25 °C und 30 °C mit einem a_w von 0.93, bei 15 °C nur bis zur Kombination 0.95.

Folgende Ergebnisse resultierten:

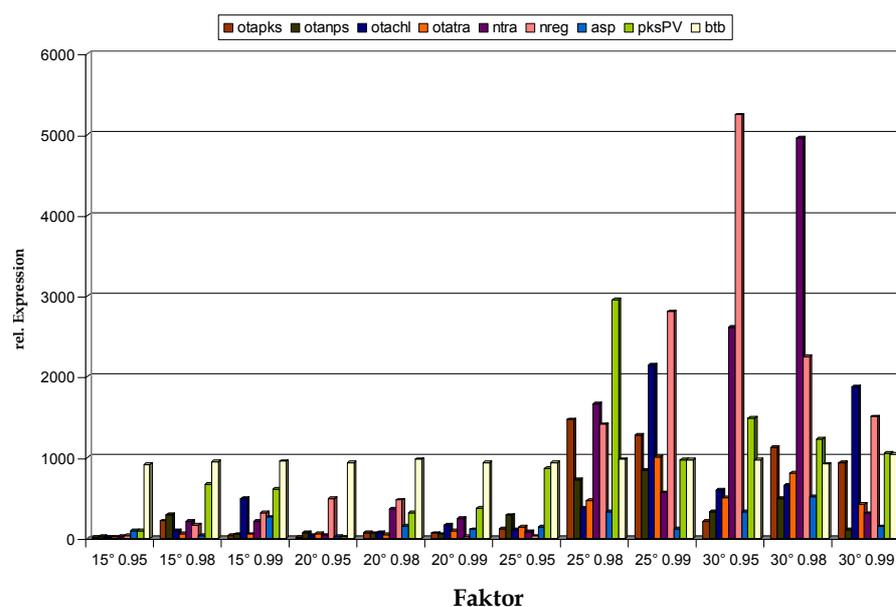


Abb. 69: Zweifaktorielle Genexpressionsanalyse von *P. nordicum*. Inkubation bei Kombinationen an a_w -Wert und Temperatur. 2-D-Ansicht.

Deutlich zu sehen in den Abbildungen 69 und 70, ist die starke Expression des Ochratoxingenclusters im Bereich um 25 °C – 30 °C bei einer Wasseraktivität von 0.99 bis 0.98.

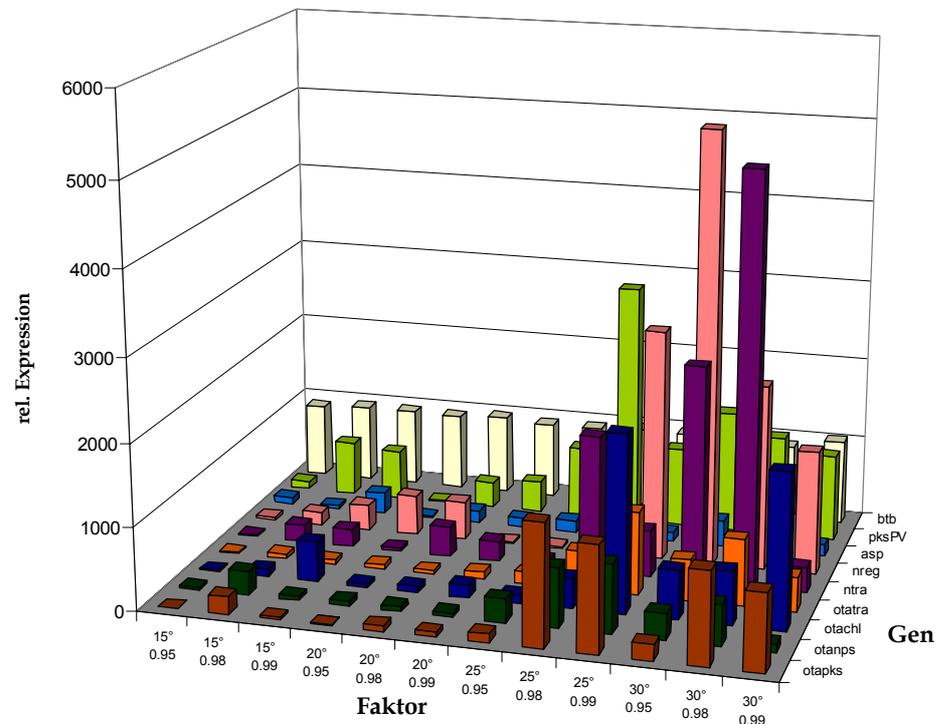


Abb. 70: 3-dimensionales Modell der Zweifaktoriellen Genexpressionsanalyse von *P. nordicum*. Inkubiert wurde bei Kombinationen an a_w -Wert und Temperatur.

Bei 15 °C konnte außerdem auch hier wieder ein schwächerer Zusatzpeak unter suboptimalen Wachstumsbedingungen bei den a_w -Werten 0.95-0.99 beobachtet werden.

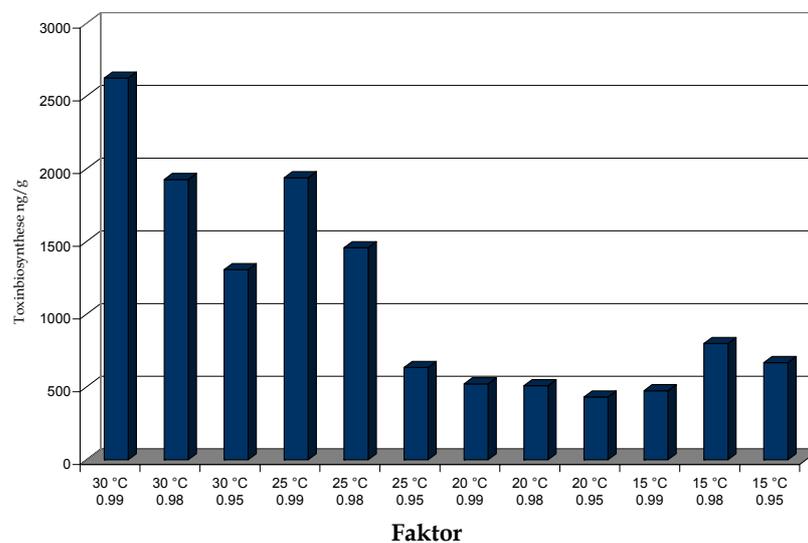


Abb. 71: Zweifaktorielle Toxinbiosyntheseanalyse von *P. nordicum* bei Kombinationen an a_w -Wert und Temperatur. HPLC-Analyse.

Anders hingegen sah es bei *P. verrucosum* aus (Abb. 72-74). Hier waren zwei deutlich abgegrenzte Bereiche starker Genaktivität auszumachen. Diese lagen zum einen nahe dem optimalen Wachstumsbereich zwischen den Kombinationen 25 °C mit einer Wasseraktivität von 0.93, bis zu 30 °C, bei einer Wasseraktivität von 0.99.

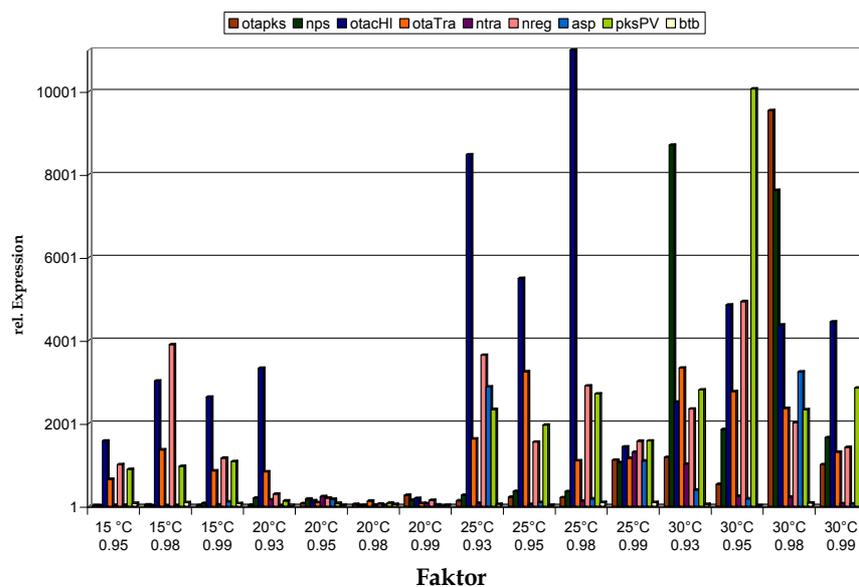


Abb. 72: **Zweifaktorielle Genexpressionsanalyse von *P. verrucosum*.** Inkubation bei Kombinationen an a_w -Wert und Temperatur. 2-D-Ansicht.

Zum anderen war auch in dieser kombinierten Anwendung von Faktoren ein Nebenpeakbereich um 15 °C/0.95 – 20 °C/0.93 zu beobachten.

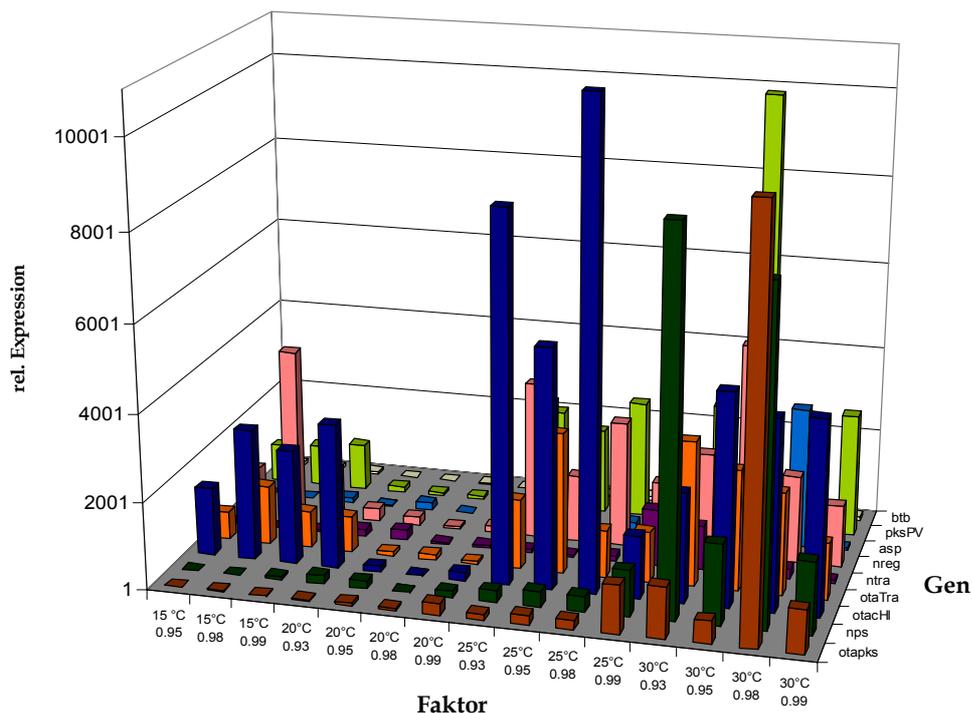


Abb. 73: **3-dimensionales Modell der Zweifaktoriellen Genexpressionsanalyse von *P. verrucosum*.** Inkubation bei Kombinationen an a_w -Wert und Temperatur.

Zwischen diesen beiden Peakbereichen starker Genexpression war nur eine rudimentäre Genaktivität auszumachen. Dies spiegelte sich in einer sehr geringen Mykotoxinbiosyntheseleistung in diesem Bereich wider (Abb. 74).

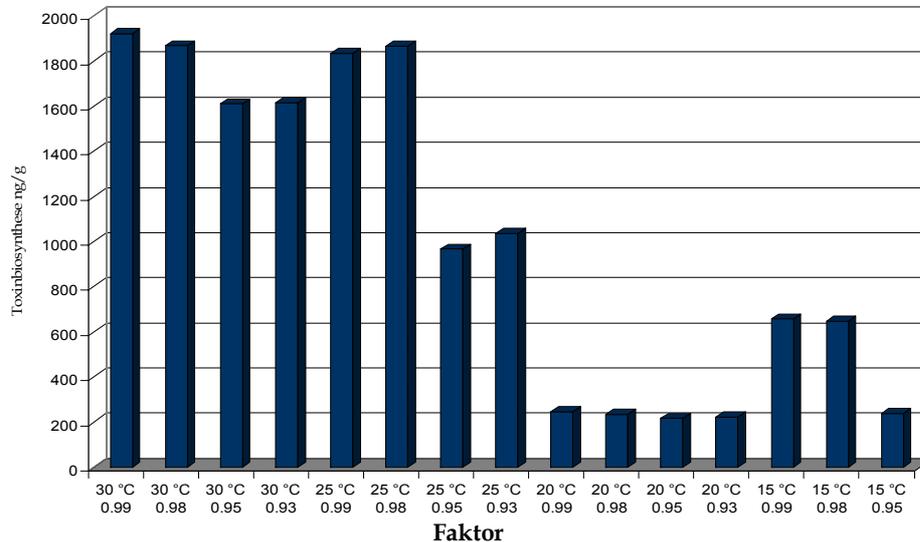


Abb. 74: Zweifaktorielle Toxinbiosyntheseanalyse von *P. verrucosum* bei Kombinationen an a_w -Wert und Temperatur. HPLC-Analyse.

Aus den erhaltenen Daten konnten für *Penicillium* folgende faktorabhängige Expressionsmodelle generiert werden, die jeweils die Bedingungen aufzeigen, die sich bezüglich der Mykotoxinbiosynthese als besonders fördernd auswirkten:

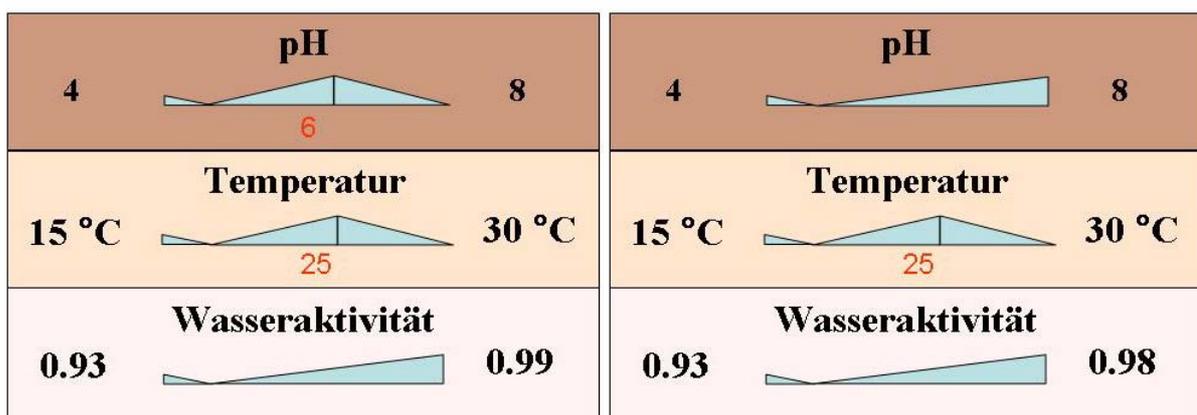


Abb. 75: Präventionsmodell *P. nordicum*. Faktorspezifische Toxinbiosyntheseoptima in *Fusarium culmorum*.

Abb. 76: Präventionsmodell *P. verrucosum*. Faktorspezifische Toxinbiosyntheseoptima in *Fusarium culmorum*.

Aus diesen Modellen lassen sich Bedingungen auswählen und in Kombination anwenden, die am wenigsten zu einer Aktivierung der Toxinbiosynthesegene

fürten, um so eine mögliche Toxinbildung bestenfalls vollständig zu verhindern. Für die Lagerhaltung wären so wichtige Erkenntnisse zur Verhinderung oder Verminderung einer Mykotoxinkontamination im Lebens- oder Futtermittel gewonnen worden:

3.3.5.8 Einfluss einer Kombination von drei Faktoren auf Genexpression und Mykotoxinbildung in *Penicillium nordicum*: Um den synergistischen Effekt verschiedener, gemeinsam auftretender, negativer und positiver Faktoren auf Mykotoxinbiosynthese und Wachstum auch in *Penicillium* zu untersuchen, wurde *P. nordicum* unter kombinierten Bedingungen inkubiert, welche sich laut den Präventionsmodellen als besonders vorteilhaft bzw. nachteilig bezüglich der Mykotoxinbiosynthese in diesem Stamm erwiesen hatten. Als die Toxinbildung induzierende Faktoren wurde eine Kombination aus pH6/25°C/ a_w 0.99 eingestellt, als am wenigsten die Genexpression induzierende Kombination pH5/20°C/ a_w 0.95.

Folgendes Genexpressionsprofil resultierte bei *P. nordicum*:

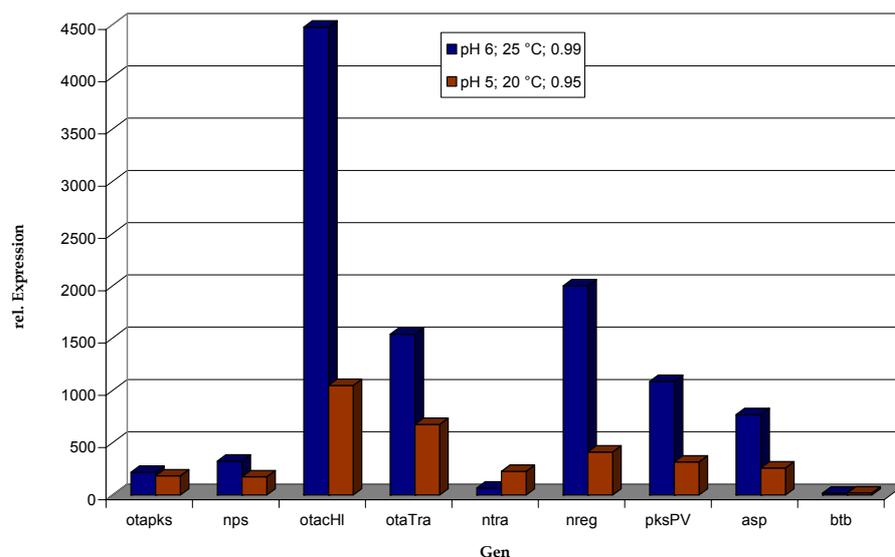


Abb. 77: Microarray Genexpressionsanalyse in *P. nordicum* bei einer Kombination an reprimierenden und fördernden Bedingungen. Auch in diesem Stamm traten synergistische Effekte der kombinierten Anwendung verschiedener Faktoren auf.

Auch bei *Penicillium* konnte die Expression der Mykotoxinbiosynthesegene unter einer Kombination an nichtinduzierenden Bedingungen stark reduziert werden (Abb. 77),

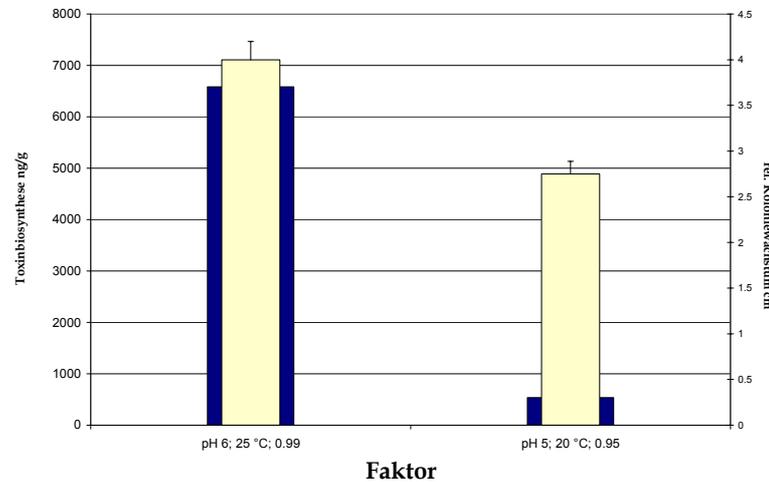


Abb. 78: Wachstum und Toxinbiosynthese von *P. nordicum* unter reprimierenden bzw. fördernden Bedingungen. HPLC-Analyse. Gelbe Balken zeigen das Koloniewachstum, blaue Balken die Toxinbiosynthese.

wohingegen es bei der kombinierten Anwendung von Bedingungen, die die Genexpression induzieren, zu einer erhöhten Mykotoxinbiosynthese kam (Abb. 78).

Wie schon bei *Fusarium* ließ sich auch bei dieser Spezies die phänotypische Toxinbiosynthese auf transkriptionaler Ebene anhand der Genaktivität des Biosyntheseclusters messen bzw. hatte einen prediktiven Charakter. Die Toxinbildung stimmte mit der Expression einiger, jedoch nicht aller Gene überein. Wachstumsoptimum und Toxinbiosyntheseoptimum korrelierten jedoch meist nicht miteinander. Quantität und Ausmaß der Genexpression zeugten oft, aber nicht immer von einer hohen Mykotoxinbiosyntheserate. Auch bei *Penicillium* konnten so genannte „Stress“-Expressionspeaks unter suboptimalen Bedingungen ausgemacht werden, so z. B. bei 15 °C. Offensichtlich ist eine durch moderaten Stress induzierte Expression der Mykotoxinbiosynthese eine generelle Reaktion bei allen untersuchten Einflussfaktoren.

3.3.6 Einfluss von Licht auf Genexpression und Toxinbiosynthese in *Penicillium verrucosum*: Die Untersuchung von Licht als weiteren Einflussfaktor, der sich auf Wachstum, Genexpression und Mykotoxinbildung filamentöser Pilze auswirken kann, ergab sich aus Beobachtungen in den vorhergehenden Genexpressionsanalysen. Die Expression der Mykotoxingene war unabhängig von der Natur des untersuchten Einflussfaktors und auch besonders zu beobachten während der Langzeitkinetiken einem oder mehreren Rhythmen bzw. Expressionsschwankungen unterworfen. Bei vielen Spezies, Prokaryonten wie Eukaryonten, haben sich zelluläre Systeme entwickelt, die periodisch ablaufen. Endogen basierte Rhythmen sind hierbei meist durch ernährungsphysiologische Abläufe charakterisiert, während eine circadian gesteuerte Rhythmik einen Organismus dazu befähigt, sich auf täglich regelmäßig wiederkehrende Phänomene einzustellen. Letztere ist meist an einen Lichtrezeptor gekoppelt, über den die circadiane Uhr angesteuert werden kann. Die Analyse der Regulation einer oszillierend ablaufenden Expression von Mykotoxigenen ist von elementarer Bedeutung vor allem für die Probennahme und Versuchsplanung bei Genexpressionsanalysen, da es von Bedeutung ist ob man sich auf Expressionsebene zum Zeitpunkt der Probennahme in einem Expressionswellental oder auf einem -Wellenkamm befindet. Völlig unterschiedliche Daten würden resultieren. Die Ursache dieser periodischen Schwankungen in der Expression der Mykotoxingene und die Differenzierung zwischen einem etwaig vorhandenen, endogen oder circadian basierten Rhythmus, sollte im Folgenden analysiert werden. Für die Versuche wurde *Penicillium verrucosum* ausgewählt. Dies aus zwei Gründen: Erstens ist die Toxinanalytik des von *P. verrucosum* produzierten Ochratoxin A relativ einfach ohne Vorderderivatisierung durchführbar, zweitens waren die Expressionsschwankungen hier besonders ausgeprägt und gleichzeitig relativ homogen. Mit diesem Stamm wurde nun zuerst eine 24-Stunden-Kinetik durchgeführt. Zuvor wurde *P. verrucosum* 3 Tage unter einem Hell-Dunkel-Intervall von je 12 Stunden inkubiert, damit er sich in einen etwaigen Rhythmus einpendeln kann. Für die Hellphasen wurde eine Vollspektrum-Tageslichtlampe

verwendet (siehe Methodenprotokoll). Außerdem wurde als Vergleichskontrolle eine entsprechende Charge im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf des Versuchs wurde aus den erhaltenen Myzelien die RNA isoliert, sowie mittels HPLC auf synthetisiertes Ochratoxin A analysiert. Mit den RNA-Populationen wurden Real Time PCR Expressionsanalysen des *otapksPV*-Gens durchgeführt, eines initialen Gens in der OTA-Biosynthese. Folgende Kinetik resultierte:

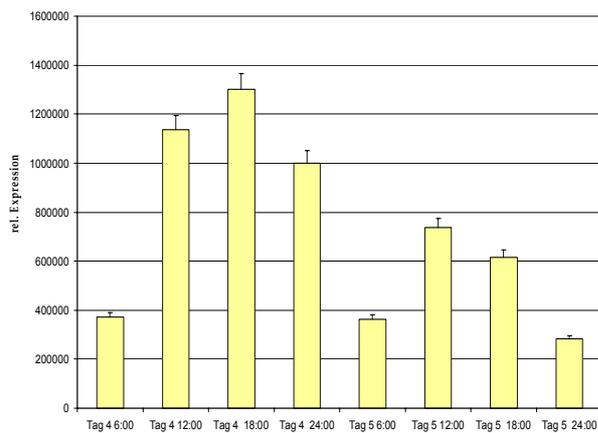


Abb. 79: 48 Stunden Genexpressionsanalyse des *otapksPV*-Gens in *P. verrucosum* (Hell/Dunkel). Gemessen wurde nach Wachstum unter 12 stündig alternierenden Hell-Dunkel Phasen.

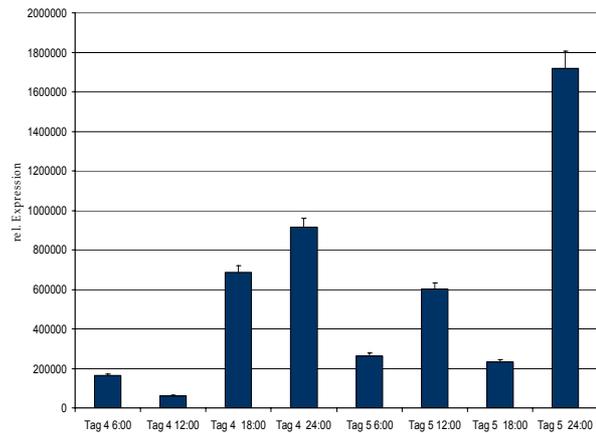


Abb. 80: 48 Stunden Genexpressionsanalyse des *otapksPV*-Gens in *P. verrucosum* (Dunkel). Gemessen wurde nach Wachstum in ständiger Dunkelheit.

Auf den Abbildungen 79 und 80 ist deutlich ein Unterschied in der Gleichmäßigkeit der Genexpression zwischen 48-stündiger Inkubation im Dunkeln im Vergleich zu alternierenden Hell-Dunkel-Phasen auszumachen. Die Expressionsschwankungen lassen sich folglich durch den Einfluss von Licht synchronisieren.

Im direkten Vergleich, hier über einen Zeitraum von 24 Stunden (Abb. 81), ließ sich deutlich beobachten, dass die Expression des *otapksPV*-Gens innerhalb der ersten 12 Stunden anstieg, um dann in den darauf folgenden 12 Stunden wieder abzufallen.

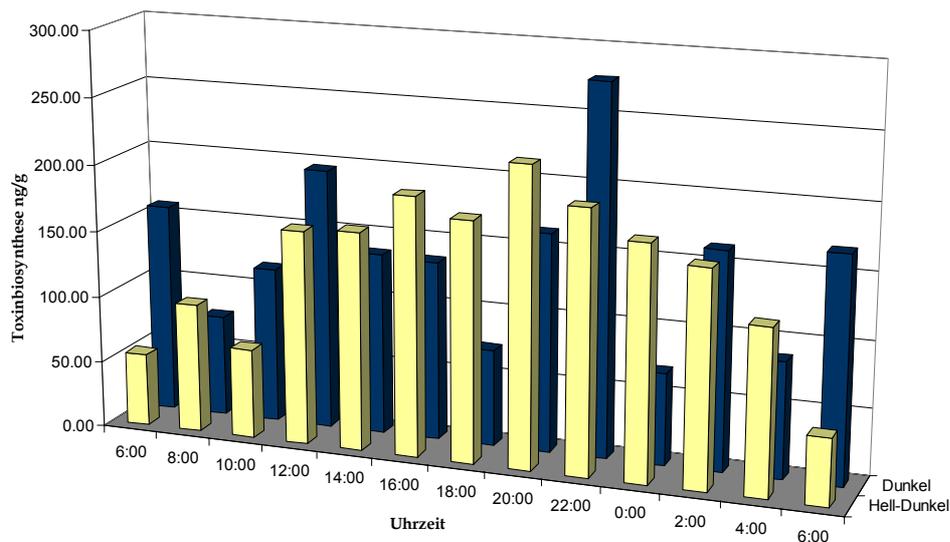


Abb. 81: **24 Stunden HPLC Analyse der Ochratoxin A Biosynthese in *P. verrucosum*.** Jeweils bei Wachstum unter 12 stündig alternierenden Hell-Dunkel Phasen, bzw. bei Wachstum in ständiger Dunkelheit.

Ebenso verhielt es sich mit der Biosynthese von Ochratoxin A. Hierbei waren leichte Schwankungen erkennbar, jedoch wurde die Kinetik der Toxinbiosynthese auch in kürzeren Abständen durchgeführt, was eine feinere Auflösung zuließ. Die Dunkelkontrolle war auf Expressions- und Toxinbiosyntheseebene vergleichsweise inhomogen, immer wieder von besonders starken oder schwachen Peaks unterbrochen.

3.3.6.1 Identifikation und Inaktivierung eines White-collar-1 Homologs in *P. verrucosum*: Um zu verifizieren, ob es sich um einen circadian basierten Regulationsmechanismus in *P. verrucosum* handelt, wurde nach Homologen von Genen gesucht, die in *Neurospora crassa* für diese Steuerung verantwortlich sind. Hierbei handelt es sich um die Gene *frq*, *wc-1* und *wc-2*. Funktionell fungiert *frq* (Frequency) in *N. crassa* als Uhrenkontrollgen, bei den Genen *wc-1* und *wc-2* (White-Collar) handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die zusammen einen lichtsensitiven, funktionsfähigen, heterodimeren Komplex bilden, der über ein Binden an den Promotor des *frq* -Gens die Aktivität von *frq* steuert. Die Transkription von *frq* wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch das eigene Transkriptionsprodukt oszillierend reguliert, die Transkription nachgeschalteter, uhrenkontrollierter Gene wird durch diese Rhythmik

gleichfalls induziert beziehungsweise reprimiert. Genomische DNA von *P. verrucosum* wurde hierzu mit Primern gescreent, die spezifisch für die genannten Gene in *N. crassa* sind. Begonnen wurde mit dem Transkriptionsfaktor White-Collar-1. Es wurden Primer aus der *wc-1* Sequenz von *N. crassa* abstrahiert und mit diesen eine PCR mit genomischer DNA von *P. verrucosum* durchgeführt. Hierbei resultierte ein Amplifikat ähnlicher Größe im Vergleich zu *N. crassa* (Abb. 82).

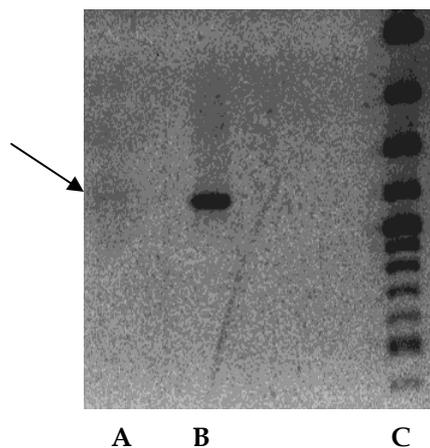


Abb. 82: PCR bei 55 °C mit *wc1*-Primern. Die Primer wurden aus dem *wc1*-Gen von *N. crassa* generiert. A = *P. verrucosum* B = *N. crassa*, C = Größenstandard.

Die DNA dieser PCR-Bande (Abb. 82, Pfeil) wurde aus dem Gel wiedergewonnen, aufgereinigt und in einen Vektor kloniert. Dann wurde mittels Pilztransformation das dazugehörige Gen durch homologe Rekombination in *Penicillium verrucosum* inaktiviert. Dies resultierte in einer leicht größeren Bande in der nachfolgenden Southern-Blot-Hybridisierung. (Abb. 83, Pfeil).

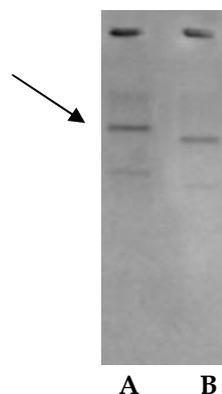


Abb. 83: Southern-Blot-Hybridisierung der *wc-1*-Amplifikation bei 55 °C. A = *wc-1(-)* Transformante B = *P. verrucosum* Wildtyp mit einer aus dem *wc-1*-PCR-Produkt generierten Sonde.

Gleiche Beobachtungen machte auch Linnemannstöns (Linnemannstons *et al.*, 2002) bei der Inaktivierung von Genen der Karotinoidbiosynthese durch homologe Rekombination in *Fusarium fujikuroi*. Anschließend wurden Homologe

des Transkriptionsfaktors *wc-2* und des Uhrenkontrollgens Frequency (*frq*) auf gleiche Weise identifiziert (Abb. 84-1 und Abb. 84-2).

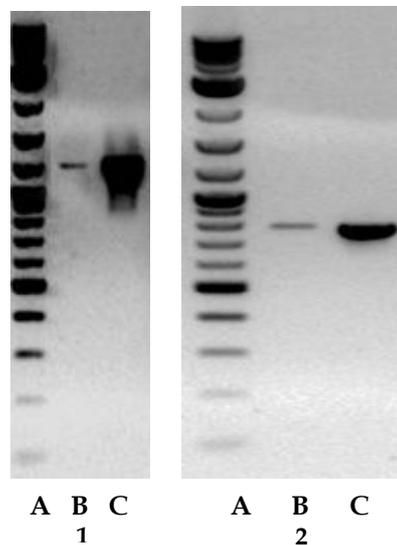


Abb. 84: PCR-Reaktion bei 55 °C mit *wc-2* und *frq*-Primern.

- 1) A = Größenstandard, B = *wc-2* Homolog in *P. verrucosum*, C = *wc-2* in *N. crassa*.
- 2) A = Größenstandard, B = *frq* Homolog in *P. verrucosum*, C = *frq* in *N. crassa*

Die Geninaktivierung von *wc-1* sollte zu einer veränderten Licht-Dunkel-Reaktion führen. Es handelt sich bei diesem Gen um einen Lichtrezeptor, zudem ist es essentiell für einen funktionellen WCC-Komplex (Cheng, 2003). Dies konnte eingeschränkt bestätigt werden, da die Inaktivierung bisher nicht stabil ist. Interessanterweise synthetisiert die $\Delta wc1$ -Transformante das Mykotoxin Ochratoxin A in signifikant höheren Ausmaß im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 85).

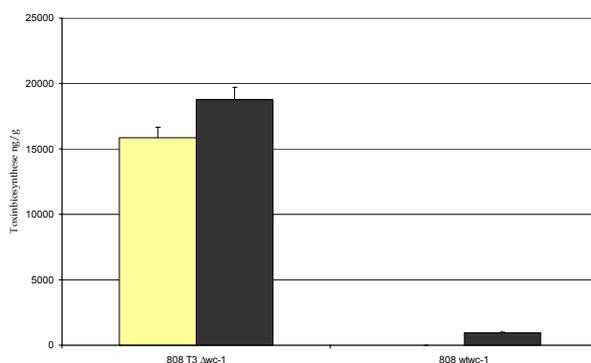


Abb. 85: OTA-Biosynthese Wildtyp vs. $\Delta wc1$ im Licht bzw. im Dunkeln. Vergleich der Ochratoxin A Biosynthese des Wildtyps und der $\Delta wc1$ -Transformante, jeweils unter Licht (gelbe Balken) oder im Dunkeln (schwarze Balken).

Dies deutet auf eine *wc-1* abhängige Regulation der Ochratoxin A Biosynthese hin. Offensichtlich wird die Transkription der Gene des Ochratoxinclusters durch

den WCC-Komplex reguliert. Die Gene der Ochratoxinbiosynthese gehören möglicherweise zu den so genannten uhrenkontrollierten Genen (ccg).

3.3.6.2 Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Lichtwellenlängen auf *P. verrucosum*: Um zu verifizieren, auf welcher Wellenlänge des Lichtspektrums dieser Einfluss basiert, wurde *P. verrucosum* unter Lichtquellen mit definierten Wellenlängen inkubiert und auf Veränderungen bezüglich Wachstum und Toxinbiosynthese analysiert. Um sekundäre Einflussfaktoren zu minimieren, wurde die Inkubation in einem Phytotron mit voreingestellter Temperatur (25 °C) und Luftfeuchte (70 %) durchgeführt. Zu Beginn wurden die Kolonien für 3 Tage im Dunkeln inkubiert, danach wurden sie jeweils unter unterschiedlichen Plexiglasplatten mit definierter Wellenlängentransmission (Blau, Rot, Gelb) weiter inkubiert (siehe Methodenprotokoll), bzw. im Dunkeln belassen. Folgende Abbildung zeigt die Resultate dieser Untersuchung (Abb. 86).

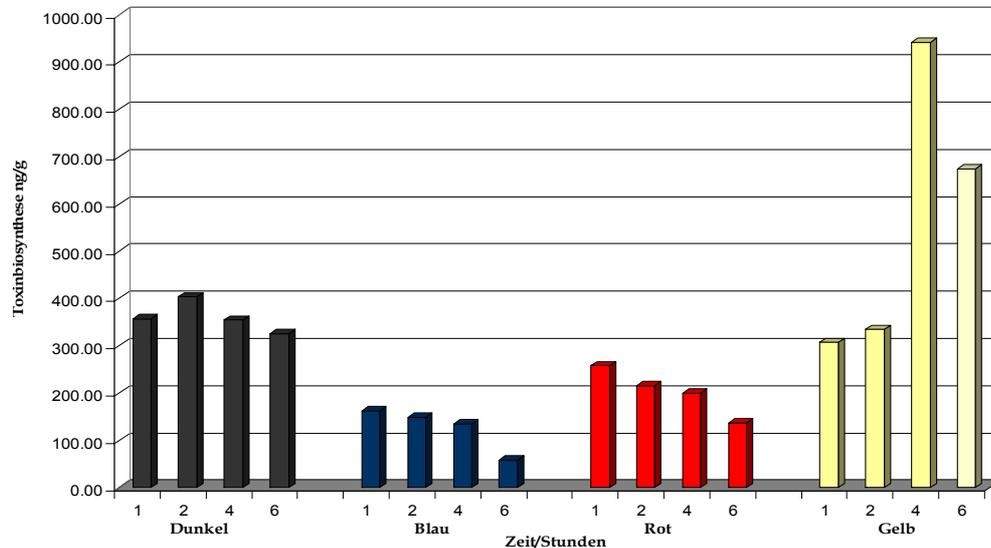


Abb. 86: OTA-Bildung in *P. verrucosum* bei verschiedenen Wellenlängen. HPLC-Analyse auf Ochratoxin A. *P. verrucosum* wurde 3 Tage im Dunkeln bei 25 °C inkubiert und dann entweder im Dunkeln belassen oder unter Licht verschiedener Wellenlänge für 6 Stunden weiterinkubiert.

Wie sich herausstellte wurde die Biosynthese des Mykotoxins Ochratoxin A durch die Wellenlängen Blau (~390-460 nm) und Rot (~600-650 nm) unterschiedlich stark reprimiert, während es unter Gelblicht (~575 nm) sogar zu

einer gesteigerten Bildung des Mykotoxins kam. Erstaunlicherweise nahm die Gesamttoxinsmenge unter Einfluss des Blaulichts und Rotlichts sogar ab. Wurden die Platten unter der jeweiligen Lichtquelle belassen, so kam es unter Blaulichteinfluss zu keiner signifikanten Größenzunahme bezüglich des Kolonieradius. Der Pilz hatte offensichtlich sein Wachstum eingestellt. Bei Rotlicht war dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt, es war jedoch ein vermindertes Wachstum beobachtbar. Bei Gelblicht hingegen proliferierte die Kolonie rascher im Vergleich zur Dunkelkontrolle. Um den Einfluss des Blaulichtes als den am stärksten reprimierenden Wellenlängenbereich auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurden Kolonien dieses Stammes jeweils im Dunkeln für 3 Tage inkubiert und dann entweder unter Blaulicht für 4 Stunden weiter inkubiert, oder im Dunkeln belassen. Nach jeweils 1, 2, 3 und 4 Stunden wurden Proben genommen, um Expressionsänderungen innerhalb des Ochratoxin A Biosyntheseclusters mit dem Mikroarray zu analysieren (Abb. 87 und 88).

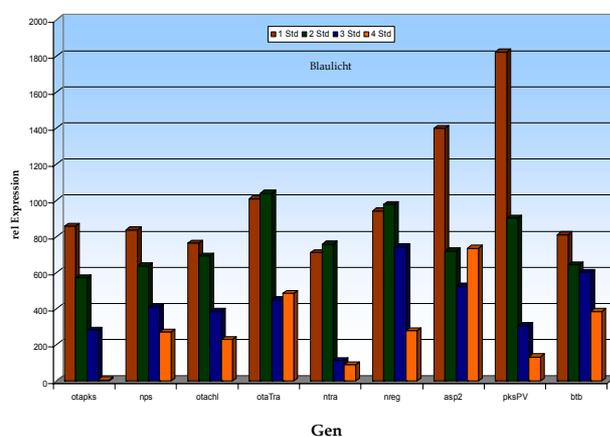


Abb. 87: Mikroarray Genexpressionsanalyse von *P. verrucosum* in Blaulicht. Die Probennahme erfolgte nach 1, 2, 3 bzw. 4 Stunden Inkubation unter Blaulicht.

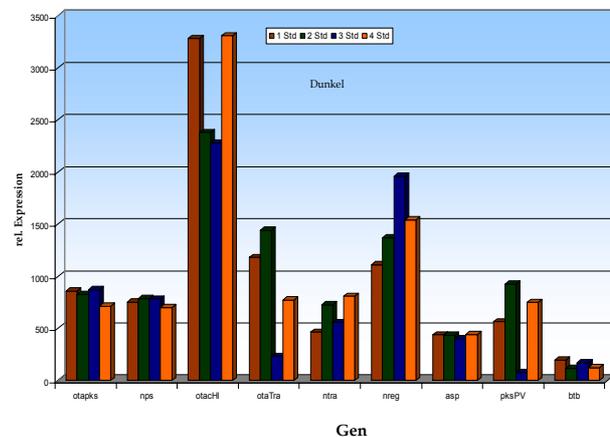


Abb. 88: Mikroarray Genexpressionsanalyse von *P. verrucosum* im Dunkel. Die Probennahme erfolgte nach 1, 2, 3 bzw. 4 Stunden Inkubation im Dunkeln.

Wie deutlich anhand der unterschiedlichen Expressionsstärke zu sehen, kam es nach dem Überführen der *P. verrucosum* in das Blaulicht zu einer konzertierten Repression der Genexpression des Ochratoxin A Clusters. Selbst die üblicherweise relativ konstitutiv exprimierten Kontrollgene Betatubulin (*btb*) und alkalische Serinprotease (*asp*) wurden reprimiert. Dies spricht für eine generelle

Hemmung des Organismus nicht nur auf Sekundärmetabolitebene. Wurde die Inkubation von *P. verrucosum* nach Auskeimen der Sporen unter 5 Watt Leuchtdioden fortgesetzt, einer wesentlich stärkeren Lichtquelle im Vergleich zur Plexiglastransmission (Abb. 89), so kam es im Vergleich zur Dunkelkontrolle (Abb. 89 A) zu einer moderaten Inhibierung des Wachstums und der Toxinbiosynthese im Rotlicht (Abb. 89 B) und zu einer starken Inhibierung von Wachstum und Toxinbiosynthese im Blaulicht. Interessanterweise kam es dabei nur zu der Ausbildung eines glasartigen Myzels ohne sichtbare Sporenbildung (Abb. 89 C).

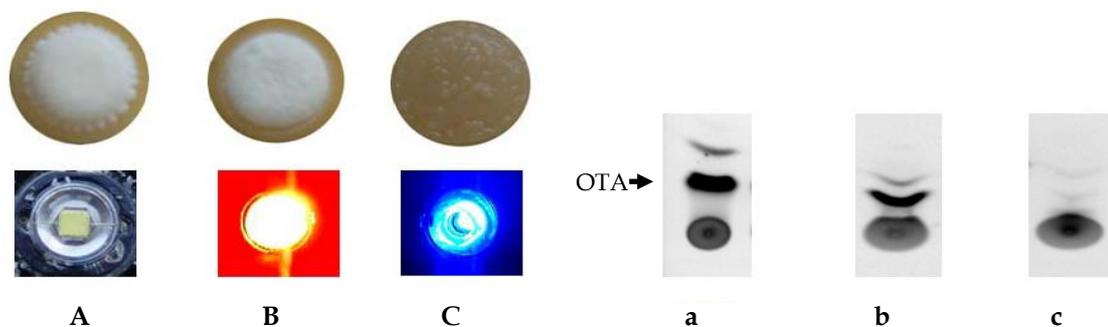


Abb. 89: *P. verrucosum*, Inkubation unter verschiedenen Wellenlängen. *P. verrucosum* wurde jeweils für 5 Tage inkubiert im Dunkeln (A), unter einer Rotlicht-Diode (B) und unter einer Blaulicht-Diode (C). a,b,c kennzeichnen die mit Dünnschichtchromatographie ermittelte jeweils gebildete Ochratoxin A Menge.

3.3.6.3 Untersuchung der Sensitivität des OTA-Moleküls gegen Blaulichtbestrahlung: Wurde ein Ochratoxinstandard (4 ng/ml) mit einer Blaulicht-Diode bestrahlt, so kam es innerhalb von 24 Stunden zu einer signifikanten Degradierung des Ochratoxin A im Vergleich zur Dunkelkontrolle (Abb. 90).



Abb. 90: Blaulichtbestrahlung einer Ochratoxin A Lösung. Eine 1 ml OTA-Lösung (4 ng/ml) wurde für 24 Stunden in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß mit einer Blaulicht-Diode bestrahlt.

Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Wachstum, Genexpression und Toxinbiosynthese filamentöser Pilze durch Licht

verschiedener Wellenlänge im unterschiedlichen Ausmaß beeinflussbar ist. Außerdem zeigte sich das Ochratoxin A Molekül sensitiv für Licht im blauen Frequenzband um 390-450 nm.

3.3.7 *In vivo*-Anwendungen des Mycochip:

3.3.7.1 Nachweis von *Fusarium* in Weizen mit Mikroarray und Real Time PCR:

Die bisherigen Untersuchungen beschränkten sich auf den *in vitro*-Versuche. Besonders interessant ist jedoch die Durchführung von Mikroarrayanalysen direkt mit Lebensmittelmatrizes. Um den entwickelten Mycochip unter *in vivo*-Bedingungen zu testen, wurde eine visuell nicht sichtbar kontaminierte Probe aus dem Ihinger Versuchshof (Versuchsstation Ihinger Hof, 71272 Renningen) mit einem Deoxynivalenolgehalt über dem gesetzlich zulässigen Grenzwert verwendet. So sollte überprüft werden, ob der Mycochip eine ausreichende Sensitivität bezüglich Schimmelpilz-RNA aufweist, die direkt aus kontaminierter Lebensmittelmatrix gewonnen wurde, ohne eine vorherige Vermehrung des Pilzes auf Labormedium. Dies im Vergleich zu einer Probe gleichen Ursprungs, bei der der Toxingehalt weit unter diesem Grenzwert lag. Welche der beiden Proben stark belastet ist, war vorher nicht bekannt (Abb. 91).

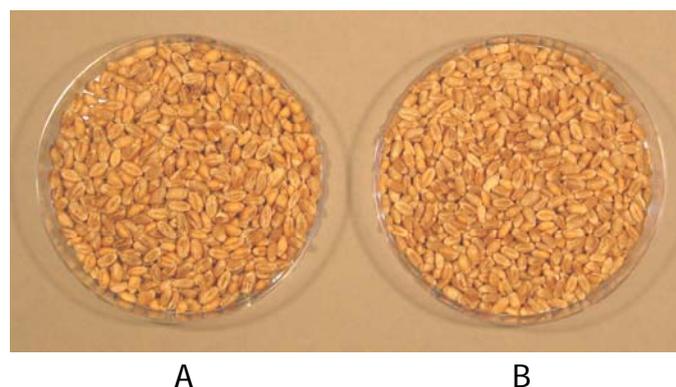


Abb. 91: **Weizenproben des Ihinger Versuchshofs.** A : belastete Probe; B: Referenzprobe. Eine Kontamination war mit bloßem Auge nicht zu erkennen.

Die aus diesen Proben gewonnene Pilz-RNA wurde nach reverser Transkription in cDNA, jeweils mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung gegen die Sonden

des Mikroarray hybridisiert. Wie auf Abbildung 92 deutlich zu erkennen ist, wurden die Gene des Clusters der Trichothecenbiosynthese nur in der kontaminierten Weizenprobe exprimiert, wenn auch nur auf einem relativ niedrigen Level, was sich jedoch mit der geringen Ausbeute an RNA erklären lässt (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Bemerkenswerter Weise kam es zu keinen Kreuzhybridisierungen zwischen der Weizen-RNA und den Gensonden auf dem Array.

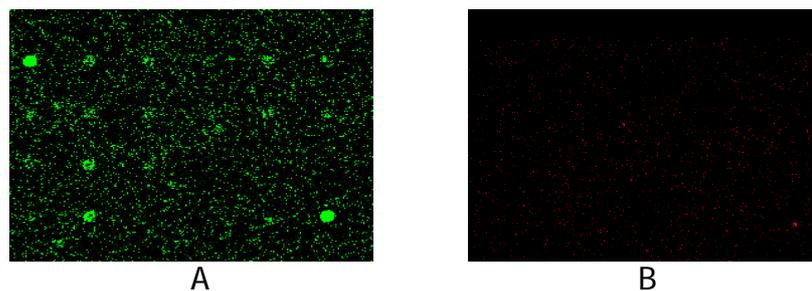


Abb. 92: **Mikroarray Expressionsanalyse von Weizenproben.** Analyse des Trichothecengenclusters: Weizenproben Ihinger Versuchshof. **A** : belastete Probe; **B**: Referenzprobe.

Um die Expressionsergebnisse mit einer anderen Methode abzusichern, wurde eine Real Time PCR mit Primern durchgeführt, die spezifisch für die Gene *tri5*, *tri12* und *tri101* des Trichothecenclusters von *Fusarium* sind (Abb. 93):

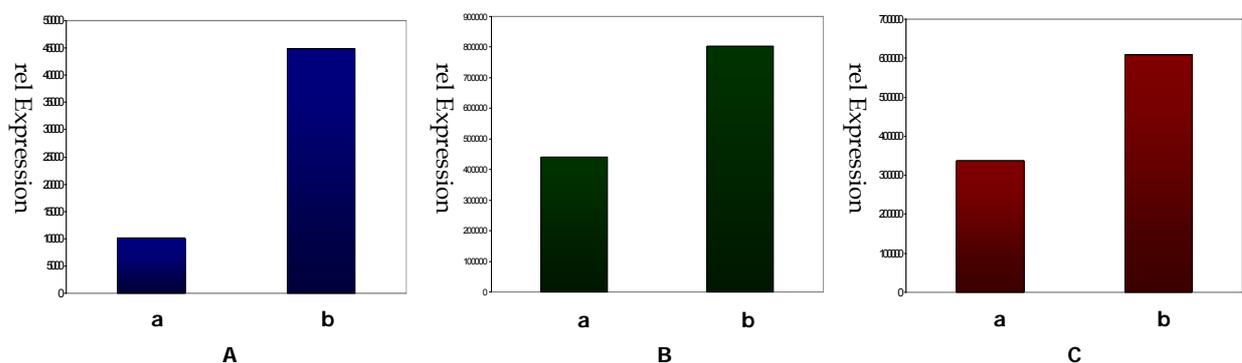


Abb. 93: **Real Time PCR Expressionsanalyse von Weizenproben.** Analyse der Gene *tri5* **A**, *tri12* **B**, *tri101* **C**, jeweils mit wenig belasteter Probe **a** und stark belasteter Probe **b**.

Außerdem wurde die gebildete Toxinmenge semiquantitativ mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen.

Wie in Abbildung 94 deutlich ersichtlich, konnte die stärker belastete Probe mit beiden Methoden eindeutig identifiziert werden.

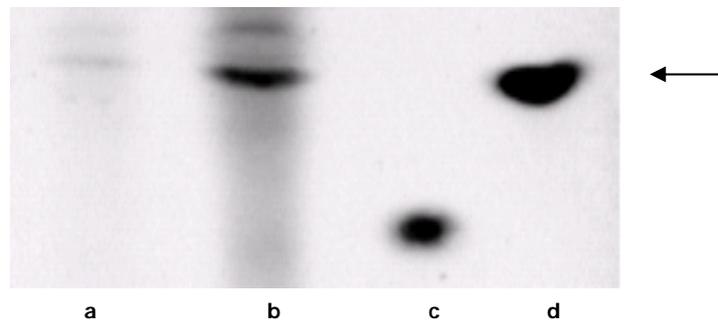


Abb. 94: **Dünnschichtchromatographie von Weizenproben.** DC-Analyse Jeweils der wenig belasteten Probe a und stark belasteten Probe b, Nivalenol Standard c, Deoxynivalenol Standard d (Pfeil).

Die Expression der Mykotoxinbiosynthesegene korrelierte außerdem proportional mit der jeweils gebildeten Toxinmenge. Durch direktes Vergleichen der Expressionsdaten, die mit Mikroarray bzw. Real Time PCR gewonnenen worden waren, lässt sich folgern, dass die Detektion von Expressionsignalen bei sehr geringer RNA-Menge (0,1 – 0,5 µg/µl, bzw. 10 – 50 µg Gesamt-RNA, also 0,4 – 2 µg mRNA) mit Real Time PCR sensitiver möglich ist. Aus diesem Grund ließ sich auch in der wenig belasteten Probe eine Expression der Gene nachweisen, wenn auch auf deutlich niedrigeren Niveau im Vergleich zu der stärker belasteten Probe.

3.3.7.2 Nachweis von *P. verrucosum* in Weizen mit PCR, Real Time PCR und Mikroarray: Weizen wird meist in großen Silos gelagert. Diese Silos sind konstruktionsbedingt üblicherweise gut durchlüftet, es kann jedoch immer wieder zu Feuchte-Nestern bzw. Feuchtwerden des Saatguts kommen. Oft kommt es außerdem durch die natürliche Kornatmung zu einer erhöhten Temperatur und Luftfeuchte im Lagersilo, so können optimale Bedingungen für das Wachstum von toxinbildenden Schimmelpilzen entstehen. Der Ansatz dieses Versuchs war, eine Kontamination von Weizenkörnern mit dem Lagerpilz *P. verrucosum* mit einer bestimmten relativen Feuchte im Getreidekorn zu identifizieren und außerdem mit einer aktiven Toxinbiosynthese zu korrelieren. Dazu waren Primer von einer Polyketidsynthase von *Monascus purpureus*

abstrahiert worden. Mit diesen wurde nach Art eines homologen Screenings in genomischer DNA von *P. verrucosum* ein homologes Fragment gefunden (Abb 95/A2). Durch Inaktivierung des identifizierten homologen Gens in *P. verrucosum*, konnte dieses funktionell als OTA-Polyketidsynthase klassifiziert werden. Nach der Inaktivierung wurde OTA nur noch in sehr geringen Mengen, eventuell über einen alternativen Biosyntheseweg gebildet, während die Citrininbiosynthese weitgehend unbeeinflusst blieb (Abb. 95/B3).

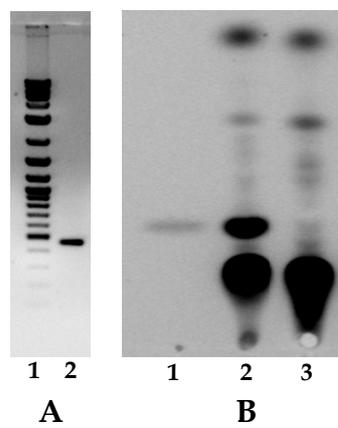


Abb. 95: PCR mit spezifischen Primern für das *otapksPV*-Gen. **A1** DNA-Leiter, **A2** positives PCR Produkt mit den spezifischen Primern für die Polyketidsynthase der OTA-Biosynthese in *P. verrucosum*. Dieses PCR-Produkt wurde sequenziert, und das dazugehörige Gen mittels homologer Rekombination inaktiviert. **B1** OTA-Standard, **B2** *P. verrucosum* Wildtyp, **B3** *P. verrucosum* Δ *otapksPV*-Transformante. Es wird nur noch Citrinin gebildet (dunkler Bereich unter der OTA-Linie).

Aus dem sequenzierten homologen Genfragment wurden dann für *P. verrucosum* spezifische *otapksPV*-Primer (Abb. 96) generiert.



Abb. 96: Teilsequenz der Polyketidsynthase in *P. verrucosum*. Mit diesen spezifischen Primern (grau unterlegt) kann *P. verrucosum* in Weizenkörnern selektiv ab einer KBE-Konzentration von 10^4 nachgewiesen werden.

Um die Spezifität dieser Primer für *P. verrucosum* zu testen, wurden verschiedene Vertreter von *Penicillium* und *Aspergillus* mittels PCR auf mögliche Kreuzhybridisierungen getestet (Tab. 7).

Tab. 7: PCR Reaktionen mit den in *P. verrucosum* spezifischen *otapks*PV Primern. Mit dieser PCR, sollte die Spezifität der Primer anhand verschiedener Penicillien demonstriert werden. Keinen unspezifischen Kreuzreaktionen traten auf, mit Ausnahme des nahe verwandten Ochratoxin A-bildners *P. nordicum*.

Spezies	PCR Reaktion	Spezies	PCR Reaktion
<i>P. verrucosum</i> BFE500	+	<i>P. viridicatum</i> BFE481	-
<i>P. nordicum</i> BFE487	+	<i>P. crustosum</i> BFE573	-
<i>P. nordicum</i> BFE752	+	<i>P. commune</i> BFE574	-
<i>P. nordicum</i> BFE751	+	<i>P. citreonigrum</i> BFE659	-
<i>P. nordicum</i> BFE754	+	<i>P. citrinum</i> BFE660	-
<i>P. verrucosum</i> BFE501	+	<i>P. glabrum</i> BFE661	-
<i>P. verrucosum</i> BFE491	+	<i>F. solani</i> BFE227	-
<i>P. verrucosum</i> BFE495	+	<i>F. moniliforme</i> BFE312	-
<i>P. verrucosum</i> BFE497	+	<i>F. poae</i> BFE324	-
<i>P. nalgiovense</i> BFE66	-	<i>F. proliferatum</i> BFE347	-
<i>P. camemberti</i> BFE137	-	<i>A. carbonarius</i> BFE640	-
<i>P. chrysogenum</i> BFE141	-	<i>A. niger</i> BFE631	-
<i>P. italicum</i> BFE45	-	<i>A. ochraceus</i> BFE635	-

Wie aus den in Tabelle 7 aufgelisteten Ergebnissen hervorgeht, kam es nur mit *P. nordicum*, ebenfalls einem Ochratoxin-A-Bildner, zu einer Kreuzamplifikation mit den *otapks*-Primern von *P. verrucosum*. Für den eigentlichen Versuch wurden nun Weizenproben verwendet, die in 6 Liter Versuchssilos jeweils bei 14%, 19% und 24% rel. Kornfeuchte gelagert worden waren. Es wurden die KBE in diesen Proben bestimmt und unter Verwendung der *otapks*-Primer eine PCR durchgeführt (Abb. 97).

Folgendes Ergebnis resultierte:

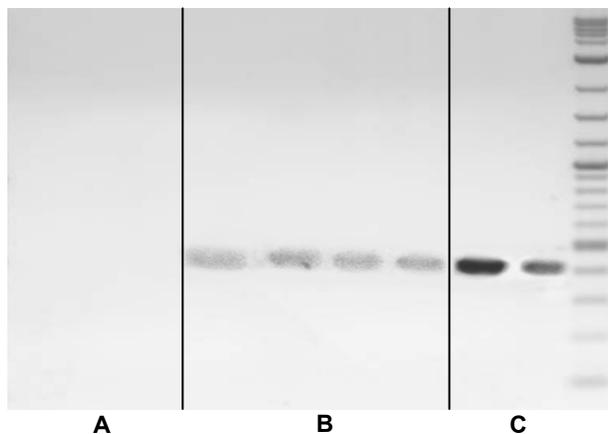


Abb. 97: PCR der analysierten Weizenproben mit spezifischen Primern für das Polyketidsynthasegen *otapksPV* von *Penicillium verrucosum*. **A:** Weizen der mit Sporen von *P. verrucosum* (10^2 /g) kontaminiert wurde, Wachstum bei 14% rel. F. **B:** Weizen mit einer PV-Sporenkonzentration von 10^3 /g, Wachstum bei 19% rel. F. **C:** *P. verrucosum*, *P. nordicum*. Selektiver Nachweis ab einer KBE von 10^3 /g nach Wachstum bei einer rel. F. von 24%. Kreuzreaktion nur mit dem nahe verwandten Stamm *P. nordicum*.

Wie auf Abbildung 97 zu sehen ist, konnte der selektive Nachweis einer Kontamination mit *P. verrucosum* ab einer Sporenkonzentration von 10^3 /g erfolgen. Diese Konzentration wurde erreicht, wenn die Weizenkörner eine rel. Kornfeuchte von mindestens 19% aufwiesen.

Zum Nachweis der Kontamination mit Mikroarray und Real Time PCR wurde jeweils RNA aus einer nichtkontaminierten Weizenprobe gewonnen, sowie aus einer Weizenprobe, die zuvor mit Sporen von *P. verrucosum* inokuliert worden war und dann 58 Tage bei 25 °C inkubiert wurde (Abb. 98).



Abb. 98: Weizenkörner kontaminiert mit Sporen von *P. verrucosum* **A**, bzw. nicht kontaminiert **B**. Die Kontamination war mit bloßen Augen kaum zu erkennen.

Von der kontaminierten Weizenprobe wurden regelmäßig Aliquots genommen und nach Ablauf der Inkubationszeit mit den, für *P. verrucosum* spezifischen Primern eine Real Time PCR-Expressionskinetik durchgeführt, sowie eine HPLC

gestützte Analyse auf Ochratoxin A. Die Expression des *otapksPV*-Gen wurde hierbei über einen Zeitraum von 42 Tagen verfolgt (Abb. 99):

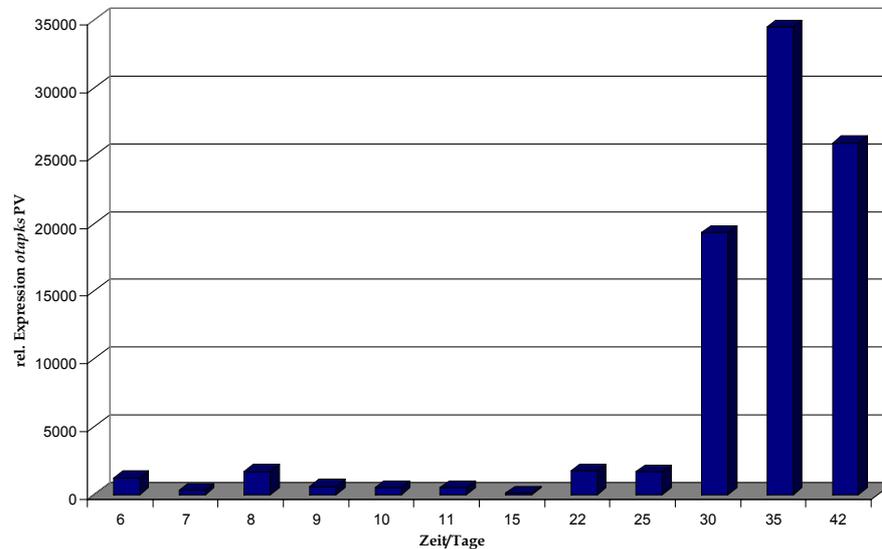


Abb. 99: Real Time PCR Expressionskinetik des *otapksPV*-Gens in *P. verrucosum* über einen Zeitraum von 42 Tagen. Lagerung bei 25 °C. Die Expression der Gene stieg zwischen dem 22.-30. Tag rapide an.

Für die Analyse auf gebildetes Ochratoxin A wurde ein Zeitraum von 58 Tagen bemessen (Abb. 100).

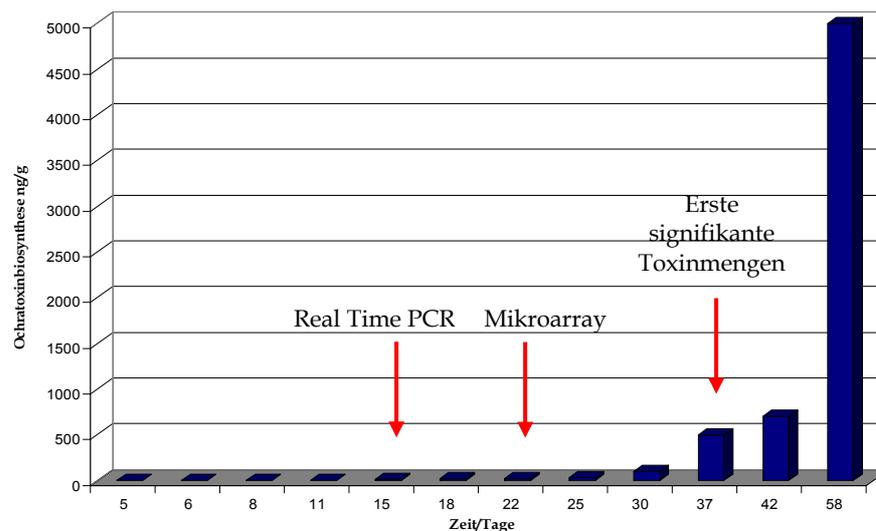


Abb. 100: Kinetik der Ochratoxin A Biosynthese in *P. verrucosum* über einen Zeitraum von 58 Tagen. Lagerung bei 25 °C. Eine Expression der Gene des Ochratoxinclusters ließ sich mittels Mikroarray am 22. Tag nachweisen, mit Real Time PCR ab dem 15. Tag. Ab ca. Tag 30/37 wurde Toxin in signifikanten Quantitäten synthetisiert.

Außerdem wurden Negativprobe und kontaminierte Probe mittels Mikroarray verglichen, um zum einen die Real Time PCR Ergebnisse zu bestätigen und zum anderen die Sensitivität und Spezifität des Array auch für diese Art Anwendung zu testen (Abb. 101).

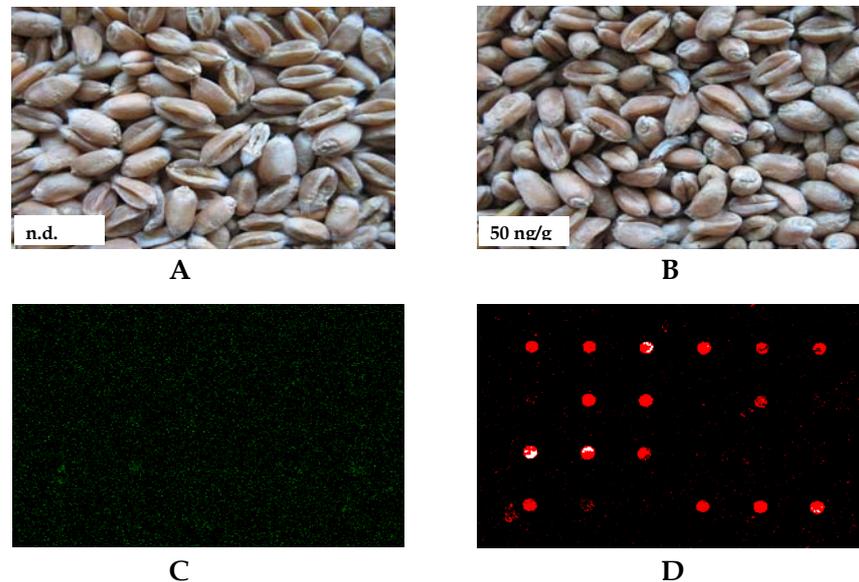


Abb. 101: **Mikroarrayanalyse der Expression des Ochratoxin A Biosyntheseclusters in Weizen.** Dieser war mit Sporen von *P. verrucosum* kontaminiert, bzw. nicht kontaminiert. Expression der Mykotoxinbiosynthese gene (D) in der kontaminierten Probe (B). In dieser Probe wurde Ochratoxin A 50 ng/g detektiert. In der nicht kontaminierten Referenzprobe (A) keine aktive Expression der OTA-Gene (C).

Mittels Mikroarray konnte eine Kontamination am 22. Tag nachgewiesen werden, bei Verwendung der Real Time PCR war dies ab dem 15. Tag möglich. Während der Untersuchung von Weizenproben mit einem Feuchtegehalt von 14%, 19% und 24%, konnte mit Real Time PCR festgestellt werden, dass es erst ab 24% zu einer einer signifikanten Expression des *otapksPV* Gens und dadurch aktiven OTA-Biosynthese kommt. Bei Weizenkörnern mit einem rel. Feuchtegehalt von 14% und 19% war dies nicht zu beobachten. Bemerkenswerter Weise war die aus den Weizenkörnern gewonnene Menge an *P. verrucosum*-RNA außerdem ausreichend für eine Mikroarray-Hybridisierung, obwohl eine Kontamination mit bloßem Auge kaum auszumachen war. Eine Expression konnte hier am 22. Tag nachgewiesen werden. Erst ab Tag 37 kam es jedoch zu einer signifikanten Toxinbiosynthese. Wie ersichtlich war die Sensitivität des Mikroarray ebenfalls ausreichend für *in vivo* Kontaminationsversuche auf Weizenmatrix. Der Nachweis einer Kontamination von Lebensmittelproben mit Schimmelpilzen

gelingt also über selektive PCR und eine Messung der Transkription der Biosynthesegene (Schmidt-Heydt *et al.*, 2007e). Aus den Expressionsdaten kann außerdem auf eine zukünftige Toxinbiosynthese geschlossen werden. Von besonderem Interesse ist natürlich die mögliche Anwendbarkeit in der Pflanze selbst. Der nächste logische Schritt war daher, den Mycochip direkt unter simulierten Feldbedingungen an der wachsenden Wirtspflanze zu testen. Zu diesem Zweck wurden zwei repräsentative Weizensorten ausgewählt. Eine Sorte, Thasos, verfügt über eine moderate Resistenz gegen einen Befall mit *Fusarium*, wohingegen die zweite Sorte, Taifun, über keine solche Resistenzeigenschaften verfügt:

3.3.7.3 Expressionsverlauf der Trichothecenbiosynthesegene bei Wachstum von *Fusarium culmorum* auf Weizensorten verschiedener Resistenz gegen *Fusarium*: In diesem *in vivo* -Versuch wurden Weizenkörner der Sorten Thasos und Taifun eingesetzt, die nach Einstufung des Bundessortenamtes eine unterschiedliche Resistenz gegen einen Befall mit *Fusarium* aufweisen (Tab. 8).

Tab. 8: **Verwendete Weizensorten.** Rot umrandet sind die ausgewählten Weizensorten und deren züchtungsabhängige Infektanfälligkeit gegen *Fusarium*. Die Weizensorte Taifun besitzt hierbei keine besonderen Resistenzeigenschaften gegen eine Infektion mit *Fusarium*, die Sorte Thasos zeichnet sich durch eine moderate Resistenz aus. Quelle: IPZ-LfL, ÄLF SG 2.1 P Bundessortenamt.

Sorte	Qualität 1)				Ertrag			Ertragskomponenten			Wachstumsmerkmale			Resistenz							
	Fallzahl	RMT-Vol.	Rohprotein	Mehlausb.	Mittelwert	ex-tensiv	in-tensiv	Best.dichte	Kornzahl	TKG	Wuchshöhe	Standfestigk.	Reife	Mehltau	DTR	Braunrost	Gelbrost 1)	Sept. trit.	Sept. nod.1)	Fusarium1)	
mehrfähig geprüfte Sommerweizensorten																					
Eminent	E	+	+++	++	+	(-)	-	o	(+)	(+)	o	o	-	(+)	+	(+)	+	(+)	o	(+)	o
Taifun	E	+++	++	++	o	+	(+)	+	o	(+)	+	+	(-)	+	(+)	(+)	+	+	(+)	+	o
Thasos	E	+	++	++	(+)	(-)	-	(-)	o	(+)	o	(-)	o	o	-	(-)	-	(+)	o	(+)	(+)
Triso	E	+	+++	+++	o	o	(+)	o	+	(-)	(+)	o	o	o	(-)	o	o	--	(+)	+	(+)
Monsun	A	+++	(+)	(+)	(+)	o	o	(+)	(-)	o	++	(+)	o	(-)	(+)	(+)	o	+	(+)	(+)	o
Melissos	A	+	(+)	o	o	+	+	(+)	(+)	(+)	o	(+)	(+)	o	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+
Piccolo	A	++	+	+	(-)	++	++	+++	o	(+)	(+)	+	(-)	o	o	o	(+)	+	(-)	o	o
zweijährig geprüfte Sommerweizensorten (vorläufige Einstufung)																					
Epos	E	++	+++	+++	o	o	+	-	(+)	o	o	(+)	+	o	(-)	o	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Tyball	A	++	(+)	(+)	o	+	+	(+)	(-)	o	(+)	++	(+)	o	++	(-)	+	(-)	(-)	(-)	(-)

① Einstufung nach BSL 2005

Die Weizenkörner wurden durch Bestrahlung mit 3 Kgray sterilisiert und in je 5 „Mitscherlich“-Töpfe $D = 20$ cm (je Topf 10 Weizenkörner mit einem entsprechenden Torf/Erde/Sand (10:85:5) Gemisch) ausgesät. Der Versuch fand in einem Phytotroninkubationsraum mit voreingestellten Wachstumsprogramm statt, welches den natürlichen Feldbedingungen nachempfunden war (Abb. 102; Programm in Methodenbeschreibung).

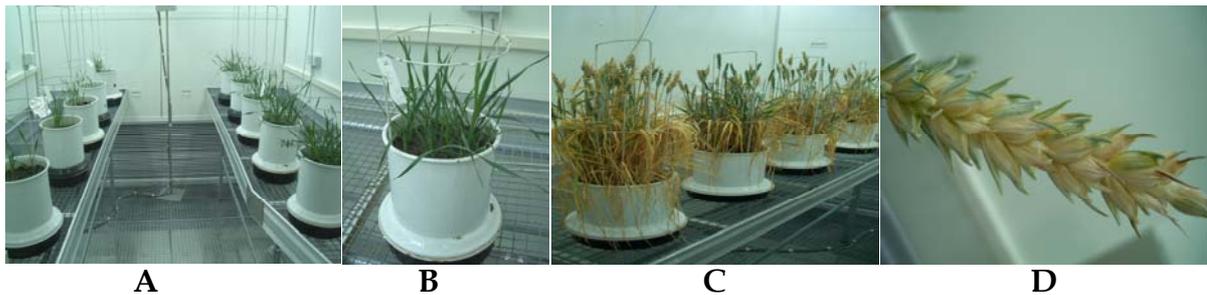


Abb. 102: **Weizenversuch Phytotron.** A und B zeigen ausgekeimte Weizenpflänzchen der Sorten Thasos und Taifun, welche in speziellen „Mitscherlich“-töpfen unter den kontrollierten Wachstumsbedingungen des Phytotron angezogen wurden. C Erntereife Weizenpflanzen D Ährenfusariose, symptomatisches Ausbleichen der Ähre, so genanntes „headblight“.

Die Oberfläche der Erdmischung, sowie die auskeimenden Pflanzen wurden mehrmals mit einer Sporensuspension (10^7 KBE/ml) von *Fusarium culmorum* inokuliert. Zu 6 verschiedenen Zeitpunkten, nach 46, 68, 74, 81, 89 und 95 Tagen wurden Proben genommen (Jeweils die ganze Ähre), die RNA isoliert und mittels Mikroarray die Expression der Gene des Trichothecenbiosyntheseclusters gemessen (Abb. 103 und 104). Im Folgenden ist der Ablauf der Genexpression des Mykotoxinbiosyntheseclusters in *Fusarium* bei Wachstum *in vivo* auf Weizenpflanzen der Sorten Taifun und Thasos dargestellt.

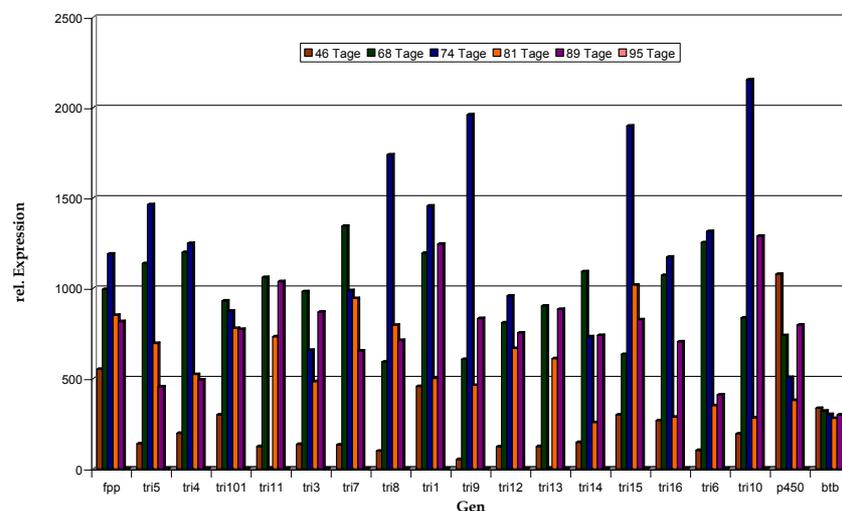


Abb. 103: **Expressionsanalyse der Trichothecengene in *Fusarium culmorum* nach Wachstum auf Weizenpflanzen der Sorte Taifun.** Weizenpflanzen ohne besondere Resistenzeigenschaft gegen *Fusarium*.

Die Expression war interessanterweise auf Weizen der Sorte Taifun (Abb. 103) ungefähr doppelt so hoch im Vergleich zur Expression bei Verwendung der Weizensorte Thasos als Wirtspflanze (Abb. 104). Die Resistenzeigenschaften dieser Weizensorte führt zu einer verminderten Expression der Mykotoxinbiosynthese in *Fusarium*.

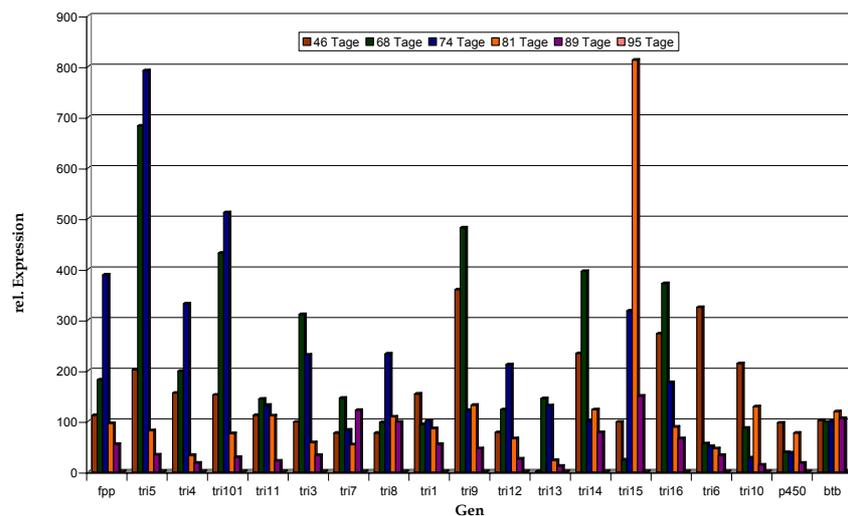


Abb. 104: Expressionsanalyse der Trichothecengene in *Fusarium culmorum* nach Wachstum auf Weizenpflanzen der Sorte Thasos. Weizenpflanzen mit moderater Resistenzeigenschaft gegen *Fusarium*. Insgesamt lag ein wesentlich geringeres Expressionsmaximum vor im Vergleich zur Weizensorte Taifun, sonst ähnlicher Expressionsverlauf.

Mykotoxine haben im Fall von *Fusarium* auch eine Bedeutung als Virulenzfaktoren, was bedeutet, dass der Pilz mit dem Mykotoxin die Pflanze effizienter infizieren kann. Die erhaltenen Daten wurden mittels Real Time PCR anhand der Expression des Trichothecenbiosynthesegenes *tri5* validiert (Abb. 105).

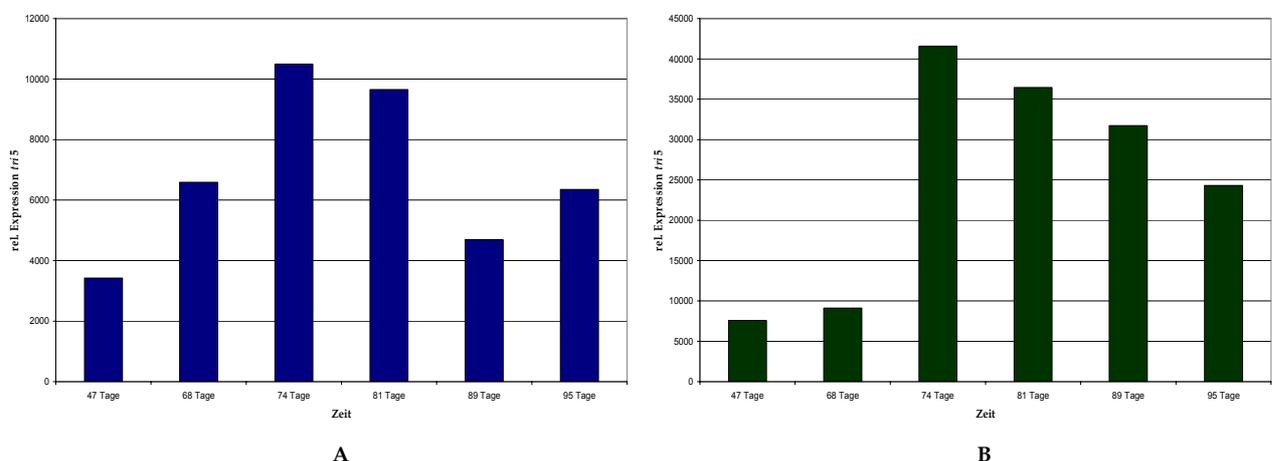


Abb. 105 Real Time PCR Weizenpflanzen. Real Time PCR Expressionsanalyse anhand des *tri5*-Gens über den Zeitraum von 95 Tagen, jeweils in Thasos A und Taifun B.

Außerdem wurde mittels ELISA die von *F. culmorum* bis zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt gebildete Toxinmenge bestimmt (Abb. 106) und mit der Genexpression in Korrelation gesetzt.

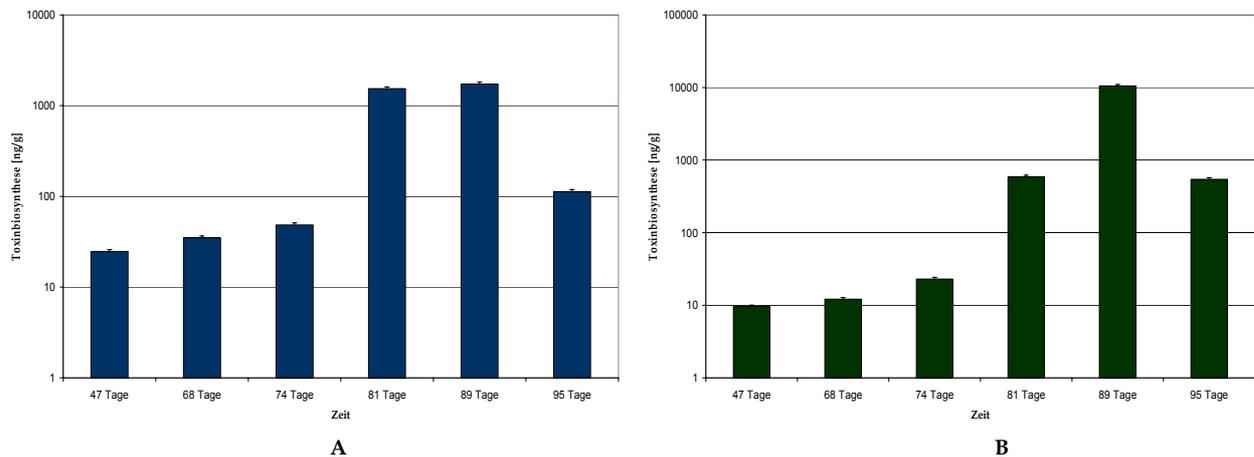


Abb. 106: **ELISA Weizenpflanzen.** ELISA Toxinanalyse über den Zeitraum von 95 Tagen, jeweils in Thasos **A** und Taifun **B**.

Vergleicht man den mittels Mikroarray erhaltenen Datensatz mit dem der Real Time PCR Validierung anhand des *tri5* Gens, so zeigt sich, dass sich diese ziemlich genau entsprechen, mit Ausnahme der letzten Mikroarraymessung am Tag 95. Die Ausbeute an *mRNA* lag hier jedoch weit unter der optimalen Grenze für eine Mikroarray-Hybridisierung. Auffällig war, dass auch in diesem *in vivo*-System die Expression der Biosynthesegene ihren Zenit nach 74 Tagen erreichte, die Toxinbildung jedoch am Tag 81 bzw. 89, um dann, wie auch die Expression der Gene, wieder abzufallen. Die Gesamttoxinakkumulation war bei der weniger gegen *Fusarium* resistenten Weizensorte, Taifun, zehnfach erhöht im Vergleich zur Weizensorte Thasos mit moderaten Resistenzeigenschaften.

Die erhaltenen Daten bestätigten die Funktionalität des Mikroarrays sowohl für experimentelle Fragestellungen auf Labormedium als auch auf Lebensmittelmodellmedium. Zudem verfügt der entwickelte Mikroarray über eine ausreichende Sensitivität bei der Verwendung von sehr geringen RNA-Mengen die beispielsweise aus Weizenkörnern, einer relativ problematischen Lebensmittelmatrix, gewonnen werden konnten. Über eine Messung der

Genexpression konnte auch hier, wie bereits *in vitro* gezeigt, eine zukünftige Toxinbiosynthese prognostiziert werden.

Ob der Mikroarray auch eingesetzt werden kann um zwischen dem Auftreten verschiedener Mykotoxin-Chemotypen zu differenzieren, sollte im Folgenden an *Fusarium graminearum* gezeigt werden. Wie bereits einleitend erläutert kommen von dieser Spezies jeweils unterschiedliche Chemotypen vor die das Mykotoxin Deoxynivalenol entweder in der 3' acetylierten Form synthetisieren, oder mit einer Acetylgruppe am 15' C-Atom.

3.3.8 Differenzierung zwischen unterschiedlichen DON-Chemotypen von *Fusarium graminearum*: *F. graminearum* ist ein wichtiger pflanzenpathogener Ascomyzet, der vor allem auf Weizen und Mais in ganz Europa und den USA vorkommt. Abgesehen vom wirtschaftlichen Schaden durch Infektion von Lebensmittelpflanzen schon auf dem Feld, die nach gültigem EU-Recht nicht mehr in Verkehr gebracht werden dürfen, ist *F. graminearum* in der Lage, die für Mensch und Tier toxischen Trichothecenmykotoxine Deoxynivalenol (DON), sowie dessen Derivate 3-Acetyl-deoxynivalenol (3A-DON), und 15-acetyl-deoxynivalenol (15A-DON) zu synthetisieren. Die Biosynthese des entsprechenden Derivats wird durch jeweils andere Chemotypen durchgeführt. DON synthetisierende Chemotypen von *F. graminearum* kommen in verschiedenen europäischen Ländern und den USA vor. Einige Stämme produzieren jedoch zum großen Teil 3A-DON, Andere 15A-DON. In Norwegen, Deutschland, Dänemark, Ungarn und der UK, wird hauptsächlich der 3A-DON-Chemotyp gefunden, während in Frankreich und den USA meist 15A-DON-Chemotypen vorherrschen. Die Acetylierungsposition beeinflusst im starken Maße die Toxizität des jeweiligen Derivats (Kimura *et al.*, 1998). Aus diesem Grunde ist es von Bedeutung den jeweils im Lebensmittel auftretenden Chemotypen schnell und sicher zu identifizieren um eine Risikoeinschätzung bezüglich des im Lebensmittel gebildeten Toxins treffen zu können. Zur Durchführung dieses Versuches wurden Exemplare von *F. graminearum* aus

verschiedenen Regionen ausgewählt, die entweder zum 3-A-DON-Chemotyp oder zum 15-A-DON-Chemotyp gehören. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit einer italienischen Arbeitsgruppe durchgeführt (Institute of Sciences of Food Production, ISPA, Italien). Folgende Stämme wurden verwendet:

Tab. 9: *Fusarium graminearum* Stämme für die Chemotyp-Differenzierung. Die Stämme sind typisch für die verschiedenen Regionen und gehören jeweils zum 3-Ac-DON, bzw. zum 15-Ac-DON Typus.

Stamm-Nr.	Chemotyp	geographische Herkunft
126	3-A-DON	Italien
633	3-A-DON	Italien
646	3-A-DON	Italien
4435	15-A-DON	Jugoslawien
4436	15-A-DON	Jugoslawien
4438	15-A-DON	Jugoslawien
4439	15-A-DON	Jugoslawien
4459	15-A-DON	Jugoslawien
4475	15-A-DON	Japan
5356	15-A-DON	USA

Die Genexpressionsanalyse anhand des *tri3* Gens des Trichothecenclusters wurde mittels Real Time PCR durchgeführt und zum Teil mit Mikroarray validiert. Da dieses Gen für eine 15-O-Acetyltransferase kodiert, welche jedoch nur bei einer Acetylierung am 15' C-Atom des Deoxynivalenol-Moleküls benötigt wird, sollte dieses Gen folglich auch nur in diesem Chemotyp exprimiert werden, oder zumindest in einem signifikant höheren Ausmaß im Vergleich zum 3-A-DON-Chemotyp.

Die verwendeten *tri3*-Primer (Abb. 107) sind spezifisch für beide Chemotypen von *F. graminearum*.

TTGTTATCA GTGACGGTGT CAACGAACGC TTCATTCTC GCGAAATCAA AACAAAGTAGT CACTGCCACA GTTGCTTGCG AAGTAAGGAG CGCTTAGTT	50
GCGAACTGCA ACAGGCGAGG ACGTTTGTGTC CGTIGAAAGC ATAGACTTTA CGCTTGACGT TGTCCGCTCC GCAAAACAG GCAACTTTCG TATCTGAAAT	100
TTGTGAACCA GTCTTTGCCA TATCT 125 AACACTTGGT CAGAAACGGT ATAGA	

Abb. 107: Sequenzabschnitt des *tri3*-Gens in *F. graminearum*. Die verwendeten Primer sind rot unterlegt. Das Gen sollte nur im 15-A-DON Chemotyp exprimiert sein, bzw. signifikant höher exprimiert im Vergleich zum 3-A-DON Chemotyp

Die Toxinanalytik wurde mit HPLC durch die italienischen Kooperationspartner durchgeführt.

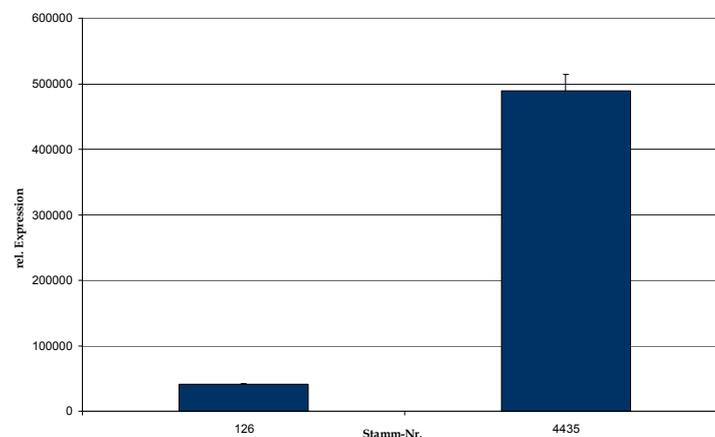


Abb. 108: Real Time PCR Genexpressionsanalyse des *tri3*-Gens in *F. graminearum*. Stamm-Nr 126 (3-A-DON Chemotyp) und Nr. 4435 (15-A-DON Chemotyp) im Vergleich. Das Gen wurde im 15-A-DON Chemotyp signifikant höher exprimiert im Vergleich zum 3-A-DON Chemotyp

Zuvor wurden die Stämme auf YES-Medium für 5 Tage bei 25 °C inkubiert, die RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben.

Validiert wurde dieses Ergebnis exemplarisch mittels Mikroarrayanalyse:

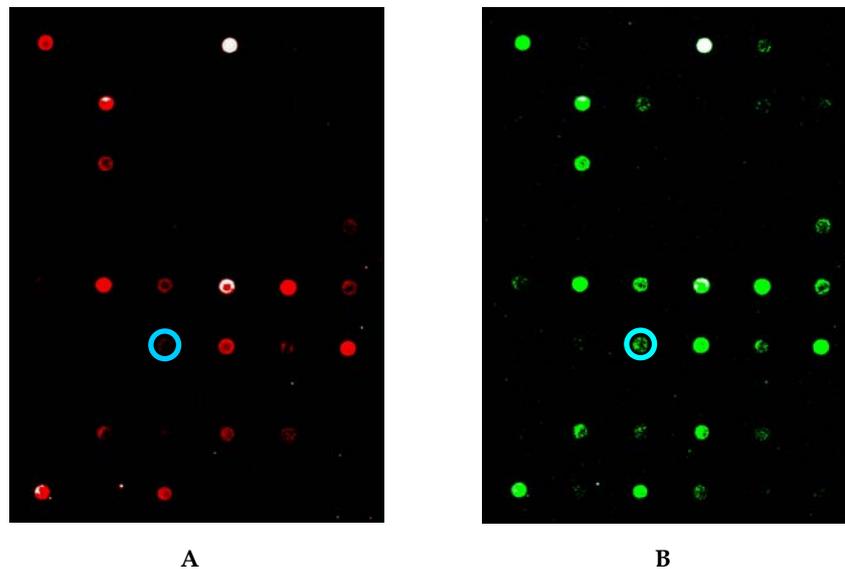


Abb. 109: Mikroarray Genexpressionsanalyse des Trichothecenclusters in *F. graminearum*. Stamm-Nr 126 (A = 3-A-DON Chemotyp) und Nr. 4435 (B = 15-A-DON Chemotyp) im Vergleich. Gemessen wurde die differentielle Expression des *Tri3*-Gens (blaue Kreise).

Wie in der Real Time Genexpressionsanalyse zu sehen war (Abb. 108) und auch mittels Mikroarray validiert werden konnte (Abb. 109), ist es möglich, anhand des *tri3*-Gens zwischen den zwei verschiedenen Chemotypen von *F. graminearum* zu unterscheiden. Dieser Expressionsunterschied trat bei allen untersuchten Stämmen reproduzierbar auf.

Mit dem entwickelten Mikroarraysystem Mycochip ist es möglich, zwischen unterschiedlich auftretenden Schimmelpilzchemotypen zu differenzieren.

4 Diskussion:

Ein Mikroarray für die Analyse der Regulation von Biosynthesegenen der wichtigsten lebensmittelrelevanten Mykotoxine Aflatoxin, Ochratoxin, Trichothecen sowie Fumonisin, konnte im Verlauf dieser Arbeit entwickelt werden (Schmidt-Heydt und Geisen, 2007a). Die Oligonukleotidsonden dieses Mycochip sind spezifisch für die dazugehörigen Gene. Keine signifikanten Kreuzhybridisierungen traten auf, außer zwischen stark homologen Genen, wie zum Beispiel den Polyketidsynthasen der unterschiedlichen Spezies. Bisher noch nicht identifizierte Gene des Ochratoxin A Biosynthesewegs in *P. nordicum* konnten während der Vorarbeiten dieser Dissertation gefunden und funktionell verifiziert werden (Geisen, Schmidt-Heydt und Karolewicz, 2006). In initialen Anwendungsversuchen konnte gezeigt werden, dass die mit dem Mycochip durchgeführten Hybridisierungen sehr stringent und spezifisch verlaufen. Der Mikroarray kann dabei eingesetzt werden, um zum einen den Einfluss verschiedener Wachstumsparameter auf die Regulation von Mykotoxinbiosynthesegenen zu untersuchen und zum anderen zur Identifikation und Differenzierung verschiedener Schimmelpilzspezies und Chemotypen. Die Zielsetzung dieser Arbeit, eine Korrelation zwischen phänotypischer Ausprägung der Mykotoxinbildung und deren Regulation auf Transkriptionsebene zu finden, wurde durch den Einsatz des entwickelten Mikroarrays in verschiedenen Fragestellungen erreicht (Schmidt-Heydt *et al.*, 2007b-e). Um eine kausale Signifikanz der Datensätze aus den unterschiedlichen Experimenten zu sichern, war es prinzipiell nötig, einige Normalisierungsschritte einzufügen (Dufva, 2005) (Siehe Punkt: Normalisierung der Datensätze). Transkriptionale Analysen von Schimmelpilzen mittels Mikroarray wurden bisher nur mit Est-Chips (expressed sequence tags) durchgeführt, bzw. mit Full-Genome-Chips und hier auch mit einer völlig anderen Zielsetzung wie Genom- oder generelle Identifikationsanalysen (Jin *et al.*, 2007; Guldener *et al.*, 2006). Unter dem Aspekt der Nahrungsmittelsicherheit ist es jedoch von großer Bedeutung die Regulation der für die Mykotoxinbiosynthese relevanten Gene zu

verstehen. Um dieses Ziel zu erreichen wurden mit dem entwickelten Mikroarray als Monitoring- und Analysetool verschiedene *in vitro* und *in vivo* Versuche durchgeführt:

In vitro Versuche konnten verwirklicht werden, durch Verwendung von hierfür entwickelten Lebensmittelmodellmedien und Labormedium. Auf diese Weise konnte die Genregulation im Kontext zu phänotypischer Toxinbiosynthese und Wachstum in repräsentativen filamentösen Pilzen untersucht werden. Dass bestimmte Wachstumsparameter einen starken Effekt auf die Biosynthese von Mykotoxinen haben können, beschrieb z.B. Häggblom (1982) bezüglich des Einflusses von Wachstumsphase, Temperatur und Inokkulumgröße auf die Ochratoxin A Produktion in *P. verrucosum*. Gonzalez *et al.* (1987) analysierte den Einfluss der Temperatur auf die Wachstumsrate von *Penicillium*, *Aspergillus* und *Fusarium*, Kokkonen *et al.* (2005) den des Substrats auf die Mykotoxinbiosynthese in verschiedenen Penicillien. Arroyo *et al.* (2005) untersuchte den Effekt der Wasseraktivität auf die Biosynthese von OTA beim gleichen Stamm, während Hope *et al.* (2005) und Llorens *et al.* (2004) den Einfluss von Wasseraktivität und Temperatur auf die Biosynthese von Trichothecenen in *Fusarium culmorum* und *F. graminearum* beschrieben. Diese und andere Publikationen zeigen auf, dass die Mykotoxinbiosynthese sehr variabel ist. In dieser Arbeit wurden erstmals systematisch die Zusammenhänge zwischen Wachstum, Toxinbiosynthese und Expression der Gene des jeweiligen Genclusters unter dem Einfluss verschiedener äußerer Faktoren untersucht. Dies sowohl für zwei repräsentative Vertreter der Gattung *Fusarium*, als auch für *Penicillium*. Beispielsweise wurden *P. nordicum* und *F. culmorum* auf einem die Toxinbiosynthese fördernden Medium inkubiert, sowie auf einem Medium welches die Toxinbiosynthese hemmte. Entsprechend dem Einfluss des Mediums, kam es entweder zu einem starken Expressionssignal des gesamten Biosyntheseclusters, oder zu einer nur schwachen Aktivierung einzelner Gene und folglich zu einer verminderten Mykotoxinbildung. Eine besondere Stärke des Mycochip war die Möglichkeit Expressionskinetiken durchzuführen. *Fusarium culmorum* wurde dazu auf zwei

verschiedenen Medien über einen Zeitraum von 30 Tagen wachsen gelassen. Auf Labormedium YES und auf Mais-Medium, welches ein natürliches Habitat simulieren sollte. Beide Medien fördern die Toxinbiosynthese. Auf dem nährstoffreichen Maismedium wurde insgesamt weniger Toxin synthetisiert im Vergleich zum YES Medium. Möglicherweise ist dies auf die verschiedene Nährstoffzusammensetzung, Hemmstoffe und/oder etwaige Matrixeffekte zurückzuführen. Üblicherweise wird ja der Sekundärmetabolismus aktiviert, wenn es während der Idiophase zu einer Nährstoffverarmung des Substrats kommt (Bu'lock, 1974; Liao *et al.*, 1995). Mais-Medium ist eher reichhaltig. Bezüglich der Aktivierung der Biosynthesegene auf dem jeweiligen Medium, konnten auch hier signifikante Unterschiede beobachtet werden. Letztlich kam es jedoch auf beiden Medien zu einem indikativen Expressionsmuster. Dieses zeigte eine aktive Toxinbiosynthese an, die phänotypisch jedoch erst einige Tage später auftrat. Da das spezifische Expressionsmuster auch dann noch persistierte, kann man zu Beginn der Expressionsmessung von einer Vorhersagefunktion der Transkription sprechen, während es im späteren Verlauf, hier nach ungefähr 10 Tagen, zu einer Korrelation zwischen Induktionsmuster und tatsächlicher Toxinbiosynthese kommt. Schematisch ist dieser Vorgang in folgender Abbildung dargestellt:

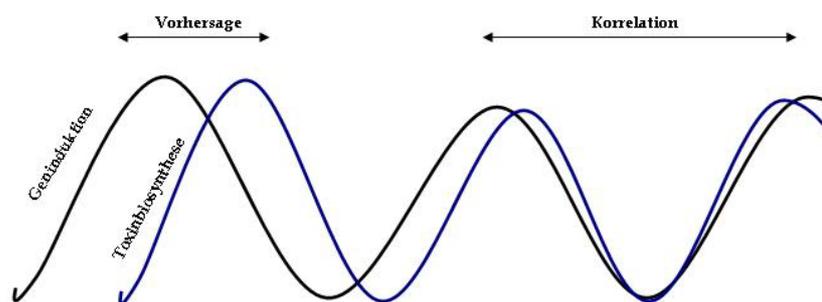


Abb. 110: **Vorhersagefunktion und Korrelation.** Modellhaftes Schema des Zusammenhangs zwischen der Expression von Mykotoxinbiosynthesegenen und der Toxinbildung.

Wie auf der Abbildung ersichtlich, beginnt die phänotypische Toxinbiosynthese deutlich zeitversetzt nach der Induktion der Toxinbiosynthesegene. Deren Aktivität ist zu diesem Zeitpunkt bereits wieder am Abfallen. Es kommt also erst zu einer Expression der Mykotoxingene mit nachfolgender Prozessierung der

Genprodukte. Wohl über negative Rückkopplung sinkt dann der Transkriptionslevel während die Toxinbiosynthese ansteigt bis die Transkriptionsprodukte verbraucht sind, was zu einer erneuten Transkriptionsinduktion führt. Zu einem späteren Zeitpunkt synchronisieren Genexpression und Toxinbiosynthese, es kommt zu einer Korrelation zwischen den beiden oszillierend ablaufenden Phasen. Diese Beobachtung konnte sowohl während der *in vitro* Versuche gemacht werden als auch *in vivo*. Ein relativ großer Zeitraum zwischen dem Auftreten erster messbarer Gentranskripte und einer signifikanten Toxinbiosynthese, war auch bei einer Infektion von Weizenkörnern unterschiedlicher rel. Feuchte mit Sporen von *P. verrucosum* zu beobachten. Während erste Mykotoxingentranskripte mit Mikroarray und Real Time PCR nach spätestens 22 Tagen Inkubationszeit nachgewiesen werden konnten und nach 42 Tagen ihren höchsten Stand erreichten, erfolgte eine nennenswerte Biosynthese des Mykotoxins Ochratoxin A erst nach 58 Tagen (Schmidt-Heydt *et al.*, 2007e).

Verschiedene Gene, im Weiteren Schlüsselgene genannt, zeigten eine besondere Korrelation zur Toxinbiosyntheseleistung und können daher als Indikator für eine phänotypische Toxinbiosynthese angesehen werden. Andere Biosynthesegene wurden zum Teil stark durch physiologische Ereignisse beeinflusst, die sich nicht auf eine veränderte Sekundärmetabolitsynthese zurückführen ließen. Zu den Schlüsselgenen in *Fusarium* gehört unter Anderen das Gen *tri5*, da es nahezu über den gesamten Messzeitraum aktiv und gut korreliert blieb. Dieses Gen kodiert für eine Trichodiensynthase, einem Schlüsselenzym der Trichothecenbiosynthese (Hohn und Desjardins, 1992). Im weiteren Verlauf blieben einige weitere Gene stark aktiv, die Übrigen ließen sich in ihrer Aktivität nur nach Erhöhung der Scanintensität detektieren. Hoch exprimierte Gene waren zum Beispiel das *tri12*-Gen, dass für eine Effluxpumpe kodiert, also eine Art Toxintransporter (Alexander *et al.*, 1999); *tri101*, welches für eine 3-O-acetyltransferase kodiert und die Zelle durch Acetylierung des Trichothecenmoleküls schützt (McCormick *et al.*, 1999), sowie *tri15*, dass als Negativregulator bezüglich der Toxinbiosynthese fungiert (Alexander *et al.*,

2004). Interessanterweise war dieses Gen meist reziprok zu nahezu allen anderen Genen des Clusters exprimiert und somit auch gegensätzlich zum Toxinbiosyntheseoptimum. *tri15* war also jeweils stärker exprimiert wenn die übrigen Gene des Clusters schwächer exprimiert waren und vice versa. Diese Regulation macht Sinn. Im Verlauf der Toxinbiosynthese kommt es zu einer Akkumulation an Mykotoxin in den Zellen. Dieses ist auch für den Pilz toxisch, so dass Toxintransporter und Acetylierung als Selbstschutz aktiviert werden. Der Negativregulator ist immer dann am stärksten aktiv wenn die Bedingungen nicht optimal für eine Toxinbiosynthese sind. Außerdem wurde eine nicht näher charakterisierte Cytochrom-p450-Monooxygenase stark exprimiert. Das Gen *tri4*, welches auch als Schlüsselgen identifiziert werden konnte und ebenso für eine Cyt-p450-Monooxygenase kodiert (Tokai *et al.*, 2007), war ebenfalls meist sehr gut korreliert. Cytochrom-p450-Monooxygenasen haben in filamentösen Pilzen eine besondere Bedeutung bezüglich der schnellen Adaptionfähigkeit an neue ökologische Nischen, also veränderten Umgebungsbedingungen. (Deng *et al.*, 2007). In *P. verrucosum* und *P. nordicum* sind bisher keine Cyt-p450-Monooxygenasen bekannt, so dass hier keine Bestätigung diesbezüglich erfolgen konnte, jedoch waren die Ochratoxin A relevanten Gene im Allgemeinen gut mit der aktiven Biosynthese korreliert.

In vivo Versuche wurden mit zwei Weizensorten mit unterschiedlicher Resistenz gegen *Fusarium* durchgeführt (www.bundessortenamt.de). Hierbei konnte während der mittels Mikroarray durchgeführten Genexpressionsanalysen, eine deutlich differente, resistenzabhängige Expression der Mykotoxinbiosynthesegene im Kontaminanten nachgewiesen werden, die mit einer entsprechenden Mykotoxinbiosynthese einherging. Außerdem konnte der Ablauf einer Infektion von Weizenpflanzen mit *Fusarium* über den gesamten Zeitraum, vom Auskeimen der Weizenpflanzen bis zur Ernte, auf Transkriptionsebene gemonitort werden. Diese Anwendungsmöglichkeit erlaubt eine Einschätzung von Resistenzmechanismen bezüglich deren Effektivität die Mykotoxinbildung im Pilz zu vermindern. Ein Verständnis, der über den Zeitraum ablaufenden

Genexpressions- bzw. Toxinbildungsaktivitäten auch im Hinblick auf die durch das Mykotoxin erhöhte Virulenz, ermöglicht außerdem eine bessere Planung und Einschätzung von präventiven Maßnahmen, wie den Einsatz von Fungiziden. Gerade bei Fungiziden der Strobilurinklasse ist der Anwendungszeitpunkt von großer Bedeutung für den Erfolg der Behandlung, da anderenfalls sogar eine Induktion der Mykotoxingene im Pilz resultieren kann und somit eine sogar erhöhte Toxinkontamination (Ellner, 2005).

Während systematischer Expressionsanalysen von Mykotoxinbiosynthesegenen mittels Real Time PCR und Mikroarray konnten außerdem generelle, vom Einflussfaktor abhängige Expressionsmuster identifiziert werden. Im Verlauf dieser Experimente wurden systematisch die Einflüsse der Faktoren pH, Temperatur und Wasseraktivität auf Genexpression, Wachstumsrate und Toxinbiosynthese untersucht. Es konnte gezeigt werden dass der Einfluss dieser Faktoren auf die Biosynthese von Mykotoxinen auf einem transkriptionalen Level reguliert wird. Bedingungen, die eine verminderte Transkription der Mykotoxinbiosynthesegene zur Folge hatten, führten auch zu einer Abnahme der phänotypischen Toxinbiosynthese. Ebenso verhielt es sich im umgekehrten Fall. Von *Aspergillus nidulans* ist bekannt, dass unterschiedliche globale Regulatorgene durch den Einfluss äußerer Faktoren in ihrer Aktivität modifiziert werden, so z. B. das einleitend beschriebene *creA*-Gen im Falle von Glucose (Tudzynski *et al.*, 2000), oder das *pacC/palC*-System (Penalva und Arst, Jr., 2002), dessen Transkription durch einen alkalischen (Induktion der *pal*-Gene) oder sauren (Induktion der *pac*-Gene) pH beeinflusst wird und dass selbst wiederum die Aktivität von „downstream“ gelegenen Genen, wie die der Mykotoxinbiosynthesegene verändert. O’Callaghan *et al.* (2006) fanden beispielsweise für *Aspergillus ochraceus* eine erhöhte Expression der Ochratoxin A Biosynthesegene und ebenso der Toxinbiosynthese bei einem pH-Wert <7. In *Fusarium verticillioides* wurde ein zum *pacC*-System homologes Gen gefunden, das *pac1* mit äquivalenter Funktion (Flaherty *et al.*, 2003). Es kann vermutet werden, dass *Penicillium* über ähnliche sensorische Systeme verfügt die auf den nachfolgenden Biosynthesekomplex regulatorisch einwirken. Das der pH-Wert

einen großen Einfluss auf den physiologischen Status eines Organismus hat, ist möglicherweise dadurch begründet, dass Biosorption, Verfügbarkeit und Akkumulation von Nährstoffen und Ionen stark vom pH-Wert abhängen und je nach Substanz und Enzymausstattung stark differieren (Blackwell *et al.*, 1995). Ein pH-Wert im alkalischen Bereich kann beispielsweise eine Deprotonierung funktioneller Gruppen biologischer Oberflächen zur Folge haben. Dies führt wiederum zu einer erhöhten Bindungskapazität bezüglich freier Kationen. Ein pH-Wert im sauren Bereich hingegen führt zu einer Protonierung und folglich zu einer Verringerung der negativen Ladung an den Bindestellen, was in einer Inhibierung zum Beispiel von Metallbindungen resultieren würde (Yan und Viraraghavan, 2001). Für jeden Organismus gibt es hierbei Optima, in *S. cerevisiae* wird zum Beispiel die optimale Biosorption bei pH 4 erreicht. Gadd *et al.* (1993) dokumentierte die Fähigkeit einiger Pilze organische Verbindungen freizusetzen, um damit den pH-Wert des umgebenden Substrats zu ihrem Vorteil zu verändern. Eventuell führt die pH-Wert-Veränderung zu einer besseren Verfügbarkeit von Nährstoffen im Substrat. Nach Jennings *et al.* (1989), handelt es sich beispielsweise im Fall einer Alkalisierung des Mediums, um eine aktive Sekretion von Ammoniumionen. Diese entstehen durch Protease vermittelte Deaminierung von Aminosäuren. Eine Sekretion von Ammoniumionen wurde auch bei *N. crassa* und *A. fumigatus* beobachtet (Sikora und Marzluf, 1982; De Bernardis, 1998). Bei verschiedenen Wachstumsversuchen im Verlauf dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass bei Inkubation von *F. culmorum* auf einem, durch den Farbstoff Malachit-Grün-Oxalat grün gefärbten Medium, nach einigen Tagen ein Farbumschlag nach gelb stattfand. Dies spricht für eine Ansäuerung des Mediums durch *Fusarium* und ließ sich nach Überprüfung des pH-Wertes auch bestätigen. Die Fähigkeit das äußere Medium anzusäuern, z. B. mittels Aktivierung der H⁺-ATPase in der Zell-Membran, wurde für *F. oxysporum* schon 1992 beschrieben (Brandao *et al.*). Durch die Ausscheidung von Oxalsäure oder Zitronensäure durch *S. sclerotiorum* und verschiedene Vertreter von *Penicillium* und *Aspergillus*, werden zudem Mineralhaushalt und Membranstabilität von Wirtspflanzen gestört (Bateman und Beer, 1965;

Cunningham und Kuiack, 1992). Diese Metaboliten wirken so auch als Virulenzfaktor (Godoy *et al.*, 1990). Berücksichtigt man diese Fakten, so wird klar, dass der pH-Wert einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Mykotoxinbiosynthese und gegebenenfalls die Virulenz eines filamentösen Pilzes haben kann. Möglicherweise wird durch das Erreichen oder Vorhandensein eines bestimmten pH-Wertes im umgebenden Medium ein Signal für die Induktion bestimmter Sekundärmetabolitgene gesetzt oder deren Transkription gefördert. Entsprechend der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse, liegt das Expressionsoptimum der Mykotoxinbiosynthesegene für *F. culmorum* bei einem pH von 5, für *F. graminearum* bei pH 8. Tatsächlich wurde auch bereits in der Literatur beschrieben, dass *F. graminearum* das Mykotoxin Deoxynivalenol hauptsächlich unter alkalischen Bedingungen bildet (Vasavada und Hsieh, 1987). Bei *P. nordicum* lag das Optimum bei pH 6 und bei *P. verrucosum* ebenfalls bei pH 8. Toxinbiosyntheseoptima in diesem Bereich resultierten auch aus den phänotypischen Untersuchungen von Sweeney und Dobson (1998). Ob ein Pilz ein definiertes pH-Optimum aufweist kann bisher nicht klar beantwortet werden, vielmehr ist es denkbar dass in verschiedenen Habitaten unterschiedliche Optima auftreten. Möglicherweise hängt dies auch mit dem Umgebungs-pH der Wirtspflanze zusammen. *A. alternata* gedeiht beispielsweise sowohl auf Citrusfrüchten mit einem eher niederen pH von 3-4, als auch auf Datteln, welche einen pH von 5-6 aufweisen. Dieser pathogene Pilz exprimiert bei verschiedenen pH-werten unterschiedliche Sets an Genen, die eine entsprechend an den pH angepasste Enzymausstattungen zur Folge haben (Isshiki, 2001). Eine ähnliche Habitatsdiversität liegt auch bei *Penicillium* und *Fusarium* vor. Hinzu kommt, dass einige Mykotoxine pH-spezifisch synthetisiert werden, so bildet *F. graminearum* beispielsweise unter alkalischen Bedingungen das Mykotoxin DON während unter sauren Bedingungen die Biosynthese von 3-Acetyl-DON überwiegt (Vasavada *et al.*, 1987).

Die Aktivität der Mykotoxingene wurde in den analysierten Pilzstämmen außerdem durch unterschiedliche Inkubationstemperaturen beeinflusst. Nach der Regel von Van't Hoff wird bei Zunahme der Temperatur um 10 K die

Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion etwa verdoppelt. Da dies auch für enzymatisch katalysierte Reaktionen zutrifft, sollte die Temperatur einen Einfluss auf die für die Toxinbiosynthese relevanten Enzyme haben. Als Minimaltemperatur für alle getesteten Stämme erwies sich eine Temperatur von 15 °C. Unter dieser Grenze benötigten die Pilze unverhältnismäßig lange, um auch nur geringe Myzelmassen zu bilden. Die größte Toxinmenge wurde in *F. culmorum* bei einer Temperatur von 25 °C synthetisiert was auch Bottalico (1982) beobachtete. Bei *F. graminearum* lag das Optimum bei 30 °C, wohingegen bei diesem Stamm signifikante Mengen bei 25 °C wesentlich früher detektiert werden konnten. Die Toxinbiosynthesemaxima von *P. nordicum* und *P. verrucosum* waren bei 25 °C lokalisiert. *P. verrucosum* kommt zwar üblicherweise eher in kühleren Klimaten vor, jedoch scheint er sich an wärmere Regionen leicht zu adaptieren da er inzwischen auch in Italien auftritt und andere Autoren ebenfalls ein Toxinbiosyntheseoptimum in diesem Bereich beschreiben (Cairns-Fuller *et al.*, 2005).

Der dritte untersuchte Einflussfaktor war die Wasseraktivität. Dieser Faktor zählt allgemein zu den wichtigsten abiotischen Einflussfaktoren (Magan *et al.*, 2004). Die Aktivität der Pilzenzyme ist ganz entscheidend vom Wassergehalt des Mediums abhängig, da Enzyme nur in hydratisierter Form ihre katalytische Aktivität entfalten können. Dies ist besonders für die Lagerhaltung von großer Bedeutung. Bei allen untersuchten Pilzstämmen zeigte sich, dass minimal eine Wasseraktivität von 0.93 im Medium für ein zeitlich akzeptables Auskeimen der Sporen vorhanden sein musste. *F. culmorum* und *F. graminearum* synthetisierten die größte Menge Deoxynivalenol bei einer Wasseraktivität von 0.98, bzw. 0.99. *P. nordicum* und *P. verrucosum* hatten ihre Optima bei einem a_w von 0.99, bzw. 0.98. Für *P. verrucosum* wurde dies auch auf phänotypischer Ebene bereits von Cairns-Fuller *et al.* (2005) festgestellt und hiermit auf transkriptionaler Ebene bestätigt. Interessanterweise korrelierten dabei nicht immer alle Gene des entsprechenden Biosyntheseclusters mit der tatsächlichen Toxinbiosynthese, vielmehr waren immer nur bestimmte „Schlüsselgene“ direkt mit der Toxinbildung stringent.

Bemerkenswerter Weise konnte für alle 3 Einflussfaktoren ein Hauptexpressionspeak nahe dem Wachstumsoptimum ausgemacht werden, sowie ein zweiter Nebeninduktionspeak unter suboptimalen Wachstumsbedingungen die offensichtlich eine physiologische Stresssituation für den Organismus darstellt. So kam es zu einer sekundären Induktion der Mykotoxingene bei einer Temperatur von 15 °C, pH 4, oder bei einer Wasseraktivität von 0.93. In diesen Messbereichen war jedoch das Wachstum an Myzel regelmäßig sehr gering. Beim Wachstum gab es jeweils auch nur ein Optimum welches zum suboptimalen Bereich abfiel. Zum Beispiel konnte im Falle von *P. verrucosum* ein klares Wachstumsoptimum definiert werden, während für die Genexpression ein Hauptoptimum und ein Nebenoptimum bezüglich der Aktivität der Mykotoxingene auszumachen war. Das Hauptoptimum lag hierbei nahe dem Wachstumsoptimum, während das Nebenoptimum in einem Bereich auftrat, der aus Sicht des Wachstums als suboptimal für den Organismus angesehen werden kann, also in einem Bereich lag in dem Wachstum zwar noch möglich, jedoch stark vermindert war. In einem zweifaktoriellen Experiment, während dem Kombinationen der Faktoren Temperatur und Wasseraktivität im Medium eingestellt worden waren, ließen sich wieder zwei Induktionspeaks beobachten. In diesem Experiment hatte die Temperatur einen deutlich prominenteren Einfluss auf die Expression der Mykotoxinbiosynthesegene im Vergleich zur Wasseraktivität. Die Toxinbiosynthese korrelierte hierbei in jedem Fall mit der Expression der Mykotoxingene, was bedeutet dass eine starke Toxinbiosynthese durch eine erhöhte Genexpression widergespiegelt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass diese grundlegenden Reaktionsmechanismen generell und reproduzierbar sowohl für die Ochratoxinbiosynthese in *Penicillium*, die Trichothecenbiosynthese in *Fusarium* und auch für die Aflatoxinbiosynthese in *Aspergillus* (Daten hier nicht gezeigt) auftreten. Im Rahmen eines HACCP-Konzepts (Hazard Analysis Critical Control Point) wären die einzelnen Faktoren also als kritische Lenkungspunkte zu klassifizieren, durch deren Kontrolle sich das Gefährdungspotential der Mykotoxinbiosynthese modifizieren läßt. Durch den Einfluss eines einzelnen

Faktors konnte die Expression der für die Toxinbiosynthese relevanten Gene reduziert werden, um so in einer verminderten Toxinbiosynthese zu resultieren. Selbiges ließ sich auch im umgekehrten Fall beobachten. Das Ausmaß der Zunahme bzw. Abnahme korrelierte jedoch meist nicht mit den beobachteten Wachstumsoptima für den Pilz. Geringes Myzelwachstum lässt folglich nicht auf eine verringerte Toxinbiosynthese schließen und vice versa. Eine vollständige Repression der Mykotoxinbildung konnte durch die Anwendung von Einzelfaktoren nicht erreicht werden. Eine kombinierte Anwendung hatte jedoch synergistische Effekte, das heißt mehrere nicht zu einer Geninduktion führende Einflüsse potenzierten sich, so dass die Induktion der Transkription von Mykotoxinbiosynthesegenen fast vollständig verhindert werden konnte und somit auch die Toxinbiosynthese. Ebenso konnte im umgekehrten Fall eine Aktivitätssteigerung der entsprechenden Gene erreicht werden durch eine Kombination an Faktoren, die die Toxinbiosynthese erhöhten.

Offensichtlich aktivieren verschiedene Arten von physikalischen Stress die Mykotoxinbiosynthesegene. Diese Aussage wird durch die Tatsache unterstützt, dass auch andere Faktoren die als Stress eingestuft werden können, wie Fungizide (Ellner, 2005), einen ähnlichen Effekt auf Genexpression und Toxinbiosynthese haben. Doohan *et al.* (1999) beschrieb z. B. eine Erhöhung der Expression des *tri5* Genes in *Fusarium* nach der Anwendung von Fungiziden. Dies spricht auch für einen Zusammenhang von Stress und Induktion der Toxinbiosynthese. Eventuell versucht der Pilz durch die Exkretion der Mykotoxine in einer Phase der physiologischen Schwäche seine Umgebung zu sichern gegen Bakterien, Insekten, Fraßfeinde etc. Es lassen sich hierbei Unterschiede zwischen verschiedenen physikalischen Einflussfaktoren beobachten. Während Wasseraktivität und Temperatur ähnliche Auswirkungen auf Genexpression und Toxinbiosynthese haben, führt eine Änderung im pH Wert zwar tendenziell auch zu zwei verschiedenen Induktionspeaks, wirkt sich jedoch insgesamt weniger modifizierend auf Toxinbiosynthese und Genexpression aus. Möglicherweise hängt dies damit zusammen, dass hier

effiziente Regulations- und Homöostasesysteme vorhanden sind, wie das bereits erwähnte *pac/pal*-System. Vordergründig erscheint es widersinnig, dass es sich bei dem Hauptpeak unter nahezu optimalen Wachstumsbedingungen tatsächlich um eine Stresssituation für den Organismus handelt. Jedoch kann es gerade in einer Phase exponentiellen Wachstums zur punktuellen Nährstoffverknappung und somit zu einer partiellen Mangelsituation für den Pilz kommen, die auch als Stress einzustufen wäre. Es ist bekannt, dass ein Mangel an Stickstoff im Substrat die Aflatoxinbiosynthese in *Aspergillus* induzieren kann (Bennett und Christensen, 1983). Warum der Hauptpeak hierbei nicht absolut mit der höchsten Wachstumsrate korreliert, darüber kann nur spekuliert werden. Möglicherweise handelt es sich bei den zwei Peaks auch um jeweils unterschiedliche Kompensationsmechanismen bei gleicher Reaktion. Dafür spricht, dass jeweils bei Auftreten des Hauptpeaks bzw. des Nebenpeaks andere Sets an Genen besonders induziert sind. Nach dieser Annahme werden verschiedene Gene bei unterschiedlichen Arten von Stress induziert. Es konnte beobachtet werden, dass milde Stressbedingungen zu einer Induktion der Mykotoxinbiosynthesegene führten, während eine Verstärkung der Stressbedingungen schließlich eine allgemeine Verminderung von Genexpression und Toxinbiosynthese zur Folge hatten. Kolliputi (2006) fand beispielsweise eine erhöhte Aflatoxinbiosynthese, wenn *A. flavus* nicht-letalem oxidativem Stress ausgesetzt wurde. In Zusammenarbeit mit Professor N. Magan (Cranfield University, GB) wurden Wachstum, Genexpression und Toxinbiosynthese nach der Zugabe von geringen Mengen der Konservierungsstoffe Kaliumsorbat oder Calciumpropionat untersucht (Daten hier nicht gezeigt). Dabei konnte gezeigt werden, dass es bei einer bestimmten Konzentration dieser Konservierungsstoffe zu einer Induktion der Toxinbiosynthesegene in *P. verrucosum* kommt, und somit auch zu einer erhöhten Ochratoxin A Biosynthese. Eine weitere Konzentrationserhöhung führt schließlich zu einer verminderten Toxinbiosynthese (Schmidt-Heydt *et al.*, 2007c). Unter Bedingungen, die für den Pilz als stressfrei einzustufen sind, oder die über moderate Stressbedingungen hinausgehen, wird folglich am wenigsten Toxin produziert. Die Tatsachen, dass das jeweils auftretende Mikroarray-

Expressionsprofil bei verschiedenen Spezies und Toxinen ähnlich ist (*Penicillium*-Ochratoxin A, *Fusarium*-Deoxynivalenol und *Aspergillus*-Aflatoxin) und es jeweils zur Ausprägung von zwei Peaks nahe dem Wachstumsoptimum bzw. suboptimalen Bedingungen kommt, sprechen dafür, dass es sich hier um eine generelle Regulation handelt.

Ein wichtiger Schluss aus dieser Beobachtung ist, dass Lagerungsbedingungen die für das Wachstum von filamentösen Pilzen suboptimal sind, nicht zwingenderweise die Toxinbiosynthese durch einen Kontaminanten verhindern und das bei einigen Spezies unterschiedliche Bedingungen alternativ auftretende Metaboliten zur Folge haben. Um diese Möglichkeit abzuschätzen, müssen die verschieden auftretenden Chemotypen einer Gattung bekannt sein. Zwischen diesen Chemotypen unterscheiden zu können, war eine weitere Einsatzmöglichkeit des Mycochip. Über die differentielle Expression eines Gens des Trichothecenbiosynthesewegs konnte zwischen den unterschiedlich auftretenden DON-Chemotypen von *F. graminearum* unterschieden werden. Während ein Chemotyp das Toxin 15-Acetyldeoxynivalenol synthetisiert, bildet der Andere 3-Acetyldeoxynivalenol. Um 15' acetyliertes DON zu synthetisieren, muss eine 15-O-Acetyltransferase aktiviert werden, die durch das *tri3*-Gen des Trichothecenbiosyntheseclusters kodiert wird (Lee *et al.*, 2002). In Norwegen, Deutschland, Dänemark, Ungarn und der UK, wird hauptsächlich der 3-Acetyl-DON-Chemotyp gefunden, während in Frankreich und den USA meist der 15-Acetyl-DON-Chemotyp vorherrscht (Quarta *et al.*, 2005). Da durch die Acetylierung an unterschiedlichen C-Atomen des DON-Moleküls eine unterschiedliche Toxizität resultiert, ist es von Bedeutung die beiden Chemotypen im Vorfeld zu identifizieren, um eine Gefährdung einstufen zu können (Kimura *et al.*, 1998). Bei allen 10 untersuchten *F. graminearum* Stämmen gelang diese Differenzierung. Von diesen 10 Stämmen bilden 3 Stämme das 3' acetylierte DON, während 7 Stämme das 15' acetylierte DON bilden. Die Identifikation erfolgte hierbei anhand der differentiellen Expressionsmessung des genannten *tri3*- Gens. (Quarta *et al.*, 2006). Dieses Gen wurde wie erwartet nur,

bzw. im signifikant höheren Maße im 15-Acetyl-DON-Chemotyp exprimiert, da es für die Acetylierung am 15'-C-Atom des DON-Moleküls benötigt wird.

Die Expression der Mykotoxinbiosynthesegene war aber nicht nur Faktor abhängig und Chemotyp spezifisch, sondern zeigte besonders im Verlauf der Expressionskinetiken eine oszillierende Schwankung in Signalstärke und -dauer. Interessanterweise entsprach auch die Menge an gebildetem Toxin diesem oszillierenden Verlauf. Dieser ließ sich durch äußere Einflüsse in der Amplitude oder Altitude modifizieren. Beispielsweise verringerte sich die nachweisbare Toxinmenge, um nach Exkretion oder Reakkumulation wieder anzusteigen. Diese zwischenzeitlich immer wieder auftretende Abnahme der Gesamttoxinmenge sahen auch schon Bol und Smith (1990) und Knol *et al.* (1990) bei *A. flavus* Stämmen. Möglicherweise fungieren die Toxinmoleküle als eine Art chemischer Reservepool für die Synthese anderer Verbindungen. Überwiegt der Katabolismus sinkt der Gesamtlevel, überwiegt der Anabolismus steigt der Gesamtlevel. So kommt es zu einer Oszillation sowohl bezüglich der Expression der Mykotoxinbiosynthesegene, als auch der gemessenen Mykotoxinmenge. Diese Oszillation konnte in allen untersuchten Stämmen beobachtet werden. Die Höhe der Altitude dieses parabelförmigen Expressionsverlaufs war hierbei durch äußere Einflüsse modifizierbar (z.B. pH, Temperatur, Wasseraktivität), während die Oszillationsbreite von anderen Faktoren abhing (z.B. Licht). Doch weshalb und durch welche physiologischen Mechanismen werden diese Oszillationen getriggert? Gerade filamentöse Pilze, die als Erstbesiedler besonders anpassungsfähig sein müssen, haben eine Vielzahl an verschiedenen biochemischen und physiologischen Vorgängen miteinander zu koordinieren, um sich den im Verlauf eines Tages periodisch verändernden Bedingungen effizient anpassen zu können und so erfolgreich in ihrer jeweiligen Nische zu existieren. Durch solche Regulationsmechanismen werden unter anderem bei Pflanzen Blattbewegungen oder Blütenöffnung gesteuert (Johnson *et al.*, 2001), bei Tieren Herzfrequenz, Schlaf-Wach-Rhythmus, Blutdruck und die Körpertemperatur (Geiser, 2004; Heller *et al.*, 2004; Siegel, 2005), bei filamentösen

Pilzen Sporulation, Mykotoxinbiosynthese und Entwicklung (Bennett *et al.*, 1979; Adams *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2002, Idnurm *et al.*, 2005). Teilweise wird auch die sexuelle Entwicklung in filamentösen Pilzen durch Lichteinfluss gesteuert. In *A. nidulans* beispielsweise in Verbindung mit einem Rotlichtrezeptor FphA (Blumenstein, 2005). Grundlegend für alle oszillierenden Rhythmen ist hierbei ein Feedbackregulationsmechanismus (Tu *et al.*, 2005), also eine Hemmung der Transkription von Genen durch deren Produkte und umgekehrt. Wachstum und Entwicklung in filamentösen Pilzen unterliegen physiologisch bedingten Rhythmen mit unterschiedlicher Zeitdauer. Zu den Rhythmen mit relativ kurzer Periodenlänge von nur einigen Minuten, gehört beispielsweise die glykolytische Oszillation (Dunlap und Loros, 2006). Eine Schwankung der Genexpression, die eine Periodenlänge von Stunden haben kann, ist das rhythmisch ablaufende „Umschalten“ zwischen verschiedenen Nährstoffabbauwegen. Diese Art von Zyklen wurde beispielsweise in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet (Satroutdinov *et al.*, 1992; Tu *et al.*, 2005; Tu und McKnight, 2006). Das Verständnis solcher Rhythmen ist von elementarer Bedeutung für die experimentelle Planung eines Genexpressionsversuches, da die Expression eines untersuchten Gens sich ein Mal in einem „Expressionstal“ und ein anderes Mal auf einem „Expressionskamm“ befinden kann. Völlig unterschiedliche Ergebnisse sind die Folge.

Existenz und generelle Regulation von lichtgesteuerten Rhythmen in filamentösen Pilzen wurden erstmals in *Neurospora crassa* untersucht (Bianchi, 1964), einem bekannten Modellorganismus der Biologie. Außerdem in einigen anderen filamentösen Pilzen (z. B. Carlile, 1965; Tan, 1978). *N. crassa* verfügt über einen haploiden Lebenszyklus der eine einfache genetische Analyse erlaubt. In *N. crassa* wird ein circadianer Rhythmus durch das Zusammenwirken der Gene *wc-1* (White-Collar-1) (Ballario *et al.*, 1996), *wc-2* (Talora *et al.*, 1999) *frq* (Frequency) und *vvd* (Vivid) (Schwerdtfeger *et al.*, 2003) ermöglicht. Der prinzipielle Regulationsmechanismus ist schematisch in folgender Abbildung dargestellt (Abb.111):

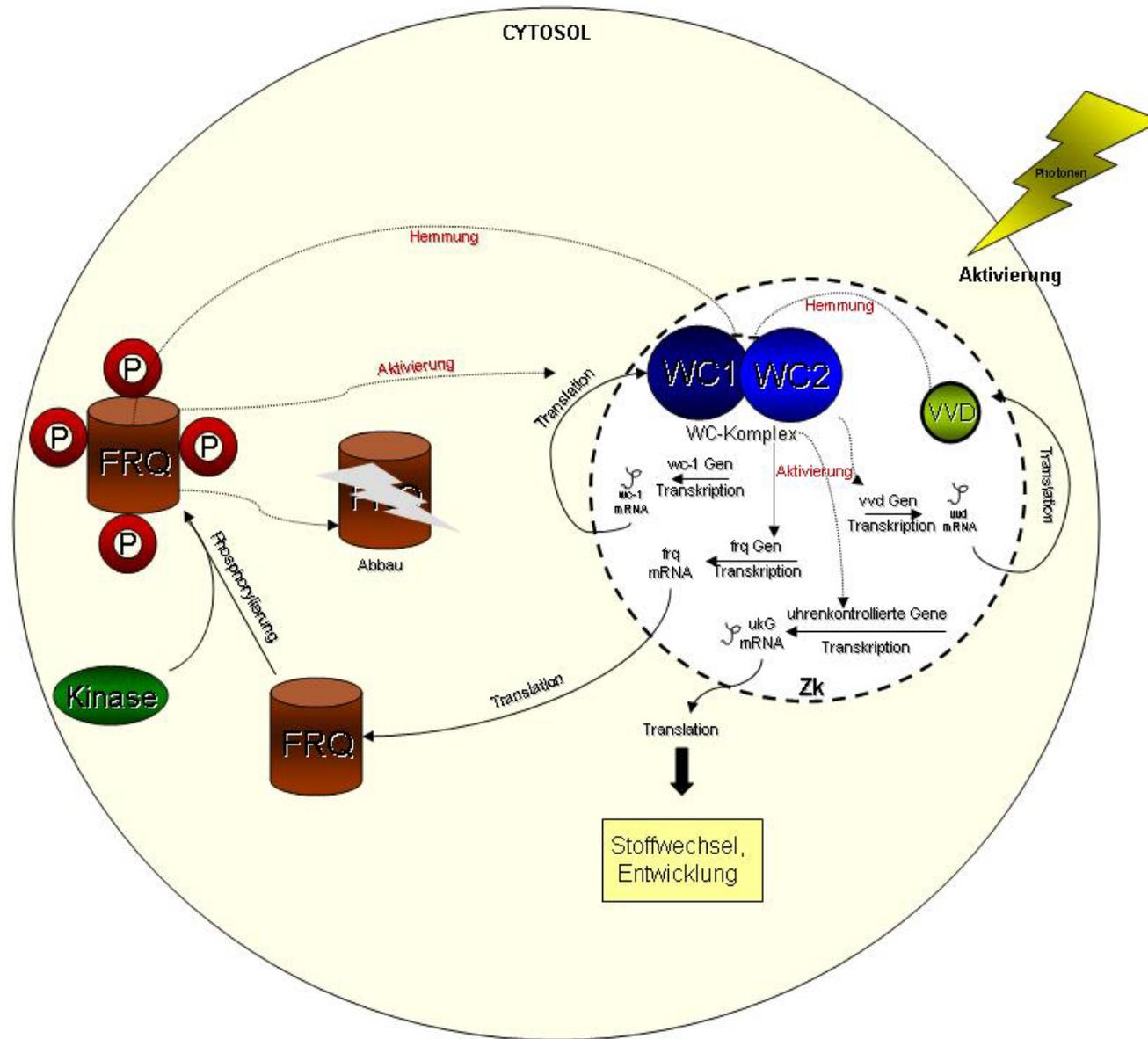


Abb. 111: **Schema des circadianen Regulationsmechanismus in *N. crassa*.** Interaktion der involvierten Gene. Die Transkription und Translation des Uhrenkontrollgens *frq* wird über einen kritischen Akkumulationsschwellenwert seines eigenen Produkts negativ rückgekoppelt. die Gene *wc-1* und *wc-2* sind Transkriptionsfaktoren und aktivieren ihrerseits die Transkription von *frq*. Sie bilden zusammen einen funktionellen heterodimeren Komplex, der durch Licht in seiner Aktivität beeinflusst wird und die Transkription nachfolgender, uhrenkontrollierter Gene beeinflusst.

Frequency fungiert hierbei als Uhrenkontrollgen, also als circadianer Oszillator. Die Produkte der Gene *wc-1* und *wc-2* (beides Zinkfingerproteine) agieren als Transkriptionsfaktoren, die zusammen einen funktionsfähigen, heterodimeren Komplex bilden (WCC), der die Transkription von *frq* durch das Binden an den Frequency-Promotor beeinflusst (Crosthwaite *et al.*, 1997) und wiederum durch *vvd* kontrolliert wird. Die Oszillation entsteht durch rhythmisch induzierte Transkription und Translation des Uhrenkontrollgens. Das Produkt akkumuliert in der Zelle bis zum Erreichen eines kritischen Schwellenwertes. Wird dieser überschritten, gelangen FRQ-Moleküle in den Zellkern, wo sie über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Transkription von *frq* inhibieren. Durch Unterdrückung der Neusynthese und Abbau der vorhandenen FRQ-Moleküle, kommt es zu einer erneuten Transkriptionsinduktion des Uhrenkontrollgens. Die Transkription nachgeschalteter, so genannter uhrenkontrollierter Gene wird durch diese Rhythmik, bzw. den WCC-Komplex ebenso induziert bzw. reprimiert. Uhrenkontrollierte Gene sind zum Beispiel die der Konidienbildung. (Loros *et al.*, 1989). Die oszillierende Konidienbildung äußert sich bei *N. crassa* in einem typischen Tagesringartigen Konidienmuster (Greene *et al.*, 2003), ebenso in *A. nidulans* (Mooney *et al.*, 1990) und *P. glaucum* (Moreau *et al.*, 1912; Hall *et al.*, 1933). Während der Expressionskinetiken konnte sowohl in *Fusarium*, als auch in *Penicillium* eine Oszillation der Mykotoxingene beobachtet werden. In Letzterem sind deutliche Konidienringe erkennbar, was für eine oszillierend ablaufende Regulation der Sporulation spricht (Abb. 112 B).



A



B

Abb. 112: Oszillierende Sporulation in *N. crassa* und *P. verrucosum*. **A** *N. crassa*; **B** *P. verrucosum*, BFE808. Deutlich bei beiden Stämmen erkennbar, ist die oszillierende Sporulation, welche zu einem charakteristischen Ringmuster führt.

Wurde *P. verrucosum* bei gleich bleibender Temperatur inkubiert, so lief die Oszillation der Genexpression des Ochratoxinclusters in einer 7 Stunden umfassenden Periode ab, es konnte jedoch bei der Durchführung von

Feinkinetiken zusätzlich eine ungefähr 24 Stunden andauernde Oszillation wiederholbar beobachtet werden. Um eine vorhandene Rhythmik noch zu verstärken wurde der Pilz unter 12 stündig alternierender Hell-Dunkel-Phase inkubiert damit sich eine etwaig vorhandene circadiane Uhr einstellen kann. Auch dann trat die beobachtete Rhythmik jedoch nicht immer so klar im Verlauf der Hell-Dunkel-Phasen auf. Wurde dieser Versuch über mehrere Tage durchgeführt, kam es zu einem Anstieg in der Gleichmäßigkeit der Rhythmik. Möglicherweise ist eine lichtabhängige Genregulation nur teilweise oder rudimentär in *Penicillium* vorhanden, bzw. wird durch Nährstoffrhythmen oder einen sich verändernden physiologischen Zellstatus überlagert. Wie auf Abbildung 113 deutlich zu sehen ist, konnte jedoch ein signifikanter Unterschied in der Gleichmäßigkeit der Expressionsoszillation zwischen den Stämmen festgestellt werden die unter alternierender Hell-Dunkel-Phase inkubiert wurden und jenen, die nur im Dunkeln inkubiert worden waren.

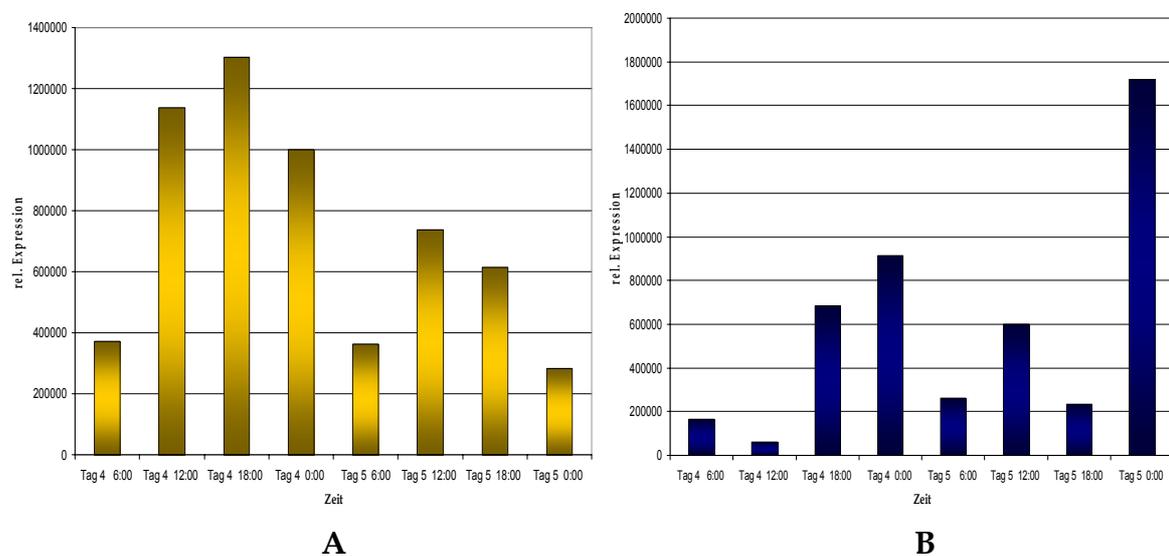


Abb. 113: **Real Time PCR Expressionsanalyse, Vergleich Hell-Dunkel, nur Dunkel.** Real Time PCR Expressionsanalyse des *otapksPV* Gens, eines initialen Gens in der Ochratoxin A Biosynthese. Es wurde jeweils über einen Zeitraum von 48 Stunden analysiert. Hierzu wurde *P. verrucosum* jeweils unter 12 stündig alternierenden Hell/Dunkel-Phasen inkubiert **A**, oder in ständiger Dunkelheit **B**.

Bei Letzteren war keine gleichmäßige Rhythmik zu beobachten, vielmehr kam es zu ungleichmäßig verteilten Peaks. Interessanterweise wurde während der Dunkelphasen mehr Ochratoxin A synthetisiert im Vergleich zur Hellphase. Vielleicht ist diese Beobachtung durch den Umstand erklärbar, dass Sporulation

und Biosynthese von Sekundärmetaboliten oft gekoppelt auftreten (Calvo *et al.*, 2002) und die Konidienringe meist in den Dunkelphasen gebildet werden und so auch in diesem Zeitraum mehr Toxin synthetisiert wird. Möglich wäre auch, dass Toxin durch Lichteinfluss zum Teil degradiert wird, bzw. dessen Biosynthese durch das WCC-System negativ reguliert wird. Um den Einfluss des WCC-Systems zu verifizieren, wurden Homologe der Gene in *P. verrucosum* gesucht und identifiziert, die in *Neurospora crassa* für eine circadiane Rhythmik vonnöten sind. Das dem Blaulichtrezeptor (Fröhlich *et al.*, 2002), *wc-1*, entsprechende Gen, wurde in *P. verrucosum* durch homologe Rekombination inaktiviert. Durch die Inaktivierung konnte die Rhythmik nicht persistent gestört werden, jedoch synthetisierte die $\Delta wc1$ -Transformante eine ca. 10-fach höhere Menge an OTA, was nahe legt dass die Transkription der Ochratoxin A Biosynthesegene durch den WCC-Komplex reguliert wird. Demnach gehören die Ochratoxinbiosynthesegene zu den uhrenkontrollierten Genen. Ist im Wildtyp der WCC-Komplex aktiv (Hellphase), so wird weniger OTA gebildet, der OTA-Cluster also reprimiert; ist der WCC-Komplex hingegen weniger aktiv (Dunkelphase), so kommt es zu einer gesteigerten Toxinbiosynthese.

In weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass besonders der Blauanteil des Spektralbereichs einen Einfluss auf den Metabolismus des Pilzes hat. Die Expression der Mykotoxingene wurde unter Blaulicht am effektivsten inhibiert, unter Rotlicht moderat und bei Gelblight kam es sogar zu einer Steigerung der Expression im Vergleich zur Dunkelkontrolle. Unter Blaulicht resultierte außerdem ein glasartiges Myzel. Sporulation und Ausbildung von Luftmyzel wurden offensichtlich unterdrückt. Das der WCC-Komplex in diese Regulation involviert ist wurde dadurch bestätigt, dass die $\Delta wc1$ -Transformante durch das Blaulicht nicht tangiert wurde. Hier wurden weder Sporulation, noch Wachstum oder Toxinbiosynthese inhibiert. Es stellte sich zudem heraus, dass Ochratoxin A durch Bestrahlung mit Blaulicht zerstört wird. Die molekularen Hintergründe sowohl der Wachstumsinhibierung des *wc-1*-Wildtypstammes, als auch der Sensitivität des OTA-Moleküls, sollten in Zukunft erörtert werden um die

zugrunde liegenden Mechanismen verstehen zu können. Auf Grundlage der bisher ermittelten Daten konnte folgendes Modell für die Regulation der Transkription von Mykotoxinbiosynthesegenen erarbeitet werden:

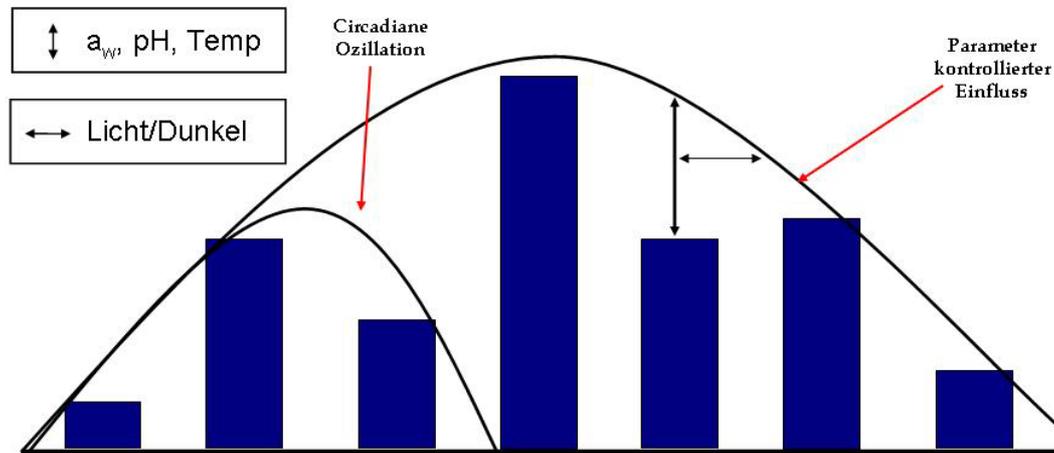


Abb. 114: **Modell der oszillierenden Genexpression.** Diese verläuft zyklisch und kann in der Amplitude durch bestimmte äußere Faktoren beeinflusst werden, während die Ausprägung in der Amplitude von circadianen und nährstoffabhängigen Rhythmen reguliert werden kann.

Modell der oszillierenden Genexpression (Abb. 114): Die Expression der Mykotoxingene verläuft oszillierend und wird zum einen beeinflusst durch äußere Faktoren wie Wasseraktivität, pH und Temperatur, sowie zum anderen durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Unter Berücksichtigung dieser Fakten ist es möglich die Grundlagen der Toxinbiosynthese zu verstehen und ein Modell für jeden beliebigen filamentösen Pilz auf unterschiedlichen Matrizes zu generieren. Mittels solcher Modelle kann für einen bestimmten Faktor, bzw. Kombinationen hieraus und für ein bestimmtes Lebensmittel eine mögliche Toxinbildung vorhergesagt und durch Einflussnahme über die Modifikation bestimmter Einflussgrößen auch verhindert werden. Die in unterschiedlicher Ausprägung auftretenden Schwankungen in der Expression müssen bei der Probenahme berücksichtigt werden, um eine möglichst objektive Aussage zu erhalten. Der Einfluss dieses Modells auf die Pilzzelle ist in Abbildung 115 dargestellt und zeigt den hypothetischen Regulationsweg. Von außen wirken Einflussgrößen auf die Zelle ein, die über ein Netzwerk an Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden die Expression u.a. der Mykotoxinbiosynthesegene regulieren und in deren Ausprägung modifizieren.

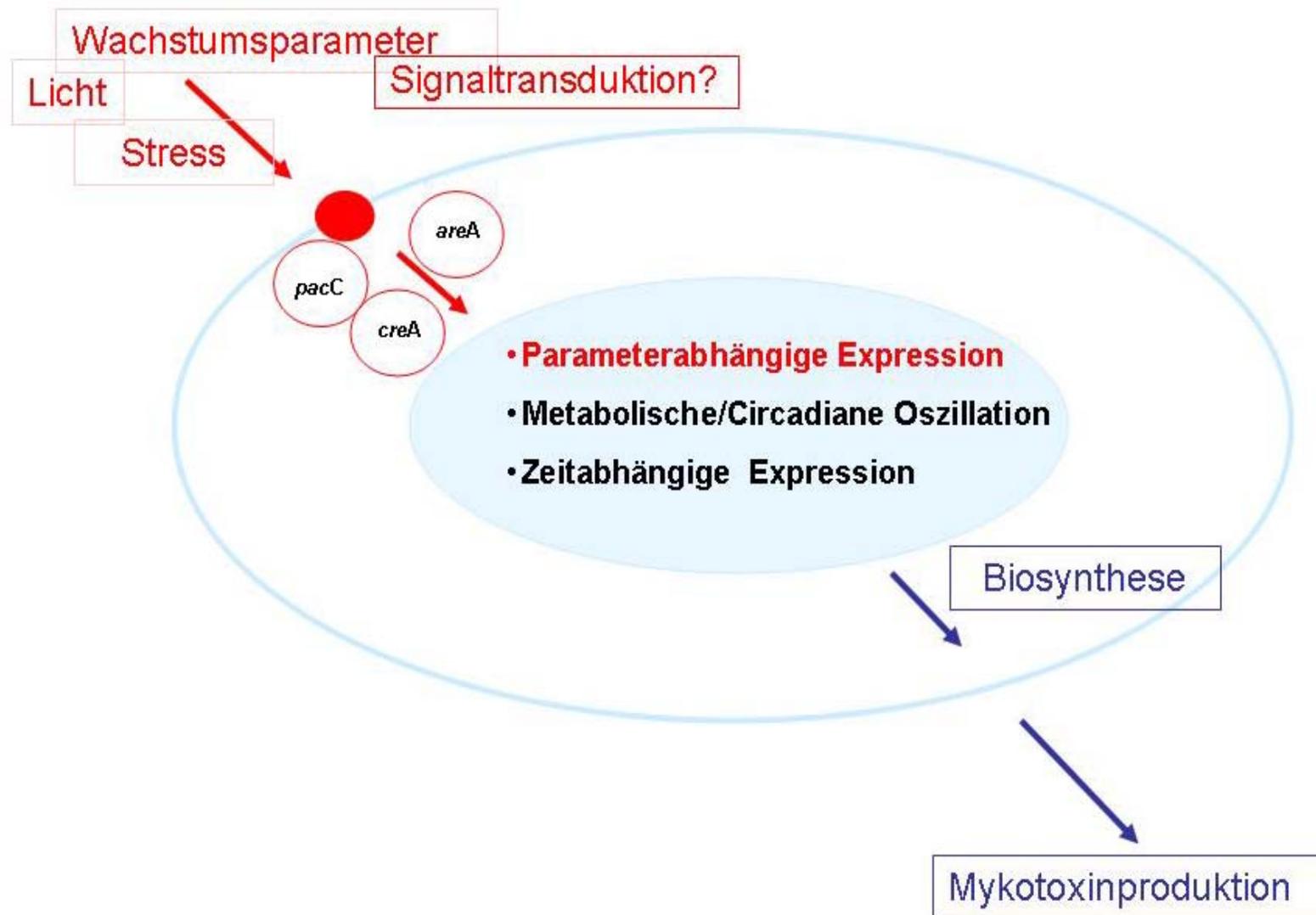


Abb. 115: **Regulationsmodell.** Modell der Einflussgrößen die die Physiologie der Pilzzelle verändern und Genexpression und Toxinbiosynthese modifizieren. Von Außen wirken hierbei verschiedene Parameter auf die Zelle ein, die über bestimmte Transkriptionsfaktoren und nachgeschaltete Signalwege die Expression der Mykotoxinbiosynthese gene steuern und so die Biosyntheseleistung modifizieren.

Schlussfolgerung und Ausblick: Das entwickelte Differenzierungs- und Monitoring-Tool „Mycochip“, konnte als ausreichend spezifisch und sensitiv validiert werden und kann für beliebige Fragestellungen eingesetzt und erweitert werden. Eine Analyse der Mykotoxinbiosynthese auf transkriptionaler Ebene ist möglich. Hierbei sind Wachstum und Toxinbiosynthese nicht korreliert, während Mykotoxingenexpression und Toxinbiosynthese eine starke Abhängigkeit voneinander zeigen. Eine Korrelation der Expression aller mykotoxinspezifischen Gene mit der Mykotoxinbildung ist jedoch nicht gegeben. So konnten so genannte Schlüsselgene identifiziert werden die mit der tatsächlichen Biosynthese korrelieren. In dieser Arbeit wurden dabei zum ersten Mal die Auswirkungen verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Transkription von Mykotoxinbiosyntheseclustern in verschiedenen filamentösen Pilzen untersucht. Entsprechend der erhaltenen Daten, haben externe Parameter wie Wasseraktivität, Temperatur, pH und auch Licht unterschiedlicher Wellenlänge einen starken Einfluss auf die Expression von Mykotoxinbiosynthesegenen und damit die gebildete Toxinmenge. Die Genexpression kann durch das Verändern jeweils eines Faktors in unterschiedlichem Ausmaß inhibiert oder gefördert werden. Eine fast vollständige Repression der Toxinbiosynthese ist jedoch nur bei einer konzertierten Veränderung mehrerer Faktoren möglich. Systematische Genexpressionsanalysen lassen zudem auf eine Stressadapationsfunktion der Mykotoxine schließen. In weiteren Experimenten nach Abschluss dieser Arbeit konnte gezeigt werden dass mykotoxinproduzierende Stämme der Spezies *Penicillium* resistenter gegen Stresseinflüsse sind als nichtbildende Stämme. Möglicherweise fungiert hier das Mykotoxin stressprotektiv. Da Ochratoxin A eine starke Bindungsaffinität zu einigen Proteinarten aufweist, werden diese möglicherweise stabilisiert was eine Denaturierung unter suboptimalen Bedingungen verhindern könnte. Diese Hypothese wird zurzeit anhand der Hitzestabilität von BSA (Bovine Serum Albumin) nach Zugabe von unterschiedlichen Mengen an OTA untersucht. Vom Standpunkt der Nahrungsmittelsicherheit ist also darauf zu achten, moderate Stressbedingungen zu vermeiden, oder der Stress sollte so stark sein, dass er zu einer vollständigen Inaktivierung der Mykotoxinbiosynthesegene führt. Die der Genexpression zugrunde liegende, faktorspezifische Signalverarbeitung durch die Pilzzelle, soll in zukünftigen Analysen erörtert werden, ebenso die Zusammenhänge zwischen Photorezeptor vermitteltem „Lightsensing“ und Mykotoxinbiosynthese.

Mycochip-IV: Gensequenzen und Accession Nummer

Gen	Oligonukleotidsequenz	Accession
<i>Aflatoxin A. flavus</i> [C]		
fas2	CACGGTGGGCGTGGACCTGGTTCCTCTCGCCTCCTTCGATGCATACAAGAATGCCATCTTTGTTGAGC	AY510451
glcA	ACGGCTGCATATCCCAACGACACAGAGCTTACAAGGTGACATTAGAGCAATTCGCGTAAAGTCTCG	AY510451
hxtA	AGAAATGATCAGACCCTCCATGTTTCGAGCTTATATTCTCGCCGACATTCTTCGCAACTATAGCGGTT	AY510455
nadA	GTCAGGAGCCATTCTTTGCCACGACATATTGAGTGGCAAGATACTGGCGCCATAATTCCGGTTATG	AY510453
sugR	CCATTCAGTCAGGAACGGCATCTGTTCTGCACCGGGCACTTCAAAGGCTGGTATCGCCCTGGATGAGT	AY510451
norB	GTGATGCAGAAAGCGCCATATGTGTTTCCATTGTTGGAGTCCGCAAGGTCGACCATCTCACGGGCGT	AY510452
cypA	CCACCCGGATGGGAACAACCTGCATCGGTATCTGATTGTCTTTAGCAAAGGCAGTCGGCATTGCCTC	AY510452
ordB	GTACAGTGACCTAGCGAAGGCCGAGAAGATCTTACGTGCTCAGAAGCATTGGGTGTCCACAACCTTCG	AY510452
aflT	TCAGGTGGCCCTAATTTGCAGCTGTCTTAGCATTCTCGGCGCCGTCGGGATCGAATGGAGAAGCGTTA	AY510453
pksA	CAGACGGTGCTAATCATTTTACGTGATGCAAAAGGAACATGTCTCTATAATTAGCGATCTGATCGACCGGG	AY510453
nor1	ACTACATGGTGCGCAAGTCCACTTTGAGAACAAATGGCTCACGGCCTTCATCATCGATCCAGGACAT	AY510453
aflJ	GCGGGAAGTTCGCTCTCCACTAACGCCGTTATTGCATTGAGATTAGTACCGTGTGGATAACGATG	AY510453
adhA	GGGAGTACGCTGTAACCTTCTGTCTCTTGGTTCATCGACACCCCACTGATTGCGCCTATGAAGAAGG	AY510453
estA	ATGAAGGGGGCGTTAGACACTGCTAAGGTGCCGGTCATGTACGATGCTATCCGGGATATC	AY510453
ver1	GGCTGTGTTCGCGGGAGTATATCCCAATGGTGGAGACTTTCACCGATGAGCAGGTAGACGAGTGCGCCG	AY510453
verA	ACGATGAGTGGGATAGCATTACCCGGCCACTACTTCAAAGAGGTTAATGGGCATCGTGCCTACCAG	AY510453
avnA	CGTGGAAATGCGGTTGATCCTAGTCAAGCTTCTCTGGCATTTCGACCTACGATTAGATACTACGCAGA	AY510453
verB	GAGCAACAGTTTGTGGCCGATTCTGTGCCGAAGAGACTAGGGTCCGGTGTAGCCATCTTGGCGCCTAC	AY510453

omtB	GATATTCCTCAAACCTCTAGCTAACGCGCAGCCAGCGGCAGGGTTCGAGTTCATGGAGCACAATTCTT	AY510453
ordA	CGTGATCAGTCAACCGGGCGCCTTTGACCTCAATGTGGTTCCTCGCAGCCCTGCTCACGAAGAATTGA	AY510453
cypX	TGTCGTTACGCAGAACTGGAGTCTGCACGGCAATCCGAAGGTGTGGAAAGACCCTCATACATTTGATC	AY510453
moxY	TACGTGGTTCAGTGGATTAAGAAGGCCAGAAATGAGAATCTCCGTAGCTTCGTGCCGCGGC	AY510453
hypA	AGAAGGCAGACTTTCTAACACTGGCACACATGACTATGGATTCGGTCGAGCGCATGTGGATCCAAAT	AY510453
omtA	GTTGAGGACACTGATAAAGTCACCATGATGGAGCATGACATTCGGCGCCCCAACCCGGTGCCTG	AY510453
vbs	TCCACAATACGACGGCAAGAATTATTTTAGTATGTCTGCCGCTCTGATGACCCCTCAGTCGTGGTA	AY510453
avfA	CGGCTCGTTTGAGGGAGAAAATAGCGAAGAAGACAGTAGTTGTCGGGATTGTGTGTTCTTCCTGGTA	AY510453
afIR	TGGAGACGATGCAGCAGGGATACCGGCGCACCATCCAGCGTCCCTTTCTCACTACTCGGGTTTAGTG	AY510451
norA	CCGTACTAACATGACGAGCAAGGATATATGGCAGCTGTCTGCAAACTCGGCTAGAAACAGTGCCCA	AY510451
fas1	CAACATCAACTCGCAGCAATACGTCTGCGCAGGCCATTCCGAGCCCTTTGGATGCTGGGTAAGATAT	AY510451

Fumonisin *G. moniliformis* [H]

<i>npf1</i>	TCGTCAAGATTCGGCGACCCTGCAGAGTACACCAAGTGGATGAAAGAGTTCTACGATAAGCAGG	AF155773-23
<i>wdr1</i>	TGGCGGTGAACGCAAGAGCTGGTGGATGACTTCAAGTACAGACCCATCTTCGGTGTGTCGCCCTC	AF155773-24
<i>png1</i>	TTCTCCATTGATGGAGCTACTGATGTCACTCGACGATACGTGCGCAAGAATCAGCATGCT	AF155773-25
<i>znf1</i>	CGCTGCCGCTGTGGTCAGAACATCCACGAGGAGTGTTCAGAATGTGGGCGCAGACAAAGG	AF155773-3
<i>zbd1</i>	GCGCGGAACTATTCGGTGTGAGAAGATCATTCAACAGTCTCGACGCCAAAGATGGGCTTGGT	AF155773-26
<i>fum1</i>	AATTCGCCTCCTAGTCGCCTCATGTGAGGAAGACCCGGGTATCTTGAGGATCCGGCAACGGTTG	AF155773-5
<i>fum6</i>	ACCTGTGATTATGGTGGGAGCCGGAAGTGGACTGGCTCCGTTCCAGAGCCTTTCTACAAGAGCGCA	AF155773-6
<i>fum7</i>	GCCCAGTTTCATCAGATAGCAGAAAACGCTATGGAGGATGTCTGCACACAAGTTAATCCGGTTGA	AF155773-7
<i>fum8</i>	AGGGTATATCATTAGCAGTGCCTCATTGAAAGTACACACTGTAAGTTCCAAGAGCTTTGTCT	AF155773-8
<i>fum3</i>	TTAGTATGGGCACCGCCAAGAAGCTTCCGGTCCGCTCCAGCGTTGCCITGGGATTTCCGATCTCA	AF155773-9
<i>fum10</i>	GAGATTTGTCTTCGGGGTAAGAATATCATGGCGGGTTATACTAATAACCCTGCCGCGAACAGGGA	AF155773-10
<i>fum11</i>	CCACGGGCTGAGTGGTTCCTTCAAGGATCTGGCCTACTACCGCTCGACAGTCCGCAGGCAGCG	AF155773-11
<i>fum12</i>	GCTACCAGGCACTGGGTATGAAAGTGACCGCAAGGGCATTCTGCAGCCTTTTTTGATCGGTCCCC	AF155773-12

<i>fum13</i>	GCCCAAGGGACTAGCAGCAACACCATCCGATGTGACGAATGGCAGTAACATCTTCGGTATTGGTC	AF155773-13
<i>fum14</i>	TTTACAGAAGCAGGGCCAGTTGCGACTTCGAATGTACTATCAGTCGCAGCTCTGAGTCACGATA	AF155773-14
<i>fum15</i>	GTGTCTCGAAGTTATGCGGTACTTCGCCCTATACCACTACAATGCGAGAGGCAACGTGTGACA	AF155773-15
<i>fum16</i>	TGTCAAAATGCAAGGTGGCGAGTATATCGCCCTGAAAAAGCTTGAATCCATCTACAGGACATCTC	AF155773-16
<i>fum17</i>	ACCGTTGGTCCTTTCGAGCTTGACTGGGAGGCAGAACAGTACAAATGCCAATTATCTCAGTTCAT	AF155773-17
<i>fum18</i>	AGTGTATACTCAGATGTTCTCGAATAATCGAGCCGTCTTGTTTCATGGGCTCTGCCAATGACCT	AF155773-18
<i>fum19</i>	CGCAATCCATGTCAGAACCAGCGCCCAAGGTGGGCTTCTCTACTCGATGAGCCTAGTTCGCT	AF155773-19
ORF20	CGGATTGTGTGGAGTAGATACACACGATTCCGCCTTTATCTACGTGCAGCTCACTTCGAAACAT	AF155773-20
ORF21	GACGCTGTCTGCAGTGCCTGGTCCAAACGATCGACCTTACGTGCAACATGGAATAAAGTCACT	AF155773-21
<i>mpu1</i>	CGCTGTCTTAACTACCTGGCCGGTCTTTGTCTCGAATCTTCAACCCCTCCAGGAAGTTGACG	AF155773-27

Trichothecen *F. sporotrichioides* [J]

<i>fpp</i>	ATCCCTCTCGGAGAGTACTTCCAGATCCAGGACGACTACCTTGACAACCTT	FPP-0
<i>p450</i>	GAAGAACCCTGACAAGTTCGTTCCGGAGCGTTGGCTTGACATTTACTCGAAAATCAGACGTCTT	AY226098-0
<i>tri10</i>	GGTCTTATGAAGCGACATTCAGCTCGTTAAAGAAGTACGACGGAGTTCITGAGGIGTGGAAAGATGCT	AF359360
<i>tri6</i>	CAATGTCTTAGAGTCTTCAGCCGCGTGGATAACATGAGGGATCACTATAGG	U22150
<i>tri16</i>	TCAACAAGTGTGCAAATGCACCATTCTACGAATGTGACTTTGGGCCATCGCTTAGCGAAGATT	AY187275-0
<i>tri15</i>	TCCCGACACTCAAGTGTGACCAGACGCGAGAAGCGACAAAGGGCTACTGCCGCGCATCAGC	AF327521-0
<i>tri14</i>	GCCGAGAACATGACACCGGATTATCCCTACGGTGGCGTGTGCGTTTATCAGGATAAGACTAAGCA	AF326571-0
<i>tri13</i>	TCTCTAGCTACCGTACCATCGAAGGTTGACTAGCATGCCGGAACATTCCTACATCAGTCTGGCG	AF330109-0
<i>tri12</i>	TTGGACTGCTACTTAACTGACCACGTTCCGCATCAGCTTATGACAGAAAG	AF011355
<i>tri9</i>	TCGCCGTGTAAACTTCAACTACAGAAACCTAGCAAAACCATCTATATCACCCA	AF359360
<i>tri1</i>	GATGTGCGGTTAGCGTTGGAGGATATTACTCTCGAAGACGGCACCTTATTCTAAAGGTCATC	AY040587-0
<i>tri8</i>	CACTACGAGGAAACCAACAATAGTTATAAGGCGGCTGTTTCTAGTGGCTTGAG	AY032744
<i>tri7</i>	GGCATTCTGACTGTGCTGGACTCTCACCACGATCAGTAGTTTTATATGC	U22463
<i>tri3</i>	GTTGTAAACCAGTCTTTGCCATATCTCTGGAGGGACGCTTCTACCCTCAAC	U22463
<i>tri11</i>	GCAAGAACAGTTGGGAGTTGATATTCGTCTTTCTGAAGGTAGCCGGAAT	AF011355

<i>tri101</i>	CTACTGAATTCTGCCGCGCTGTCGACATGCGGGGCCCAATGGGCGTATCAAGCACATACCCAGGCCTT	AF127176
<i>tri4</i>	CTCTAGACAGTGCATCGGTTACACAATGGCCTTTGCTGAGATGTATCTTG	U22462
<i>tri5</i>	ATTGGCGAATGTTTCGATCCAAGGATGTGAAGGAGGTTTCAGAAGCCTTTTCTGAGCTCAATTG	AF359360

Trichothecen *G. zeae* [I]

<i>tri5</i>	CGTGGCACTTGTGCGACGCTAGATACCGCCTCCATGAGATTTATGAAAAGGTCAAGGATCAGGATAACA	AY102584
<i>tri4</i>	AACITGAAGTACAAGGAGCATGTCATCCCTAAAGGAACCTCCATTTCTCAGTCCACCTATTTTCATGCA	AF359361
<i>tri11</i>	GAGATGCGCGTTTCAGTAGTGACCGACTGGATGCGGTCAAGCCATTCTCAATCGGACCACGGAATTGT	AF359361
<i>tri3</i>	AGCTCTAGAGAAGGCTTGCAGGGATATCAAGAAATGTTACGATCAATGGCTTGAAAATCCGTTCCCTGG	AF359361
<i>tri8</i>	AGACTGGCTTTCTCGTCTGCTGAGGGTTTTACCATCAACGAAGCTGGCGTCGCCTTTTATGGAATTGAT	AF359361
<i>tri9</i>	CTCATATGAGATGGACCCTGATGTCTCGTGGCTCGAGGTTTTCGCATACTCGGGAGTTAGCGCTGCTT	AF359361
<i>tri12</i>	TATGATAGAAATAAAGCGGATAAAGGACGTACTTGAGGGAGATTCGGATTTCGAGTCACTCCAACCTA	AF359361
<i>tri14</i>	TTGCCGAGAATATGACACCGGATCATCCCTTCGGTGGCGTGTGAGTTTACCAGGATAAGACTCAGCAG	AF359361
<i>tri6</i>	ACGGGACTTTAGGCGGCATTACCGGCAACACTTCAAGCGCTTTTCTGTCTGCTACTCAGAATGCCCTC	AF359361
<i>tri10</i>	GATAGTGTGGCCGGGACGCTTCAATTGTTGGAGAGGCTCCCAAATCTTGAAGCTGTCACGAGCGTTAC	AF359361
<i>tri102</i>	AACAACCAGTACCCAAAAGAAATCGGAAGCCATCTGACTTCAGCCCTGCGTGGTACGGATATCCGCA	AF336365
<i>tri13p</i>	TCGCACCATAGAAGGTCTGACTAGCATGCCAGAGTATTTATATATCAGGCTGGCAAAGAGCGATTGA	AB060689
<i>tri13</i>	TGACCACGACATTGGAGCTTTCAAGCCCGAAAAGATGGCTCATAACAGAAGGAGTCATCGACTGGAACCG	AF336365
<i>tri7</i>	AGCTCTATGGCGCCGCATCACCGTGGCCACAAAGCAAGACGGAGACGAAGGAGTCCCTCTATGGCACA	AF336365
<i>orfF</i>	ACCTGCACTATTCACGCGAGTATGGAACACTCCAGGATCAAGTCATGGTTTTAATGGAAGGCGTGA	AF359361
<i>orfE</i>	AAACAATGCCATTCTCATCGAGAACTGTTACAACCTAGCTATCCGAGATGGTGTCTGTTAACGGAGGCG	AF359361
<i>orfD</i>	GATTCCTTACATAAAAATACCCGTTCTTACACTCAGCGAAAACGACAAAACGGAATTGGTGCTTT	AY102584
<i>orfC</i>	TGCGACATTGCCATCACAAACGGTTTCCCTACTGGCAGGGTGTCCCATCAAGGATGCTCTCCGCCT	AF359361
<i>orfB</i>	ATCTGGACCTCAACACCGCAAGCACCAAGTATGTTAATGCTATTGGCCAAGAGAACGCGGATAAATAC	AF359361
<i>orfG</i>	CTATTCGTCTTTTGGCGGTGCCGAACCCCTCTCTAGACTTGTACAACGCTGGCCTAAACCATGGAGGCT	AF359361
<i>orfH</i>	TTCATAGGTAACCTACGATCGAAAGCTGGGAAGATTTACCGAACTGCGAGTTAACGTCTCGGGCAA	AF359361
<i>orfI</i>	TTGAGGAGATAAAAATTCCACCCCTATGTAGCTCGCAAAGAGTCGACTGGCTTCATCTACAACCGTCTT	AF359361

orfJ	CGGTACCCAAAGAACTTCAAAGTTTATTACATGTTAGATGAACCGCTAGCGATTGGGAGCATGGCTC	AF359361
orfK	ATATGATCCTACCAGGAGGATATCGTCTCCCAAAGGGTGCAGTAGTATTTACGCGCTTCATCACATG	AF359361
orfL	GTCTTTAACGGAAACGGATACAAGAAATTAATGGTACCATCAGCTGTGATGCACTCGAATGGAGAGA	AF359361

Trichothecen *F. poae* [F]

<i>tri5_FP</i>	AACITGGCAAACGTTTCGATCCAAGGATGTGAAGAATGTGAAGCAGATTGAAAAGCCTCTGCTGAGTTCA	AY130294
----------------	--	----------

Positivkontrollgene versch. Species [E,G]

btbPv	CGGACAGTAAGTTTTAATGGTGATGTTGGTTTCTGGTGGATTGCACGTCIGATATCTTGCTAGGT	AF001205-0
btbPn	CGCGTTGGGTATCAATTGACAAGTTACTAACTGGATTACAGGCAAACCATCTCTGGCCGAGCACGG	AY674319
actin	GCTGGAGCGCATGAACGCTACTTCAACGAGGCTTCCGGTGGCAAGTATGTTCCCGTGCCGTC	AY160979-0
btbAo	ATGGACAGTAAGTTTTAAGTGTGATGGGGTTCGGTAGATCATACATCTGATATCTTCTAGGT	AY160979
btbFspc	CATGAGCGTCTACTTCAACGAGGCTCTGGCAACAAGTACGTCCTCGCCGCTCCTCGTCGATCTTG	AY725266
atbGz	CCCCACTGGTTTCAAGCTTGGTATCTGCTACCAGGCTCCCGAGAACGTGCCAACGGCGACCTCGCCA	AY860418
btbFp	ATGCGTGAGATTGTTACCTTCAGACCGGTCAGTGGGTAACCAAATCGGTGCTGCTTCTGGCAGAC	U85572
btbFs	TCTGGCGAGCACGGTCTCGACAGCAATGGTGTATACCGTACCTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGCAT	AF404188

Ochratoxin *P. nordicum* [B]

<i>t08_ab</i>	ATATAACAGAGTAATAGATTAGCTCTAGTCCTTTCTATGGCTGTCGCAGGCGTCATTTCAAGA	T-08_aB
<i>otapksPN1</i>	CACCTATTTATTCAAGTGGGACTCGTCGCTGTTCTTGATTTCATTGGGTCTACAGCCCAATGCGATAA	AY557343
<i>otapksPN2</i>	TCTCACCTATTTATTCAAGTGGGACTCGTCGCTGTTCTTGATTTCATTGGGTCTACAGCCCAATGCGA	AY557343
<i>npsPn1</i>	TCTTTATAGGACCTGCTTTCTAAGATTGTTGTGGAAATCGTTCACACCCGCCAAAAGACACAGCGAGA	AY557343
<i>npsPn2</i>	TTTATAGGACCTGCTTTCTAAGATTGTTGTGGAAATCGTTCACACCCGCCAAAAGACACAGCGAGAAA	AY557343
<i>nregPn1</i>	CCGAGAAACCTCATTACTCCACGGCTATGGGTGTTGCATTGCGCTGCAGCTAGTTGGTGGTCTTTCG	AY557343
<i>nregPn2</i>	CGATCTGGACCCCTACACGTAATTCGAAACCGAGAAACCTCATTACTCCACGGCTATGGGTGTTTGC	AY557343
<i>otaTraPn1</i>	GGAACITGGCGCTGCGCTCTTGAGCACAGTTGCGTTGGCTAGTGTACCTCAATGGTTTGATCGAAAGGC	otaTraPn1

<i>otaTraPn2</i>	GGCTAGTGTACCTCAATGGTTTGATCGAAAGGCAGCCTTIGCAATTGGGATTTGATGTCGGGGCGCCG	otaTraPn2
<i>otacHIPn1</i>	TGCTCGACAAAGTCGGGAAGAGAGCCATGGTGGCATACTTGGGAAGTGTTCTGATAGTGTCACTTGGT	DQ100374
<i>otacHIPn2</i>	ACAATCCCTCCATAGGTTGTGACTTGACTTGTCACTGCCGATACCAGCCCCAAGCGCAGACGAAGAA	DQ100374
<i>otacHIPnNc</i>	GGGCACACGACGAATTCAAGAATGTATGTGCTGAAAACATTATCAAGAAGGAT	BX294091
<i>ntraPn</i>	GGTTGCTCACTTGATCAGATGGAACTAGTGAAGAACAGGGACAATTTCCC	ntraPN
<i>pksAo</i>	ATTAACCTCTGTTTCGAATTTGCCGGACCCAGCTATACCAATGACACGGCCTGTTTCATCCAGTCT	AY320070
<i>pksPUrtic</i>	GGAGTCATCCGACTGTCAGCCATCTGGCGGTGTGTTTGTGAGAAGCTTGCCAAATGATTGACCTTATAAGAACG	pksp_urticae
<i>asp1Pn</i>	TGTTATTCGTGGAAGCGTACTGATGGTATTACTACAGTCGACCTCTATGCTCCTGGGGAGGCCATCACGGCCGCA	AY557343
<i>asp2Pn</i>	GTCCCTTGCGACTCTGGCAGTCGTCATGCCGGTAAGCTCCTTACCGCCAGTGATGCCACGCTGTCATT	AY557343
<i>t01_a</i>	GCGAAGGTGTGGGCAAAAACGCGAGTCCCAGGATATCACGATCACGTGCTTCTATTACATAGGACAATACTGTTT	T-01_A
<i>t02_b</i>	TGGACCCAAGTGCAGATCTAGAGTATFAAATGTTTCCCTGTCATGCGAAATACCCATCTIGAAATCATGAA	T-02_B
<i>t03_b</i>	TTACGTTACGAAACGAGTGTGAAGTGCATTTGTCAAGAAATCATTGATCATCAAAGCTGCATAAACCCCCACCG	T-03_B
<i>t04_b</i>	TGCCCCCAAAGCCCTGGGCAGAACAGGTCCCAATATCGCCGGCGCTATGACCGATTTAGTGAG	T-04_B
<i>t06_b</i>	CTCATGACGAGATTTCCGGGCAACGTTGATTTACATGTAACCTAACAACTACATTTGGAGCCAAAAGTCTGTCCGT	T-06_B
<i>t07_a</i>	ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAGACCTTGAACCACAGTCCCTCTGCCACCAAAGTACCCCAAGAACACAA	T-07_A
<i>t08_bb</i>	CATCTATATACCTACGTACATTACTCAGTCTTTTTGTGACAGCAGGCGACTTCAGAAAGCCGAAAACCGCCAGT	T-08_bb
<i>pksPV</i>	ACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCGGCCGCGGG	PKS_PV

Negativkontrolle

spotpuffer	3X SSC	
spotpuffer	50 % DMSO	
spotpuffer	Scienion	
spotpuffer	Nexterion	
spotpuffer	H ₂ O dem.	
human actin	normalisierte DNA Probe (Experimentspezifisch)	

Plate Contents

Plate Identification:
Name: Dchraloxin Cluster 96-well Mark-I
Barcode:
Description: Plate for Dchraloxin Cluster Test 96-well plate protocol. Verschiedene Spottinglungen. I

Plate Type:
Nunc - 249344
Plate capacity: 96 Wells

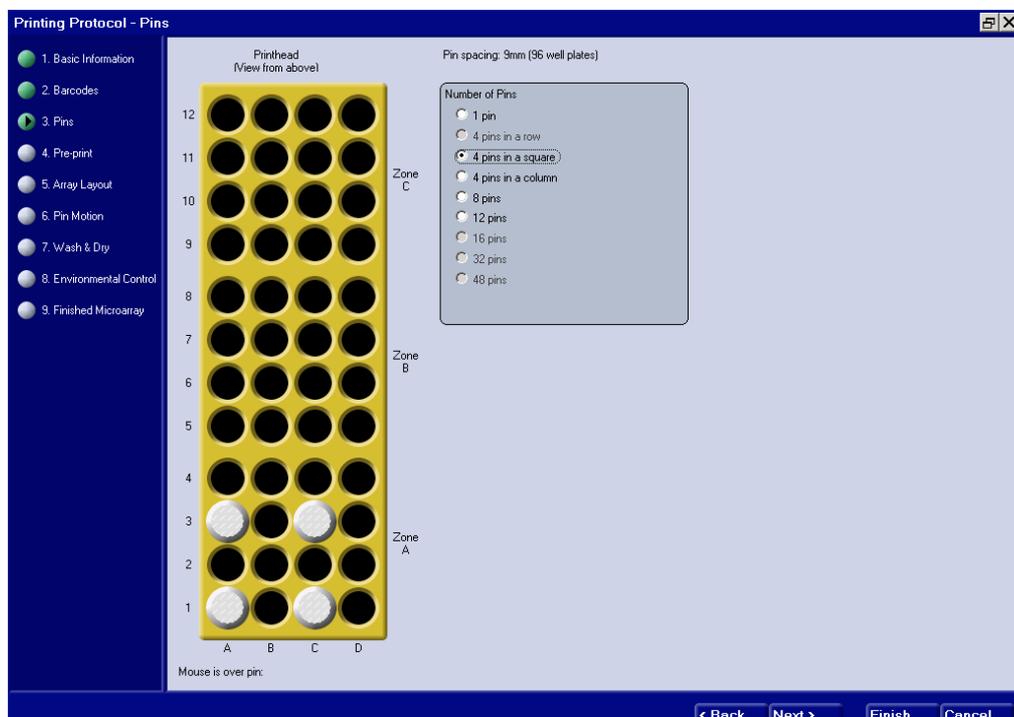
View Contents As:
 List Map

Help and Directions
All wells marked as full or control will be dipped and printed. Wells marked empty or bad may or may not be printed, depending on the status of neighboring wells and the pin configuration.

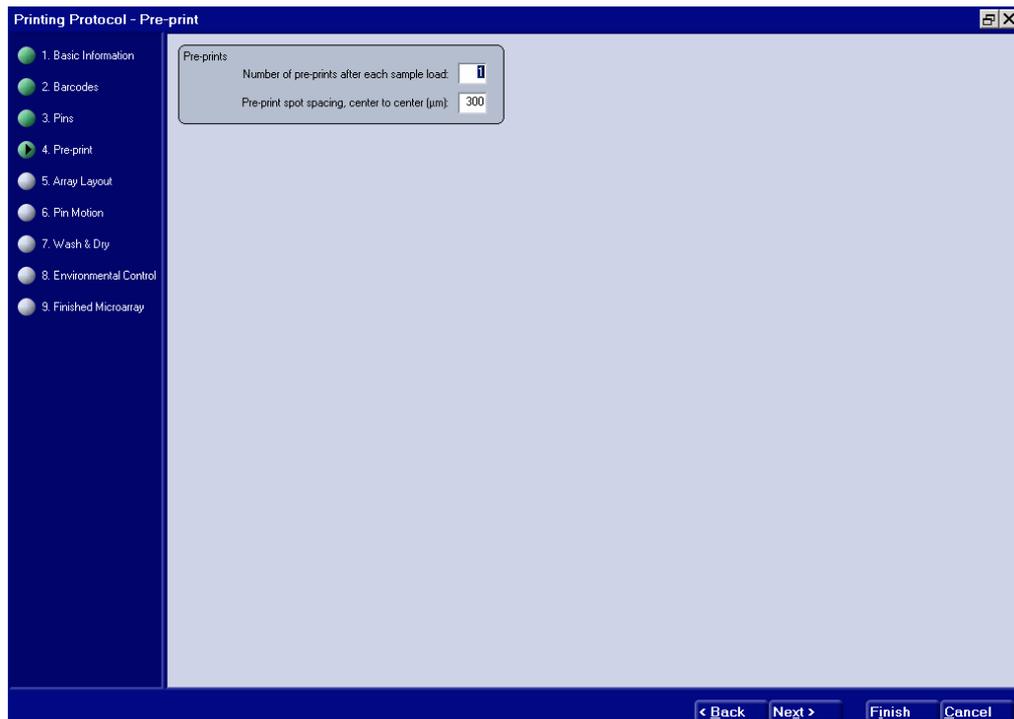
Well	Accession No.	Gene Name	Status
A01	scienionpuffer	olap1-sPV	Full
A02	scienionpuffer	olap1-sPN	Full
A03	scienionpuffer	olatrans	Full
A04	scienionpuffer	nitraltrans	Full
A05	scienionpuffer	ch1PN	Full
A06	scienionpuffer	npsPN	Full
A07	scienionpuffer	aspPN	Full
A08	scienionpuffer	T26A	Full
A09	scienionpuffer	T09bB	Full
A10	scienionpuffer		Full
A11			Empty
A12			Empty
B01	DMSO50%	olap1-sPV	Full
B02	DMSO50%	olap1-sPN	Full
B03	DMSO50%	olatrans	Full
B04	DMSO50%	nitraltrans	Full
B05	DMSO50%	ch1PN	Full
B06	DMSO50%	npsPN	Full
B07	DMSO50%	aspPN	Full
B08	DMSO50%	T26A	Full
B09	DMSO50%	T09bB	Full
B10	DMSO50%		Full
B11			Empty
B12			Empty
C01	50%DMSO	olap1-sPV	Full
C02	50%DMSO	olap1-sPN	Full
C03	50%DMSO	olatrans	Full
C04	50%DMSO	nitraltrans	Full
C05	50%DMSO	ch1PN	Full
C06	50%DMSO	npsPN	Full
C07	50%DMSO	aspPN	Full
C08	50%DMSO	T26A	Full
C09	50%DMSO	T09bB	Full
C10	50%DMSO		Full
C11			Empty
C12			Empty
D01	DMSO50%	olap1-sPV	Full
D02	DMSO50%	olap1-sPN	Full
D03	DMSO50%	olatrans	Full
D04	DMSO50%	nitraltrans	Full
D05	DMSO50%	ch1PN	Full
D06	DMSO50%	npsPN	Full
D07	DMSO50%	aspPN	Full
D08	DMSO50%	T26A	Full

Import from File OK Cancel

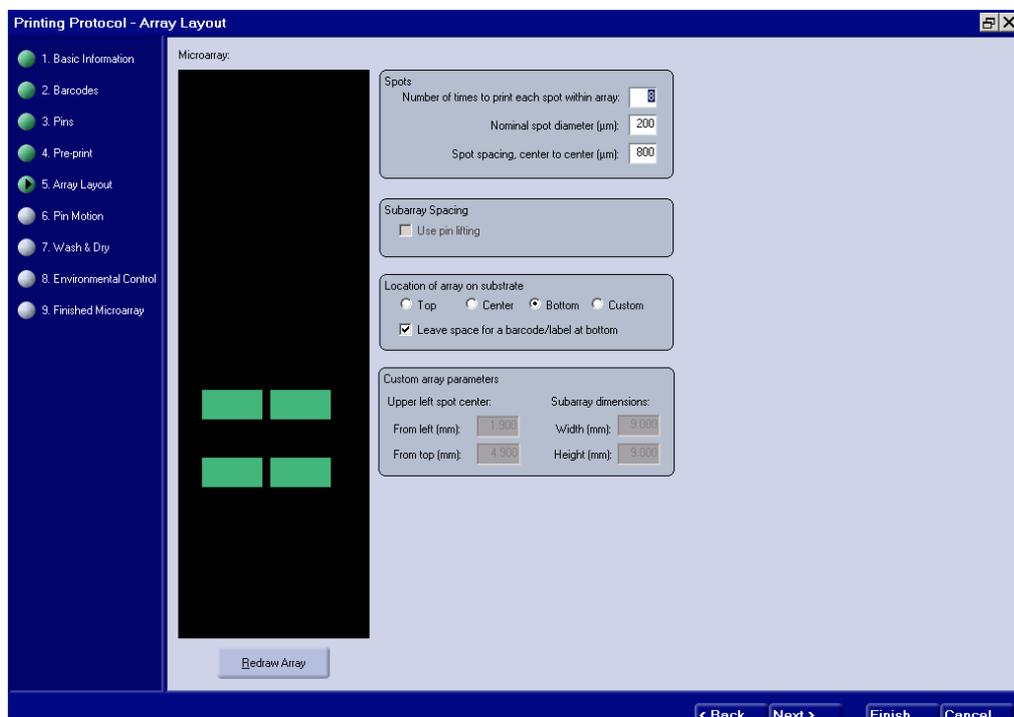
Beispiel der Anordnung von Genen auf der 96-Well Platte welche die zu spottenden DNA-Proben enthielten, hier testweise in unterschiedlichen Matrices gelöst.



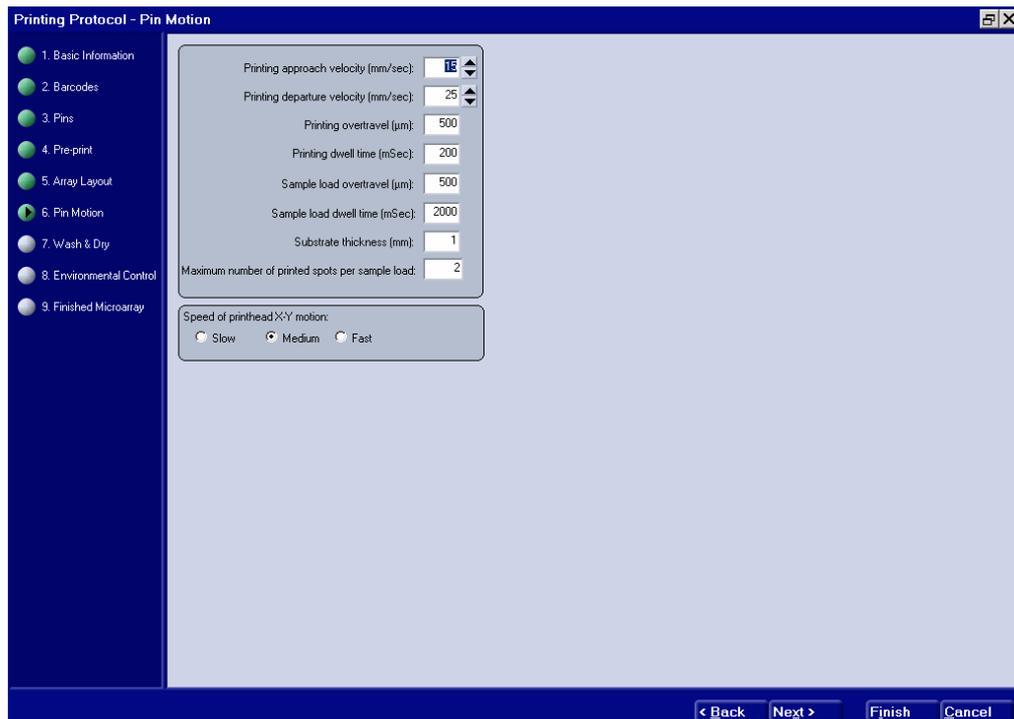
Nadelkonfiguration des Spotterkopfes. Die Anzahl der Nadeln betrug 4. Diese waren im Quadrat angeordnet.



Einstellung des Preprints, dem „Abtupfen“ der Nadeln vor dem Spottvorgang zur Verbesserung der Spottmorphologie.



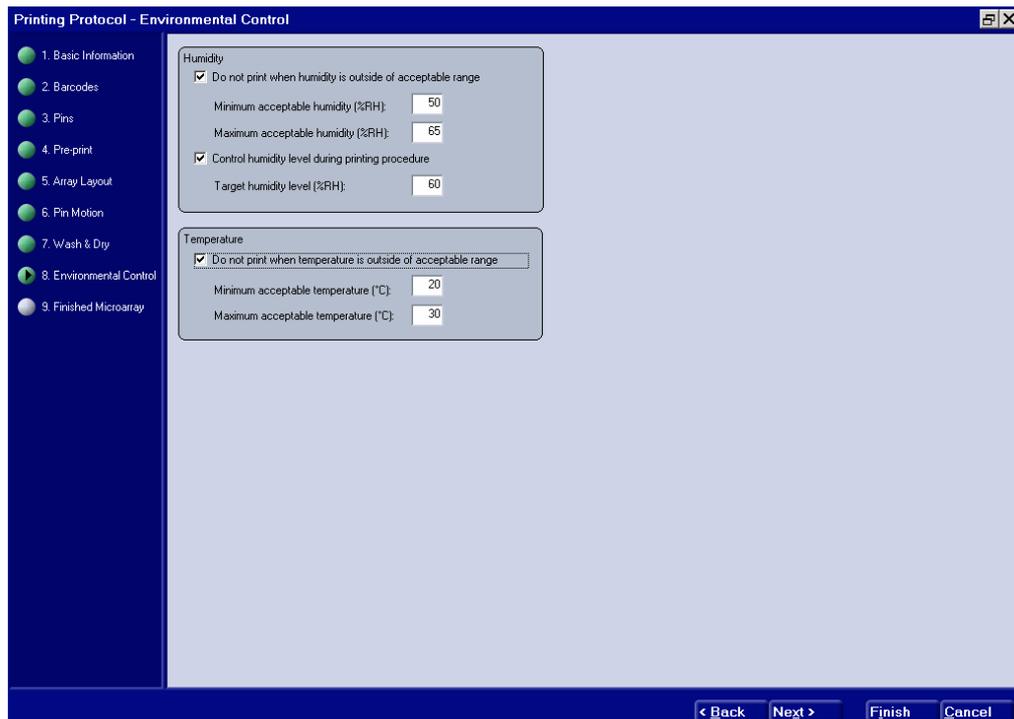
Layout-Einstellung, Spottdurchmesser und Abstand zwischen zwei Spotts.



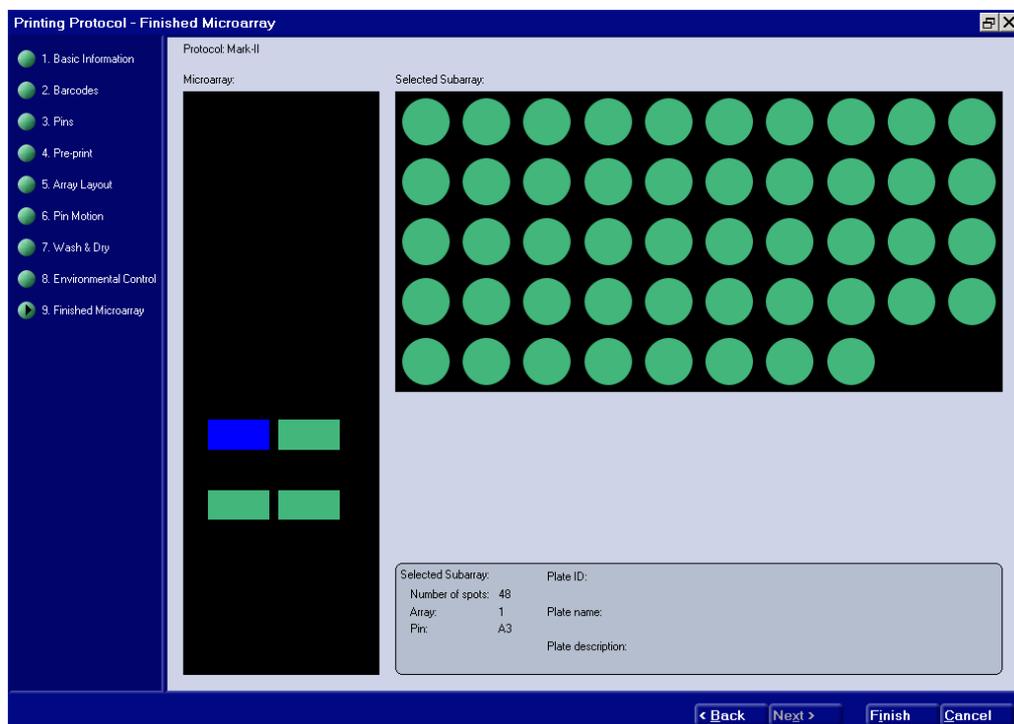
Einstellungen für optimale Beschleunigung und Abbremsen des nadelführenden Roboterarmes während des Spottvorganges, sowie von Nadelführung, Probenaufnahme und Anzahl der mit einer Ladung zu generierenden Spots.



Einstellung von Nadelwaschzyklen und -Washzeit, sowie der Trocknungsdauer nach jedem Waschgang.



Einstellung der relativen Luftfeuchte und Temperatur für ein bestmögliches Spottergebnis.



Layout-Einstellung des Spottersystems. Bei Verwendung von 4 Nadeln wird jeder Array in 4 Subarrays unterteilt. Diese können einzeln ausgewählt werden.

Literaturliste

- Adams,T.H.,Wieser,J.K.,Yu,J.H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol* **62**: 35-54.
- Aksenov,I.V.,Eller,K.I., and Tutel'ian,V.A. (2007). Ochratoxin A content in blood. *Vopr Pitan* **76**: 39-41.
- Alexander,N.J.,McCormick,S.P., and Hohn,T.M. (1999). TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Mol Gen Genet* **261**: 977-984.
- Alexander,N.J.,McCormick,S.P.,Larson,T.M., and Jurgenson,J.E. (2004). Expression of Tri15 in *Fusarium sporotrichioides*. *Curr Genet* **45**: 157-162.
- Arroyo,M.,Aldred,D., and Magan,N. (2005). Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. *Int J Food Microbiol* **98**: 223-231.
- Asao,T.,Buechi,G.,Abdel-Kader,M.M.,Chang,S.B.,Wick,E.L.,Wogan, G.N. (1965). The structures of aflatoxins B and G. *J Am Chem Soc* **87**: 882-6.
- Ballario,P.,Vittorioso,P.,Margrelli,A.,Toalora,C.,Cabibo,A.,Macino,G.(1996). White-collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora crassa* is a zinc finger protein. *EMBO J* **15**: 1650-1657.
- Bateman,D.F.,Beer,S.V. (1965). Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* **58**: 204-211.
- Belli,N.,Bau,M.,Marin,S.,Abarca,M.L.,Ramos,A.J., and Bragulat,M.R. (2006a). Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. *Int J Food Microbiol* **111 Suppl 1**: S40-S45.
- Belli,N.,Ramos,A.J.,Sanchis,V., and Marin,S. (2006b). Effect of photoperiod and day-night temperatures simulating field conditions on growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes. *Food Microbiol* **23**: 622-627.
- Bennett,J.W.,Horowitz,P.C.,Lee,L.S. (1979). Production of sclerotia by aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycologia* **71**: 415-422.
- Bennett,J.W.,Christensen,S.B. (1983) New perspectives on aflatoxin biosynthesis. *Adv Appl Microbiol.* **29**: 53-92.

- Bianchi,D.E. (1964). an endogenous circadian rhythm in *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* **35**: 437-445.
- Blackwell,K.J.,Singleton,I., and Tobin,J.M. (1995). Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 579-584.
- Blumenstein,A.,Vienken,K.,Tasler,R.,Purschwitz,J.,Veith,D.,Frankenberg-Dinkel,N.,Fischer,R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* **15**: 1833-1838.
- Bok,J.W.,Noordermeer,D.,Kale,S.P.,Keller,N.P. (2006) Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **61**(6): 1636-45.
- Bol,J.,Smith,J.E. (1990). Biotransformation of aflatoxin. *Food Biotechnol* **3**: 127-144.
- Bove,F.J. (1970) the story of ergot. New York, Karger. P. 297.
- Bottalico,A.,Visconti,A.,Lerario,P. (1982). Effect of temperature on zearalenon production by isolates of *Fusarium* from cereals, in Italy. *Phytophatol Mediterranean* **21**: 78-82.
- Brandao,R.L.,Castro,I.M.,Passos,J.B.,Nicoli,J.R.,Thevelein,J.M. (1992). Glucose-induced activation of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Fusarium oxysporum*. *J Gen Microbiol* **138**: 1579-1586.
- Brown,P.O.,Botstein,D., (1999). *Nature Genet* **21**: 33.
- Bu'lock,J.D.,Detroy,R.W.,Hostalek Z.,Munim-Al-Shakarchi,A. (1974). Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Tra Br Mycol Soc* **62**: 377-389.
- Carlile,M.J. (1956). A study of the factors influencing non-genetic variation in a strain of *Fusarium oxysporum*. *J gen Microbiol* **14**: 643-654.
- Cast,R. (2003) Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Ames, Iowa:council for Agricultural Science and Technology. P.199.
- Campbell,N.A. (2000). Spektrum Lehrbuch Biologie **2**. *Nachdruck*: 628.
- Cairns-Fuller,V.,Aldred,D., and Magan,N. (2005). Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *J Appl Microbiol* **99**: 1215-1221.
- Calvo,A.M.,Wilson,J.W.,Bok,W.J.,Keller,N. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol* **66**: 447-459.
- Carlile,M.J. (1965). The photobiology of fungi. *Annu Rev Plant Physiol* **16**: 175-202.

- Castella,G.,Larsen,T.O.,Cabanes,J.,Schmidt,H.,Alboresi,A.,Niessen,L.,Färber,P.,Geisen,R. (2002). Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Syst Appl Microbiol* **25**: 74-83.
- Chang,P.K.,Bennett,J.W.,Cotty,P.J. (2002). Association of aflatoxin biosynthesis and sclerotial development in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* **153**: 41-48.
- Cheng,P.,Yang,Y.,Wang,L.,He,Q.,Liu,Y. (2003). White Collar-1, a Multifunctional *Neurospora* Preprotein involved in the circadian Feedback Loops, Light Sensing, and Transcription Repression of *wc-2*. *J Biol Chem* **278**: 3801-3808.
- Corrier,D.E. (1991). Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Vet Immunol Immunopathol* **30**: 73-87.
- Cunningham,J.E.,Kuiack,C. (1992). Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium*. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1451-1458.
- Czapek,F. (1925). Biochemie der Pflanzen, 3. Aufl., Bd. 3. Jena.
- Crosthwaite,S.K.,Dunlap,J.C., and Loros,J.J. (1997). *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* **276**: 763-769.
- Davari,M.,Didar-Taleshmakaeil,R.,Hajieghrari,B. (2006). Wheat *Fusarium* head blight and identification of dominant species. *Commun Agric Appl Biol Sci* **71**: 1139-45.
- De Bernardis,F.,Muhlschlegel,F.A.,Cassone,A.,Fonzi,W.A. (1998). The pH of the host niche controls gene expression. *Infect. Immun.* **66**(7): 3317-25
- Deng,J.,Carbone,I., and Dean,R.A. (2007). The evolutionary history of Cytochrome P450 genes in four filamentous Ascomycetes. *BMC Evol Biol* **7**: 30.
- Desjardins,A.E.,Hohn,T.M.,McCormick,S.P. (1993). Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. *Microbiol Rev* **57**: 595-604.
- Doohan,F.M.,Weston,G.,Rezanoor,H.N.,Parry,D.W.,Nicholson,P.(1999). Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of *Tri5* by *Fusarium* species in vitro and in planta. *Appl Environ Microbiol.* **65**(9):3850-4
- Dunlap,J.C., and Loros,J.J. (2006). How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi. *Curr Opin Microbiol* **9**: 579-587.
- Dufva,M. (2005). Fabrication of high quality microarrays. *Biomol Eng* **22**: 173-84.
- Ehrlich,K.C., and Cotty,P.J. (2002). Variability in nitrogen regulation of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 174-178.

- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cary, J.W., and Cotty, P.J. (2002) Promoter elements in the aflatoxin pathway polyketide synthase gene. *Biochim Biophys Acta* **1576**: 171-175.
- Ellner, F.M. (2005). Results of long-term field studies into the effect of strobilurin containing fungicides on the production of mycotoxins in several winter wheat varieties. *Myc Res* **21**: 112-115.
- FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2005). Prevention of Post Harvest Food.
- Flaherty, J.E., Pirttilä, A.M., Bluhm, B.H., Woloshuk, C.P. (2003). PAC1, a pH-Regulatory Gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5222-5227.
- Freeman, G.G., Morrison, R.I., (1948) *Nature* **162**: 20.
- Fröhlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., Dunlap, J.C. (2002). White collar-1 a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* **297**: 815-819.
- Gadd, G.M., White, C. (1993). Microbial treatment of metal pollution--a working biotechnology? *Trends Biotechnol* **11**: 353-359.
- Geisen, R. (2004). Molecular monitoring of environmental conditions influencing the induction of ochratoxin A biosynthesis genes in *Penicillium nordicum*. *Mol Nutr Food Res* **48**: 532-540.
- Geisen, R., Färber, P. (2004) Analysis of Differentially-Expressed Ochratoxin A Biosynthesis Genes of *Penicillium Nordicum*, *European Journal of Plant Pathology*. **110**(5-6): 661-669.
- Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Karolewicz, A. (2006). A gene cluster for the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin Research* **22**: 134-141.
- Geiser, F. (2004). Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol* **66**: 239-274.
- Gelderblom, W.C., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R., Kriek, N.P. (1988). Fumonisin novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1806-11.
- Godoy, G., Steadman, J.R., Dickman, M.B., Dam, R. (1990). Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Mol Plant Pathol* **37**: 179-191.
- Gong, Y.Y., Cardwell, K., Hounsa, A., Turner, P.C., Hall, A.J., Wild, C.J. (2002). aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *Br Med J* **325**: 20-1. *Br Med J* **325**: 1089.

- Gonzalez,H.H.L.,Resnik, S.L.,Vaamonde,G. (1987). Influence of temperature on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentine corn. *Intern J Food Microbiol* **6**: 179-183.
- Greene,A.V,Keller,N.,Haas,H.,Bell-Pedersen,D. (2003). A Circadian Oscillator in *Aspergillus* spp. Regulates Daily Development and Gene Expression. *Eukaryotic Cell* **2**: 231-237.
- Guldener,U.,Seong,K.Y.,Boddu,J.,Cho,S.,Trail,F.,Xu,J.R. (2006). Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genet Biol* **43**: 316-325.
- Hallsworth,J.E., and Magan,N. (1999). Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *beauveria bassiana*, *metarhizium anisopliae*, and *paecilomyces farinosus*. *J Invertebr Pathol* **74**: 261-266.
- Heller,H.,Ruby,N.F. (2004). Sleep and circadian rhythms in mammalian torpor. *Annu Rev Physiol* **66**: 275-289.
- Hägglblom,P. (1982). Production of Ochratoxin A in Barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: Effect of fungal growth, time, temperature and inoculum size. *Appl Environ Microbiol* **43**: 1205-1207.
- Hohn,T.M., and Desjardins,A.E. (1992). Isolation and gene disruption of the Tox5 gene encoding trichodiene synthase in *Gibberella pulicaris*. *Mol Plant Microbe Interact* **5**: 249-256.
- Hope,R., and Magan,N. (2003). Two-dimensional environmental profiles of growth, deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* on a wheat-based substrate. *Lett Appl Microbiol* **37**: 70-74.
- Hope,R.,Aldred,D., and Magan,N. (2005). Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Lett Appl Microbiol* **40**: 295-300.
- Idnurm,A.,Heitman J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol* **3**: 615-626.
- Isshiki,A.,Akimitsu,K.,Yamamoto,M,Yamamoto,H. (2001). Endopolygalacturonidase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria alternata*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 749-757.
- Jennings,D.H. (1989). Some perspectives on nitrogen and phosphorus metabolism in fungi, pp. 1-31. Cambridge UK: Cambridge University Press.
- Jin,Q.C.,Dong,H.T.,Peng,Y.L.,Chen,B.S.,Shao,J.,Deng,Y. (2007). Application of cDNA array for studying the gene expression profile of mature appressoria of *Magnaporthe grisea*. *J Zhejiang Univ Sci B* **8**: 88-97.

- Johnson,C.H. (2001). Endogenous time keepers in photosynthetic organisms. *Annu Rev Physiol* **63**: 695-728.
- Karolewicz,A., and Geisen,R. (2005) Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. *Syst Appl Microbiol* **28**: 588-595.
- Kimura,M.,Kaneko,I.,Komiyama,M.,Takatsuki,A.,Koshino,H.,Yoneyama,K., and Yamaguchi,I. (1998). Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101. *J Biol Chem* **273**: 1654-1661.
- Kimura,M.,Tokai,T.,O'Donnell,K.,Ward,T.J.,Fujimura,M.,Hamamoto,H.,Shibata,T.,Yamaguchi,I. (2003). The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathways genes and expressed non-essential genes. *FEBS Letters* **539**: 105-110.
- Kokkonen,M.,Jestoi,M.,Rizzo,A. (2005). The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *Int J Food Microbiol* **99**: 207-14.
- Knol,W.,Bol,J.,Huis in't Veld,J.H.J. (1990). Detoxification of aflatoxin B1 in feeds. *Processing and Quality of Foods 2*: Food Technology, pp. 132-136.
- Kolb,E. (1984). Recent knowledge on the mechanism of action and metabolism of mycotoxins. *Z Gesamte Inn Med* **39**: 353-358.
- Kolliputi,V.,Narasaiah,R.B.,Sashidhar,C.,Subramanyam,W. (2006). Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia* **162**: 179-189.
- Kottke AG <http://www.geo.de/GEO/natur/oekologie/5099.html>.
- Larsen,S. (1928). On chronic degeneration of the kidneys caused by mouldy rye. *Maanedsskr. Dyr.* **40**: 259-284 & 289-300.
- Larsen,T.O.,Svendsen,A.,Smedsgaard,J. (2001). Biochemical chrakterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3630-5.
- Lee,T.,Han,Y.K.,Kim,K.H.,Yun,S.H.,Lee,Y.W. (2002). Tri13 and Tri7 determine deoxynivalenol- and nivalenol- producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2148-54.
- Liao,X.,Vining,L.C.,Doull,J.L. (1995). Physiological control of trophophase-idiophase separation in streptomycete cultures producing secondary metabolites. *Can J Microbiol* **41**: 309-15.

- Linnemannstons,P.,Prado,M.M.,Fernandez-Martin,R.,Tudzynski,B., and Avalos,J. (2002). A carotenoid biosynthesis gene cluster in *Fusarium fujikuroi*: the genes carB and carRA. *Mol Genet Genomics* **267**: 593-602.
- Llorens,A.,Mateo,R.,Hinojo,M.J.,Valle-Algarra,F.M., and Jimenez,M. (2004). Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *Int J Food Microbiol* **94**: 43-54.
- Llorens,A.,Hinojo,M.J.,Mateo,R.,Medina,A.,Valle-Algarra,F.M.,Gonzalez-Jaen, M.T.,Jimenez,M. (2006). Variability and characterization of mycotoxin-producing *Fusarium* spp. isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek* **89**: 465-78.
- Loros,J.J.,Denome,S.A., and Dunlap,J.C. (1989). Molecular cloning of genes under control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science* **243**: 385-388.
- Magan,N.,Cayley,G.R., and Lacey,J. (1984). Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Appl Environ Microbiol* **47**: 1113-1117.
- Magan,N.,Hope,R., and Aldred,D. (2006). Ecophysiology of *Fusarium culmorum* and mycotoxin production. *Adv Exp Med Biol* **571**: 123-136.
- Marin,S.,Magan,N.,Belli,N.,Ramos,A.J.,Canela,R., and Sanchis,V. (1999). Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *Int J Food Microbiol* **51**: 159-167.
- Marin,S.,Sanchis,V.,Teixido,A.,Saenz,R.,Ramos,A.J.,Vinas,I., and Magan,N. (1996). Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Can J Microbiol* **42**: 1045-1050.
- Mayer,Z.,Färber,P.,Geisen,R. (2003). Monitoring the production of aflatoxin B₁ in wheat by measuring the concentration of *nor-1* mRNA. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1154-1158.
- McCormick,S.P.,Alexander,N.J.,Trapp,S.E., and Hohn,T.M. (1999). Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from *Fusarium sporotrichioides*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5252-5256.
- McDonnel (1977). Interactions between poly(L-lysine) and chondroitin 6 sulfate. Quasi-elastic light scattering studies. *Macromolecules*. **10**: 701-6.
- Mihlan,M.,Homann,V.,Liu,T.W., and Tudzynski,B. (2003). AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol Microbiol* **47**: 975-991.
- Mirocha,C.J.,Pawlosky,R.A.,Chatterjee,K.,Watson,S.,Hayes,W. (1983) Analysis for *Fusarium* toxins in various samples implicated in biological warfare in Southeast Asia. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66**(6):1485.

- Miescher,F.: (1897) Die histochemischen und physiologischen Arbeiten. 2 Bde. Leipzig: F. C. W. Vogel.
- Mooney,J.L.,Yager,L.N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**: 1473-1482.
- Morooka,N.,Uratsuji,N.,Yoshizawa,T.,Ymamoto,H. (1972) Charaterization of Deoxynivalenol. *J Food Hyg Soc Jpn* **13**: 368.
- Mullis,K.,Faloona,F.,Scharf,S.,Saiki,R.,Horn,G., and Erlich,H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**: 17-27.
- Nesbitt,B.F.,O'Kelly,J.,Sargeant,K., and Sheridan,A. (1962). *Aspergillus flavus* and turkey X disease. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* **195**: 1062-1063.
- O'Callaghan,J.,Stapleton,P.C., and Dobson,A.D. (2006) Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genet Biol* **43**: 213-221.
- Panasenko,VT. (1967). The ecological of microfungi. *Bot.Rev.* **33**: 189-215.
- Pardo,E.,Marin,S.,Ramos,A.J., and Sanchis,V. (2006a). Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention - a review. *Food Addit Contam* **23**: 398-410.
- Pardo,E.,Sanchis,V.,Ramos,A.J., and Marin,S. (2006b). Non-specificity of nutritional substrate for ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus*. *Food Microbiol* **23**: 351-358.
- Penalva,M.A., and Arst,H.N., Jr. (2002). Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 426-46.
- Penny,R.H.,O'Sullivan,B.M.,Mantle,P.G., and Shaw,B.I. (1979). Clinical studies on tremorgenic mycotoxicoses in sheep. *Vet Rec* **105**: 392-393.
- Price,M.S.,Yu,J.,Nierman,W.C.,Kim,H.S.,Pritchard,B.,Jacobus,C.A. (2006). The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiol Lett* **255**: 275-279.
- Proctor,R.H.,Brown,D.W.,Plattner,R.D.,Desjardins,A.E. (2003). Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 237-249.
- Quarta,A.,Mita,G.,Haidukowski,M.Santino,A.,Mule,G.,Visconti,A.(2005). Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* occuring in Europe. *Food Addit Contamin* **22**: 309-15.

- Quarta,A.,Mita,G.,Haidukowski,M.,Logrieco,A.,Mule,G., and Visconti,A. (2006). Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. *FEMS Microbiol Lett* **259**: 7-13.
- Ramirez,M.L.,Chulze,S.,Magan,N. (2006) Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *Int J Food Microbiol* **106**(3): 291-6.
- Ramos,A.J.,Labernia,N.,Marin,S.,Sanchis,V., and Magan,N. (1998). Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *Int J Food Microbiol* **44**: 133-140.
- Reiß,J. (1970). The effect of aflatoxin B1 on the cytochemically detectable activity of various enzymes of *Mucor hiemalis* (Mucorales) *Mycopathol Mycol Appl.* **42**: 225-31.
- Rudolph,ED. (1962). The effect of some physiological and environmental factors on fungi *Am J Bot* **49**: 71-78.
- Sambrook,J.,Russel,D.W. (2001). Molecular Cloning. **3 edn.** Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sambrook,J. (1989). Protein structure. Chaperones, paperones and the use of analytical agarose-electrophoresis. *Nature.* **342**: 224-5.
- Sambrook,J. and Russel,D.W., 2001. Molecular Cloning. 3 edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger,F.,Nicklen,S.,Coulsen,A.R. (1977). DNA sequencing with chain - terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**: 5463-5467.
- Satroutdinov,A.D.,Kuriyama,H,Kobayashi,H. (1992). Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *FEMS Microbiol lett* **77**: 261-267.
- Schena,M., Shalon,D.,Davis,R.W.,Brown,P.O. (1995). *Science* **270**: 467.
- Scherm,B.,Palomba,M.,Serra,D.,Marcello,A., and Migheli,Q. (2005). Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse transcription-polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Int J Food Microbiol* **98**: 201-210.
- Schmidt-Heydt,M.,Geisen,R. (2007a). A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. *int. J. food Microbiol.* **117** :131-40.

- Schmidt-Heydt,M.,Geisen,R. (2007b). Gene expression as an early indication for mycotoxin biosynthesis. *Mycotox Res* **23** :13-21.
- Schmidt-Heydt,M.,Baxter,E.,Geisen,R.,Magan,N.(2007c).Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPv* gene expression by *Penicillium verrucosum*. *Int J Food Microbiol. in press*.
- Schmidt-Heydt,M.,Richter,W.,Michulec,M.,Buttinger,G.,Geisen,R. (2007d). A comprehensive molecular system to study presence, growth and ochratoxin A biosynthesis of *P. verrucosum* in wheat. *submitted*.
- Schmidt-Heydt,M.,Richter,W.,Michulec,M.,Buttinger,G.,Geisen,R.(2007e). Molecular and chemical monitoring of growth and ochratoxin A biosynthesis of *P. verrucosum* in wheat stored at different moisture conditions. *Submitted*.
- Schwerdtfeger,C.,Linden,H. (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J* **22**: 4846-4855.
- Sharma,R.P. (1993). Immunotoxicity of mycotoxins. *J Dairy Sci* **76**: 892-897.
- Sharp,P.A. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*. **12**: 3055-63.
- Schena,M.,Shalon,D.,Davis,R.W., Brown, P.O. (1995). *Science* **270**: 467.
- Siegel,J.M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* **437**: 1264-1271.
- Sikora,L.A.,Marzluf, G.A. (1982). regulation of 1-phenylalanine ammonia-lyase by 1-phenylalanine and nitrogen in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **150**: 1287-1291.
- Skrinjar,M., and Dimic,G. (1992). Ochratoxigenicity of *Aspergillus ochraceus* group and *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* strains on various media. *Acta Microbiol Hung* **39**: 257-261.
- Southern,E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *1975. Biotechnology* **24**: 122-139.
- Sweeney,M.J.,Dobson,A.D.W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol* **43**: 141-158.
- Talora,C.,Franchi,L.,Linden,H.,Ballario,P.,Macino,G. (1999). Role of a white-collar-1, white-collar-2 complex in blue signal transduction. *EMBO J* **18**: 4961-4968.
- Tan, K.K. (1978). Light-induced fungal development. *Fil Fungi*, **Vol. 3**: 334-357.

- Tokai,T.,Koshino,H.,Takahasi-Ando,N.,Sato,M.,Fujimura,M.,Kimura,M. (2007). *Fusarium tri4* encodes a key multifunctional cytochrome P450 monooxygenase for four consecutive oxygenation steps in trichothecene biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **353**: 412-7.
- Torelli,E.,Firrao,G.,Locci,R.,Gobbi,E. (2006). Ochratoxin A-producing strains of *Penicillium* spp. isolated from grapes. **106**:307-12.
- Tswett,M. (1901) Paper chromatography. *Trav Soc Nat Kazan* **35**:268.
- Tu,B.P.,Kudlicki,A.,Rowicka,M., and McKnight,S.L. (2005). Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science* **310**: 1152-1158.
- Tu,B.P., and McKnight,S.L. (2006). Metabolic cycles as an underlying basis of biological oscillations. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 696-701.
- Tudzynski,B.,Liu,S., and Kelly,J.M. (2000). Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea* creA genes. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 9-15.
- Ueno,Y.,Ishikawa,Y.,Saito-Amakai,K.,Tsunoda,H. (1970). Environmental factors influencing the production of fusarenon-X, a cytotoxic mycotoxin of *Fusarium nivale* Fn 2B. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) **18**: 304-12.
- Van't Hoff, J.H. (1884). *Etudes de dynamique chimique*.
- Vasavada,A.B., and Hsieh,D.P.H. (1987). Production of 3-Acetyldeoxynivalenol by *Fusarium-Graminearum* R-2118 in Submerged Cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **26**: 517-521.
- Wolff, J.,Neudecker,C.,Klug,C.,Weber,R. (1988). Chemical and toxicologic studies of native corn in flour and bread, *Z Ernährungswiss* **27**:1-22.
- Yan,G., and Viraraghavan,T. (2001). Heavy metal removal in a biosorption column by immobilized *M. rouxii* biomass. *Bioresour Technol* **78**: 243-249.
- Yu,J.,Bhatnagar,D.,Cleveland,T.E. (2004). Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Letters* **564**: 126-130.
- Yu,J.H., and Keller,N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 437-458.
- Zeljezic,G. (2006). DNA damage by ochratoxin A in rat kidney assessed by the alkaline comet assay. *Braz J Med Biol Res.* **39**: 1563-8.

Abbildungen

Titel	Seite
Abb. 1: <i>Aspergillus</i> sp.....	4
Abb. 2: <i>Penicillium</i> sp.....	5
Abb. 3: <i>Fusarium</i> sp.....	5
Abb.4: Wachstumstoleranz verschiedener MO bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten.....	9
Abb.5: Wachstumstoleranz verschiedener MO bei unterschiedlichen Temperaturen.....	9
Abb. 6: Die Gencluster der wichtigsten Mykotoxine	9
Abb. 7: Genereller Aufbau eines Mykotoxin-Genclusters.....	10
Abb. 8: 10kb Abschnitt des Ochratoxin Genclusters.....	16
Abb. 9: Molekülstruktur des Ochratoxin A.....	16
Abb. 10: Sequenzfragmente der DDRT-PCR.....	17
Abb. 11: Gencluster der Ochratoxinbiosynthese in <i>P. nordicum</i>	18
Abb. 12: Verwendete Plexiglasfilter	37
Abb. 13: Verwendete LEDs.....	37
Abb. 14: Verwendete Tageslichtlampe	38
Abb. 15: Phytotron mit jungen Weizenpflanzen in sogenannten Mitscherlichtöpfen.....	39
Abb. 16: Layout des Mycochip in der 4. Generation.....	48
Abb. 17: Beschichtung der Glaträger.....	49
Abb. 18: Mikroarrayhybridisierung von 3 Replikaten des <i>aspPN</i> Gens aus dem OTA-cluster.....	49
Abb. 19: Verwendete Spotternadeln	50
Abb. 20: Schema der Vorgehensweise bei der Herstellung und Anwendung des DNA-Chips	51
Abb. 21: Schema der verwendeten Feuchtekkammer	51
Abb. 22: Beispiel eines Scatterplots aus einem Microarrayexperiment	53
Abb. 23: Signalverteilungsdiagramm.....	53
Abb. 24: Beispiel eines CIM-Plots.....	54
Abb. 25: Spezifitätstest des Mycochips durch Hybridisierung mit verschiedenen Spezies	55
Abb. 26: Substratspezifische Microarray Expressionsanalyse in <i>Fusarium</i>	57
Abb. 27: Substratspezifische DC-Analyse in <i>Fusarium</i>	57
Abb. 28: Mikroarray Genexpressionsanalyse in <i>Fusarium culmorum</i>	58
Abb. 29: DC Analyse in <i>Fusarium</i>	59
Abb. 30: Substratspezifische Mikroarray Expressionsanalyse in <i>Penicillium</i>	60
Abb. 31: Kinetik mit <i>F. culmorum</i> über 29 Tage Real Time PCR und ELISA.....	61
Abb. 32: Expressionsprofil der Mykotoxingene in <i>F. culmorum</i> bei unterschiedlichen pH	62
Abb. 33: Wachstum und Toxinbiosynthese von <i>F. culmorum</i> bei verschiedenen pH	63
Abb. 34: Expressionsprofil der Mykotoxingene in <i>F. graminearum</i> bei unterschiedlichen pH	64
Abb. 35: Wachstum und Toxinbiosynthese in <i>F. graminearum</i> bei verschiedenen pH	65
Abb. 36: Expressionsprofil der Mykotoxingene in <i>F. culmorum</i> bei unterschiedlicher Wasseraktivität	66
Abb. 37: Wachstum und Toxinbiosynthese in <i>F. culmorum</i> bei unterschiedlicher Wasseraktivität	67

Abb. 38:	Expressionsprofil der Mykotoxigene in <i>F. graminearum</i> bei unterschiedlicher Wasseraktivität	67
Abb. 39:	Wachstum und Toxinbiosynthese in <i>F. graminearum</i> bei unterschiedlicher Wasseraktivität	68
Abb. 40:	Expressionsprofil der Mykotoxigene in <i>F. culmorum</i> bei unterschiedlichen Temperaturen	69
Abb. 41:	Wachstum und Toxinbiosynthese in <i>F. culmorum</i> bei verschiedenen Temperaturen	70
Abb. 42:	Toxinbiosynthese in <i>F. culmorum</i> bei 25 °C und 30 °C.....	71
Abb. 43:	Expressionsprofil der Mykotoxigene in <i>F. graminearum</i> bei unterschiedlichen Temperaturen	71
Abb. 44:	Wachstum und Toxinbiosynthese in <i>F. graminearum</i> bei verschiedenen Temperaturen	72
Abb. 45:	Zweifaktorielle Genexpressionsanalyse in <i>F. culmorum</i>	74
Abb. 46:	3dimensionales Modell der Zweifaktoriellen Genexpressionsanalyse von <i>F.culmorum</i>	75
Abb. 47:	Zweifaktorielle Toxinbiosyntheseanalyse von <i>F. culmorum</i> bei Kombinationen von a_w -Wert und Temperatur	75
Abb. 48:	Zweifaktorielle Genexpressionsanalyse von <i>F. graminearum</i>	76
Abb. 49:	3dimensionales Modell der Zweifaktoriellen Genexpressionsanalyse von <i>F. graminearum</i>	76
Abb. 50:	Zweifaktorielle Toxinbiosyntheseanalyse von <i>F. graminearum</i> bei Kombinationen von a_w -Wert und Temperatur	77
Abb. 51:	Präventionsmodell <i>F. culmorum</i>	77
Abb. 52:	Präventionsmodell <i>F. graminearum</i>	77
Abb. 53:	Mikroarray Genexpressionsanalyse in <i>F. culmorum</i> unter einer Kombination an reprimierenden bzw. fördernden Bedingungen bezüglich der Mykotoxinbiosynthese.....	78
Abb. 54:	Wachstum und Toxinanalyse in <i>F. culmorum</i> unter Kombinationen von reprimierenden, bzw. fördernden Bedingungen	79
Abb. 55:	Mikroarray Expressionskinetik <i>Penicillium</i>	80
Abb. 56:	Toxin- und Genexpressionsanalyse des Polyketidsynthasegens <i>otapksPV</i> in Korrelation zur OTA-Biosynthese in <i>Penicillium nordicum</i>	81
Abb. 57:	pH abhängiges Expressionsprofil in <i>P. nordicum</i>	82
Abb. 58:	pH abhängiges Wachstum und Ochratoxin A Biosynthese in <i>P. nordicum</i>	83
Abb. 59:	pH abhängiges Expressionsprofil in <i>P. verrucosum</i>	84
Abb. 60:	pH abhängiges Wachstum und Ochratoxin A Biosynthese in <i>P. verrucosum</i>	85
Abb. 61:	Von der Wasseraktivität abhängiges Expressionsprofil in <i>P. nordicum</i>	86
Abb. 62:	Von der Wasseraktivität abhängige Ochratoxin A Biosynthese in <i>P. nordicum</i>	87
Abb. 63:	Von der Wasseraktivität abhängiges Expressionsprofil in <i>P. verrucosum</i>	87
Abb. 64:	Von der Wasseraktivität abhängiges Wachstum und Ochratoxin A Biosynthese in <i>P. verrucosum</i>	88
Abb. 65:	Temperaturabhängiges Expressionsprofil in <i>P. nordicum</i>	89
Abb. 66:	Temperaturabhängiges Wachstum und Ochratoxin A Biosynthese in <i>P. nordicum</i>	89
Abb. 67:	Temperaturabhängiges Expressionsprofil in <i>P. verrucosum</i>	90
Abb. 68:	Temperaturabhängiges Wachstum und Ochratoxin A Biosynthese in <i>P. verrucosum</i>	90

Abb. 69:	Zweifaktorielle Genexpressionsanalyse von <i>P. nordicum</i>	92
Abb. 70:	3dimensionales Modell der Zweifaktoriellen Genexpressionsanalyse von <i>P. nordicum</i>	93
Abb. 71:	Zweifaktorielle Toxinbiosyntheseanalyse von <i>P. nordicum</i> bei Kombinationen an a_w - Wert und Temperatur.....	93
Abb. 72:	Zweifaktorielle Genexpressionsanalyse von <i>P. verrucosum</i>	94
Abb. 73:	3dimensionales Modell der Zweifaktoriellen Genexpressionsanalyse von <i>P.</i> <i>verrucosum</i>	94
Abb. 74:	Zweifaktorielle Toxinbiosyntheseanalyse von <i>P. verrucosum</i> bei Kombinationen an a_w -Wert und Temperatur	95
Abb. 75:	Präventionsmodell <i>P. nordicum</i>	95
Abb. 76:	Präventionsmodell <i>P. verrucosum</i>	95
Abb. 77:	Microarray Genexpressionsanalyse in <i>P. nordicum</i> bei einer Kombination an reprimierenden und fördernden Bedingungen.....	96
Abb. 78:	Wachstum und Toxinbiosynthese von <i>P. nordicum</i> unter reprimierenden bzw. fördernden Bedingungen	97
Abb. 79:	48 Stunden Genexpressionsanalyse des <i>otapksPV</i> -Gens in <i>P. verrucosum</i> (Hell/Dunkel).....	99
Abb. 80:	48 Stunden Genexpressionsanalyse des <i>otapksPV</i> -Gens in <i>P. verrucosum</i> (Dunkel)	99
Abb. 81:	24 Stunden HPLC Analyse der Ochratoxin A Biosynthese in <i>P. verrucosum</i>	100
Abb. 82:	PCR bei 55 °C mit <i>wc1</i> -Primern.....	101
Abb. 83:	Southern-Blot-Hybridisierung der <i>wc1</i> -PCR-Amplifikation bei 55 °C.	101
Abb. 84:	PCR-Reaktion bei 55 °C mit <i>wc2</i> und <i>frq</i> -Primern	102
Abb. 85:	OTA-Biosynthese Wildtyp vs. $\Delta wc-1$ in Licht bzw. im Dunkeln	102
Abb. 86:	OTA-Bildung in <i>P. verrucosum</i> bei verschiedenen Wellenlängen	103
Abb. 87:	Mikroarray Genexpressionsanalyse von <i>P. verrucosum</i> in Blaulicht.....	104
Abb. 88:	Mikroarray Genexpressionsanalyse von <i>P. verrucosum</i> im Dunkeln.....	104
Abb. 89:	<i>P. verrucosum</i> , Inkubation unter verschiedenen Wellenlängen	105
Abb. 90:	Blaulichtbestrahlung einer Ochratoxin A Lösung	105
Abb. 91:	Weizenproben des Ihinger Versuchshofs.....	106
Abb. 92:	Mikroarray Expressionsanalyse von Weizenproben.....	107
Abb. 93:	Real Time PCR Expressionsanalyse von Weizenproben.....	107
Abb. 94:	Dünnschichtchromatographie von Weizenproben.....	108
Abb. 95:	PCR mit spezifischen Primern für das <i>otapksPV</i> -Gen.....	109
Abb. 96:	Teilsequenz der Polyketidsynthese in <i>P. verrucosum</i>	109
Abb. 97:	PCR der analysierten Weizenproben mit spezifischen Primern für das <i>otapksPV</i> -Gen in <i>P.</i> <i>verrucosum</i>	111
Abb. 98:	Weizenkörner kontaminiert mit Sporen von <i>P. verrucosum</i>	111
Abb. 99:	Real Time PCR Expressionskinetik des <i>otapksPV</i> -Gens in <i>P. verrucosum</i> über einen Zeitraum von 42 Tagen.....	112
Abb. 100:	Kinetik der Ochratoxin A Biosynthese in <i>P. verrucosum</i> über einen Zeitraum von 58 Tagen.....	112
Abb. 101:	Mikroarrayanalyse der Expression des Ochratoxin A Biosyntheseclusters in Weizen.....	113

Abb. 102: Weizenversuch Phytotron.....	115
Abb. 103: Expressionsanalyse der Trichothecogene in <i>Fusarium culmorum</i> nach Wachstum auf Weizenpflanzen der Sorte Taifun.....	115
Abb. 104: Expressionsanalyse der Trichothecogene in <i>Fusarium culmorum</i> nach Wachstum auf Weizenpflanzen der Sorte Thasos.....	116
Abb. 105: Real Time PCR Weizenpflanzen.....	116
Abb. 106. ELISA Weizenpflanzen.....	117
Abb. 107: Sequenzabschnitt des <i>tri3</i> -Gens in <i>F. graminearum</i>	120
Abb. 108: Real Time PCR Genexpressionsanalyse des <i>tri3</i> -Gens in <i>F. graminearum</i>	120
Abb. 109: Mikroarray Genexpressionsanalyse des Trichothecenclusters in <i>F. graminearum</i>	121
Abb. 110: Vorhersagefunktion und Korrelation	124
Abb. 111: Schema des circadianen Regulationsmechanismus in <i>N. crassa</i>	137
Abb. 112: Oszillierende Sporulation in <i>N. crassa</i> und <i>P. verrucosum</i>	138
Abb. 113: Real Time PCR Expressionsanalyse, Vergleich Hell-Dunkel, nur Dunkel	139
Abb. 114: Modell der oszillierenden Genexpression.....	141
Abb. 115: Regulationsmodell.....	142

Tabellen	
Titel	Seite
Tab. 1: Verwendete Primerpaare	19
Tab. 2: Verwendete Pilzstämmе.....	22
Tab. 3: Einstellen der Wasseraktivität im Medium.....	36
Tab. 4: Programm des Phytotron.....	39
Tab. 5: Expressionsunterschiede innerhalb des Genclusters nach Wachstum von <i>F. culmorum</i> und <i>F. graminearum</i> bei verschiedenen äußeren Einflussfaktoren	73
Tab. 6: Expressionsunterschiede innerhalb des Genclusters nach Wachstum von <i>P. nordicum</i> und <i>P. verrucosum</i> bei verschiedenen äußeren Einflussfaktoren	91
Tab. 7: PCR Reaktionen mit den für <i>P. verrucosum</i> spezifischen <i>otapksPV</i> Primern.....	110
Tab. 8: Verwendete Weizensorten.....	114
Tab. 9: <i>Fusarium graminearum</i> Stämme für die Chemotyp-Differenzierung	119

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. Rolf Geisen für das sehr interessante, aktuelle Promotionsthema und für die exzellente Betreuung bedanken.

Herrn Professor Dr. Rheinhard Fischer danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ohne meine Eltern wäre dieses Studium nicht möglich gewesen, ich danke ihnen für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung, auf die ich immer zählen konnte.

Des Weiteren wären einige Arbeiten ohne die Unterstützung der folgenden Personen nicht möglich gewesen, sei es wegen Gerätschaften, oder spezifischen Pilzstämmen die für bestimmte Versuche benötigt wurden.

-A. Quarta, Institute of Sciences of Food Production, Italien (*Fusarium* Chemotypen)

-Professor N. Magan, Dr. E. Baxter, Cranfield Biotechnology Centre, England
(Zusammenarbeit Einfluss von Konservierungsstoffen)

-Dr. B. Trierweiler/Dipl. Ing. H. Schirmer/Prof. B. Tauscher, BfEL-Karlsruhe
(Bereitstellung des Phytotron, Mitscherlichtöpfe)

-Dr. Stahl, M. Knörr (Bestrahlung der Weizenproben), BfEL-Karlsruhe

-Prof. N. Leist, LUFA Augustenberg (Weizensorten)

-Dr. G. Buttinger, Dr. M. Michulec, European Commission, Directorate General
Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements,
Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgium (Zusammenarbeit Siloversuch, Weizen)

-Dr. W. Richter, Bavarian State Research Centre for Agriculture, Institute of
Animal Nutrition and Forage, Prof. Dürrwaechter-Platz 3, 85586 Poing, Germany
(Zusammenarbeit Siloversuch, Weizen)

Außerdem danke ich den Mitarbeitern des Labors, Nicole Mischke, Lars Uhlmann, Alexander Hanak und besonders Doreen Roblick für ihre Unterstützung.

I) Originalpublikationen:

Geisen, R., Schmidt-Heydt, M., Karolewicz, A. (2006) A gene cluster of the ochratoxin A biosynthetic genes in *Penicillium*. *Mycotoxin Research* **22**: 134-141.

Schmidt-Heydt, M., Geisen, R. (2007) Gene expression as an early indication for mycotoxin biosynthesis. *Mycotoxin Research* **23**: 13-21.

Geisen, R., Schmidt-Heydt, M. (2007) Molekulares Orakel, wie Mikroarrays die Mykotoxinbildung vorhersagen. *LVT Lebensmittelindustrie* **1**: 48-50.

Geisen, R., Schmidt-Heydt, M. (2007) Molecular forecasting of mycotoxin production by fungi. *Bioforum Europa* **5**: 23-27.

Schmidt-Heydt, M., Geisen, R. (2007) A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. *Int. J. Food Microbiol* **117**: 131-40.

Schmidt-Heydt, M., Baxter, E. Geisen, R., Magan, N. (2007) Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPv* gene expression by *Penicillium verrucosum*. *Int. J. Food Microbiol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.008>

Schmidt-Heydt, M., Richter, W., Michulec, M., Buttinger, G., Geisen, R. (2007) Molecular and chemical monitoring of growth and ochratoxin A biosynthesis of *P. verrucosum* in wheat stored at different moisture conditions. *Mycotoxin Research*. *submitted*.

Schmidt-Heydt, M., Richter, W., Michulec, M., Buttinger, G., Geisen, R. (2007) A comprehensive molecular system to study presence, growth and ochratoxin A biosynthesis of *P. verrucosum* in wheat. *Food Additives and Contaminants*. *submitted*.

Schmidt-Heydt, M., Magan, N., Geisen, R. (2007) stress induction of mycotoxin biosynthesis genes. *Int. J. Food Microbiol.* *Submitted*

Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Geisen, R. (2007) *Fusarium sporotrichioides* produces Aflatoxin B1 and G1. *in preparation*.

Houssou, P., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., Fandohan, P., Ahohuendo, B., Hounhouigan, J., Jakobsen, M. (2007) Molecular characterization of strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from cowpea. *in preparation*.

Houssou, P., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R., Fandohan, P., Ahohuendo, B., Hounhouigan, J., Jakobsen, M. (2007) In vitro assessment of the antifungal and antiaflatoxin properties of dehulled and undehulled cowpeas. *in preparation*.

II) Vorträge und Poster:

Vorträge:

„Entwicklung eines DNA-Chips zur Expressionsanalyse mykotoxin-biosynthetischer Gene in verschiedenen Spezies mit Schwerpunkt auf Trichothecengene in Fusarien“. (Mykotoxin-Workshop, Dortmund 12-15.06.2005)

„ Development of a microarray to monitor the expression of mycotoxin biosynthetic genes in different species with emphasis on trichothecene genes in *Fusaria*“. (VAAM-Tagung, Bochum 5-7.09.2005)

„Anwendung eines Microarray zur Expressionsanalyse mykotoxin-biosynthetischer Gene in Korrelation zur Toxinbildung in Fusarien“. (Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Suhl 5-7.04.2006)

“Transcriptional analysis of trichothecene production in *Fusarium* spp. by microarray after growth in different abiotic conditions in relation to phenotypic DON biosynthesis“. (Wageningen 19.09.2006 Advances on genomics, biodiversity and rapid systems for detection of toxigenic fungi and mycotoxins)

“Schimmelpilze und Mykotoxine in Lebensmitteln“. (Regionaltag, Karlsruhe 23.09.2006)

“Schimmelpilze und Toxine. Bedeutung für die Ernährung“. (Schülertag, Karlsruhe 12.06.2007)

„Molekulare Ansätze zur Vermeidung der Mykotoxinbildung“. (BfEL-Kolloquium 09.10.07)

Poster:

„Approach towards the cloning of a halogenating enzyme in *Penicillium nordicum* an ochratoxin producing fungus“. (Safe Seminar, Brüssel 18-19.03.2004)

„Development of a microarray to monitor the expression of trichothecen biosynthetic genes in *Fusaria*“. (Statusseminar Chiptechnologien, Frankfurt 3-4.02.2005)

“Application of a microarray to monitor the influence of growth phase and substrate on the expression of trichothecene biosynthesis genes“. (Statusseminar Chiptechnologien, Frankfurt 2-3.02.2006)

“Monitoring the expression of the trichothecene biosynthetic genes in correlation to toxin formation”. (Mykotoxin-Workshop, Bydgoszcz 29.05-1.06.2006)

“Expression analysis of trichothecene biosynthetic genes of *Fusarium poae* by microarray in correlation to different environmental parameters”. (Food Micro, Bologna 2006)

“Expression analysis of ochratoxin A biosynthesis genes in *Penicillia*”. (Food Micro, Bologna 2006)

“Microarray and Real Time PCR analysis of the expression of trichothecene biosynthesis genes in cereals”. (Mykotoxin-Workshop, Fellbach 14-16.05.2007)

“Development and Application of a Molecular Detection and Quantification System for the Ochratoxin A producing species *P. verrucosum*”. (Mykotoxin-Workshop, Fellbach 14-16.05.2007)

“Microarray analysis of the expression of ochratoxin biosynthesis genes under different environmental conditions”. (Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Seon, 2007)

“Development of a PCR system to detect the ochratoxin A producing species *Penicillium verrucosum*”. (Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Seon, 2007)
Posterpreis, 2ter Platz

III)

Patent:

„Testsystem zur Analyse der Expression mykotoxinbiosynthetischer Gene *in situ*“.

Offenlegungstag 14.12.2006

Name: Markus Schmidt-Heydt
Geburtsdatum: 03. Januar 1974
Geburtsort: Karlsruhe

Familienstand: verheiratet
 ein Sohn: Mark E.K geb. 18.01.2007
 eine Tochter: Alica S. geb. 01.12.1995

Ausbildung

- seit 01/05** Arbeit an der Dissertation: Entwicklung und Implementierung eines DNA-Chips zur Analyse mykotoxinbiosynthetischer Gene.
- 11/04** Diplom in Biologie, Note: sehr gut
- 03/04 bis 10/04** Diplomarbeit: Screenen nach Genen der Ochratoxinbiosynthese in *P.nordicum* mit Schwerpunkt auf eine Chloroperoxidase.
- 01/04 bis 03/04** Diplomprüfungen, Hauptfächer: Genetik und Zoologie, Nebenfächer: Mikrobiologie und organische Chemie.
- 09/98 bis 09/2003** Studium der Biologie an der Elite-Universität Karlsruhe.
-
- 07/98** Abitur, Note: 1.6; Leistungskurse: Chemie und Biologie.
- 07/95 bis 07/98** Besuch des Gertrud-Bäumer-Gymnasiums in Karlsruhe.
- 94 bis 95** Wehr-und Zivildienst, Hildesheim und Pforzheim.
- 92 bis 94** Ausbildung: MTA, Städtisches Klinikum Karlsruhe
- 85 bis 91** Rennbuckel-Realschule, Karlsruhe
- 81 bis 85** Drais-Grundschule, Karlsruhe